



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.

Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.

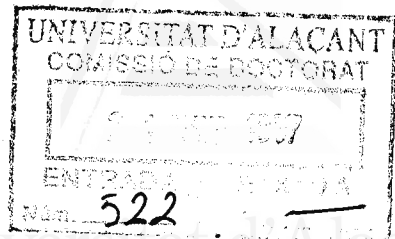
[Ir directamente al índice](#)

Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores

Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .

[Anar directament a l'índex](#)

Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.



UNIVERSIDAD DE ALICANTE

**SÍNTESIS DE PGE₂ EN CULTIVO PRIMARIO
DE ENDOTELIO CORNEAL BOVINO:
EFECTOS DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS.**

MEMORIA

que para optar al grado de doctora en

Medicina

presenta

MARIA CRISTINA GARCIA CABANES

Alicante, 1997



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Alfredo Orts Buchón, profesor titular de Farmacología, y Mercedes Palmero Cabezas, colaboradora honorífica de Farmacología de la Universidad de Alicante

CERTIFICAN:

Que el trabajo experimental correspondiente a la presente memoria titulada “ Síntesis de PGE₂ en cultivo primario de endotelio corneal bovino: efectos de fármacos antiinflamatorios”, ha sido realizado por María Cristina García Cabanes bajo nuestra dirección y que, a nuestro juicio, reúne las condiciones adecuadas para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente para aspirar al grado de Doctora en Medicina.

Alicante, 21 de mayo de 1997.

Fdo.: A. Orts Buchón

Fdo.: M. Palmero Cabezas





D. Bernat Soria Escoms certifica que el trabajo experimental correspondiente a la presente memoria titulada “Síntesis de PGE₂ en cultivo primario de endotelio corneal bovino: efectos de fármacos antiinflamatorios”, ha sido realizado por María Cristina García Cabanes y reúne las condiciones adecuadas para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente para aspirar al grado de Doctora en Medicina.

Alicante, 2 de julio de 1997.

Fdo.: Dr. B. Soria Escoms



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por
CIBA VISION S.A. Barcelona (España)

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda directa o indirecta de un gran número de personas. Por eso quisiera agradecer a,

José Francisco Horga y Clara Faura por haberme dado la posibilidad de incorporarme al Departamento de Farmacología.

Alfredo Orts por brindarme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio.

Mercedes Palmero por nuestra primera experiencia juntas, ella como codirectora y yo como su discípula. Siempre quedarán buenos recuerdos de las largas horas compartidas.

Miguel Sanz por haber soportado con paciencia mi inexperiencia en el laboratorio, sobre todo con el ordenador, por los buenos ratos pasados en los almuerzos a media mañana y por su inestimable amistad.

Juan Bellot por haber sido mi “taxista particular” los lunes por la mañana y por todas sus sugerencias aportadas a este trabajo.

Miguel Angel Company por su ayuda en los quehaceres diarios del sacrificado “mundillo” de los cultivos celulares.

José Manuel González Ros, Asia Fernández y José Villanueva por tener tan buena disposición ayudándome con el fluorímetro.

Sería interminable nombrar a cada una de las personas a las que tantas veces he dado las gracias, por eso quiero dedicar este párrafo a mis compañeros de laboratorio, Nuria Alcoriza, Alfonso Blanco y Rafael Espí, a todos los miembros del Departamento de Farmacología y no olvidarme de mis vecinos de laboratorio José Antonio Encinar y Mavi Camarasa por haber estado dispuestos a echarme una mano en cualquier momento.

Por último quiero dar las gracias especialmente a mis padres, mi hermana, Beatriz Gal, Mikel López de Armentia y José Manuel Fernández por haber estado ahí siempre que los he necesitado.



INTRODUCCION	2
1.- REACCION INFLAMATORIA OCULAR: GENERALIDADES	3
1.1.- Fases de la reacción inflamatoria	4
1.2.- Células implicadas en proceso inflamatorio	5
1.2.1.- Células de los tejidos	5
1.2.2.- Células hemáticas	6
1.3.- Mediadores de la inflamación	7
1.3.1.- Mediadores humorales	8
1.3.2.- Mediadores celulares	9
2.- PROSTAGLANDINAS: CARACTERISTICAS GENERALES	13
2.1.- Biosíntesis	13
2.1.1.- Movilización del ácido araquidónico.....	13
2.1.2.- Síntesis de endoperóxidos intermedios	17
2.1.3.- Metabolismo de los endoperóxidos intermedios: síntesis de prostanoïdes	18
2.2.- Mecanismo de acción y receptores	19
2.3.- Catabolismo	22
3.- PROSTAGLANDINAS E INFLAMACION	23
3.1.- Efectos a nivel vascular	23
3.2.- Hiperalgnesia y fiebre	24
3.3.- Función leucocitaria	25
4.- LA CORNEA	26
4.1.- Anatomía de la córnea	26
4.1.1.- Epitelio	26
4.1.2.- Capa de Bowman	27
4.1.3.- Estroma	27
4.1.4.- Membrana de Descemet	28
4.1.5.- Endotelio	28
4.2.- Inervación	29
4.3.- Fisiología de la córnea	29
4.3.1.- Metabolismo corneal	29
4.3.2.- Control de la hidratación del estroma	30
4.4.- Inflamación corneal	32
4.4.1.- Metabolitos de la ciclooxigenasa implicados en la inflamación corneal	34
4.5.- Efectos de la PGE2 sobre el endotelio corneal	37
5.-FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS	39
5.1.- Glucocorticoides	39
5.2.- AINES	41

OBJETIVOS	43
MATERIAL Y METODOS	45
1.- CULTIVO DE LAS CELULAS DEL ENDOTELIO CORNEAL	46
1.1.- Cultivos primarios	46
1.2.- Subcultivos	48
2.- SINTESIS DE PGE2 POR LAS CELULAS DEL ENDOTELIO CORNEAL BOVINO	50
2.1.- Síntesis de PGE2 en condiciones basales	50
2.2.- Efectos del AA exógeno y el ionóforo del calcio A23187	50
2.3.-Curso temporal de la síntesis de PGE2 inducida por el ionóforo del calcio A23187	51
3.- EFECTOS DE FARMACOS SOBRE LA SINTESIS DE PGE2 INDUCIDA POR DIFERENTES AGENTES ESTIMULANTES	51
4.- CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE PGE2 EN EL MEDIO DE CULTIVO	52
5.- DETERMINACION DE ADN	53
6.- ANALISIS Y EXPRESION DE LOS RESULTADOS	54
7.- REACTIVOS	54
RESULTADOS	55
1.- LIBERACION DE PGE2 POR LAS CELULAS DE ENDOTELIO CORNEAL BOVINO	56
2.- EFECTOS DEL IONOFORO DEL CALCIO A23187 Y DEL ACIDO ARAQUIDONICO EXOGENO SOBRE LA SINTESIS DE PGE2	57
2.1- Utilización del AA exógeno para la síntesis de PGE2 por las CECB	57
2.2.- Determinación del tiempo de incubación del A23187	59
2.3.- Curso temporal de la síntesis de PGE2 en células tratadas con A23187 y AA	61
3.- EFECTOS DE FARMACOS SOBRE LA SINTESIS DE PGE2 INDUCIDA POR A23187	63
3.1.- Efecto de indometacina y prednisolona	63
3.2.- Curvas dosis-respuesta	65
3.2.1.- AINES	65
3.2.2.- Glucocorticoides	67
4.- EFECTOS DEL LPS SOBRE LA SINTESIS DE PGE2	69
5.- EFECTO DE FARMACOS SOBRE LA SINTESIS DE PGE2 INDUCIDA POR LPS	71
5.1.- Efecto de indometacina y prednisolona	71
5.2.- Curvas dosis-respuesta	72
5.2.1.- AINES	72
5.2.2.- Glucocorticoides	73

DISCUSION	75
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFIA	88

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



LISTA DE ABREVIATURAS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

- A₂₃₁₈₇: ionóforo del calcio A₂₃₁₈₇.
AA: ácido araquidónico.
Ac: anticuerpo.
AINES: antiinflamatorios no esteroideos.
ADN: ácido desoxirribonucleico.
Ag: antígeno.
AMPC: adenosin-5'-monofosfato cíclico.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
Ca²⁺: calcio intracelular.
CECB: células de endotelio corneal bovino.
COX: ciclooxigenasa.
DMEM: medio de Dulbecco modificado por Eagle.
DMSO: dimetilsulfóxido.
EDTA: ácido etilen-diamino-tetra-ácetico.
IC₅₀: concentración a la que se obtiene el 50% de inhibición máxima.
IL: interleucinas.
LPS: lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium*.
Lts: leucotrienos.
PAF: factor de activación plaquetaria.
PBS: tampón fosfato salino de Dulbecco.
PGH-sintetasa: prostaglandina endoperóxido-sintetasa.
Pgs: prostaglandinas.
PIO: presión intraocular.
PLA₂: fosfolipasa A₂.
PLC: fosfolipasa C.
PLD: fosfolipasa D.
PGI₂: prostaciclina.
RIA: radioinmuno ensayo.
TNF- α : factor de necrosis tumoral α .
Txs: tromboxanos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

INTRODUCCION

1.- REACCION INFLAMATORIA OCULAR: GENERALIDADES

La inflamación es un proceso que se inicia a consecuencia de una lesión y termina o con la destrucción permanente del tejido o con su curación. Los agentes desencadenantes de la respuesta inflamatoria son de naturaleza muy variada, pudiendo ser estímulos físicos, químicos, agresiones por seres vivos o agresiones inmunológicas.

La respuesta inflamatoria da lugar a una sintomatología local, caracterizada por dolor, rubor, tumor y calor, acompañada de la incapacidad funcional del tejido afectado, y a una reacción sistémica que conlleva al desarrollo de fiebre, leucocitosis y aumento en la concentración plasmática de determinadas proteínas.

La reacción inflamatoria tiene como finalidad la defensa del organismo frente al agente causal y la restauración del tejido lesionado. Dependiendo del órgano afectado y del balance entre el agente inductor y la respuesta inflamatoria, el proceso inflamatorio puede dar lugar a la restauración completa del tejido lesionado, a su sustitución por un tejido cicatricial o al fracaso de la respuesta inflamatoria y la subsiguiente cronificación del proceso. Las consecuencias de dicho fracaso dependerán del órgano afectado.

A nivel ocular, encontramos los mismos agentes desencadenantes de la reacción inflamatoria que en otras partes el organismo. Cuando la reacción inflamatoria llega a controlar el agente causal se recupera la función visual normal. Sin embargo cuando los mecanismos inflamatorios no logran controlar el agente agresor, cuando son demasiado intensos o cuando se mantienen activos de forma crónica, se pueden desencadenar múltiples complicaciones intraoculares, que ocasionan en mayor o menor medida una disminución en la función visual.

Aunque los mecanismos de la reacción inflamatoria a nivel ocular son semejantes a los que tienen lugar en los restantes tejidos del organismo, debemos distinguir algunas características propias de este órgano, como son la existencia de la barrera hemato-acuosa y la barrera hemato-retiniana.

La **barrera hemato-acuosa** situada a nivel de la úvea anterior está formada por uniones firmes intercelulares existentes entre las células que forman el epitelio ciliar. Actúa como filtro entre los componentes de la sangre y los que se encuentran en el humor acuoso.

Gracias a esta barrera, el humor acuoso carece por completo de células sanguíneas y posee una concentración proteica de 0,2 mg/ml frente a la concentración plasmática que es de 70 mg/ml. Esta concentración proteica tan baja impide la coagulación del humor acuoso en condiciones normales.

La **barrera hemato-retiniana** localizada en el compartimento posterior del globo ocular está constituida por dos componentes. Por un lado, las uniones que se encuentran entre las células del epitelio pigmentario de la retina que impiden el paso de macromoléculas desde la coriocalpilar hacia la retina neurosensorial y por otra, las uniones intercelulares presentes entre las células del endotelio vascular de la retina que impiden la transudación de macromoléculas desde el torrente vascular.

Mediante estas dos barreras se mantienen intactos los medios transparentes del globo ocular para la transmisión adecuada del estímulo visual y se asegura la función visual normal de los fotorreceptores retinianos.

1.1.- Fases de la reacción inflamatoria

Para poder sistematizar los acontecimientos que tienen lugar durante la inflamación, aunque quizás no responda exactamente a la cronología de los hechos, se puede dividir la respuesta inflamatoria en varias fases: fase inicial, fase vascular, fase celular y fase de reconstrucción de los tejidos afectados.

En la **fase inicial** al interactuar el estímulo dañino con los tejidos se induce la liberación de gran cantidad de mediadores, unos ya preformados en los tejidos como la histamina, y otros que se sintetizan y se liberan como resultado de esta interacción como es el caso de los derivados del ácido araquidónico (AA) (prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs)), factor agregante plaquetario (PAF) y radicales libres de oxígeno.

Al actuar los mediadores citados sobre los vasos sanguíneos se inicia la **fase vascular**. Esta fase consiste fundamentalmente en una vasodilatación, subsiguiente aumento de la circulación seguido de enlentecimiento y éxtasis de la sangre, aumento de la permeabilidad capilar y exudación del líquido vascular.

El líquido exudado contiene gran cantidad de mediadores de la inflamación que actúan

sobre las células vecinas y sobre los vasos. Se inician en este momento tres cascadas enzimáticas: el sistema del complemento, el sistema de las cininas y el sistema de la coagulación.

Cuando se produce la éxtasis vascular y consiguiente extravasación, pasan a los tejidos vecinos células hemáticas que junto a los mastocitos ya existentes en los tejidos inician la **fase celular**.

Toda reacción inflamatoria desemboca en una necrosis tisular más o menos importante. **La reconstrucción de los tejidos** depende de la cantidad de pérdida de tejido durante el proceso inflamatorio, de la capacidad de proliferación del tejido afectado y de la persistencia o repetición del agente lesivo. Puede ocurrir que la inflamación desaparezca sin dejar rastro (curación) o si los tejidos han sido lesionados (citotoxicidad, supuración...), queda un tejido cicatrizal que puede tener graves consecuencias patológicas para la función en determinados órganos como el ojo.

1.2.- Células implicadas en el proceso inflamatorio

Las células que intervienen en el proceso inflamatorio son:

- Células de los tejidos : mastocitos.
- Células hemáticas:
 - Células fagocíticas:
 - Polimorfonucleares: neutrófilos, eosinófilos y basófilos.
 - Mononucleares: monocitos-macrófagos.
 - Células no fagocíticas:
 - Mononucleares: linfocitos.
 - Plaquetas.

1.2.1.- Células de los tejidos

Mastocitos: son numerosas cerca de las superficies cutáneas y mucosas, y menos abundantes en los órganos profundos donde se disponen alrededor de los vasos sanguíneos.

Cuando los mastocitos son estimulados liberan sustancias almacenadas en sus gránulos de secreción tales como aminas vasoactivas (histamina, serotonina), proteasas

neutras, proteoglicanos, enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo y factores quimiotácticos. Por otro lado, la estimulación celular también activa la síntesis de sustancias nuevas: PGs, LTs y PAF.

La activación de los mastocitos representa el mecanismo inflamatorio principal de las conjuntivitis alérgicas del tipo de la fiebre de heno, conjuntivitis primaveral, conjuntivitis papilar gigante y queratoconjuntivitis atópica (Lee Stock y col., 1990). Además, también se ha sugerido la implicación de los mismos en algunos cuadros de uveítis autoinmune, como la uveítis autoinmune experimental (Fujino y col., 1991).

1.2.2.- Células hemáticas

a) Células fagocitarias:

-Polimorfonucleares: son las primeras células hemáticas que llegan a las zonas de inflamación. Emigran activamente hacia el lugar de la inflamación atraídos por sustancias químicas liberadas por microorganismos, producidas localmente o bien por el LTB₄.

Entre los polimorfonucleares, los **neutrófilos** son los que tienen mayor capacidad para fagocitar y digerir los microorganismos que se fijan a su membrana. Poseen enzimas digestivas que pueden digerir prácticamente todos los componentes de la mayor parte de los microorganismos y que en determinadas circunstancias pasan al exterior celular, rompen los componentes del complemento e inician la cascada de las cininas. Así pues, proporcionan otro sistema de activación de los mediadores de la inflamación. Los **basófilos** son muy similares a los mastocitos y responden de forma semejante a los mismos estímulos, mientras que los **eosinófilos** son fagocitos débiles que presentan un papel particular en la destrucción de los parásitos, en conjunción con los mediadores de los mastocitos, los anticuerpos y el complemento.

-Mononucleares: los **monocitos** entran en la zona inflamatoria ya en el último estadio, después de los polimorfonucleares. En los tejidos se transforman en macrófagos y fagocitan no solamente a los microorganismos, sino también a los restos celulares, en particular a los de los polimorfonucleares.

Son capaces de segregar múltiples mediadores de la inflamación, entre los que

destacan agentes antiinfecciosos (interferón), componentes del complemento, citocinas -interleucina 1 (IL-1)- y derivados del AA (PGE₂, TXA₂ y LTs).

b) Células no fagocitarias

-Linfocitos: estas células sólo participan en el terreno de las respuestas inflamatorias inmunes, donde el organismo busca alcanzar un estado inmune. Para ello, los macrófagos son los encargados de procesar a los antígenos, de presentarlos a los **linfocitos T** y de activar a estos últimos. Los **linfocitos T** activados expresan su actividad cooperadora o citotóxica y sintetizan unas linfocinas que intervienen en la activación y diferenciación de los **linfocitos B**, responsables de la síntesis de anticuerpos.

- Plaquetas: aunque las plaquetas influyen principalmente en la coagulación, también intervienen en los procesos inflamatorios. Poseen numerosas funciones inflamatorias, pueden activar y regular el complemento, adherir microorganismos sobre su superficie, alterar la permeabilidad vascular, producir factores quimiotácticos, liberar y metabolizar sustancias vasoactivas, producir derivados del AA y liberar factores de crecimiento celular que participan en las fases de reparación que siguen a la lesión de los vasos sanguíneos.

La activación plaquetaria durante la inflamación ocular conlleva a la formación de una malla de fibrina en la cámara anterior. Debido a su efecto quimiotáctico, las plaquetas intervienen en la acumulación de células fagocitarias en el tejido uveal inflamado, así como en la cámara anterior. Además, también estimulan la acción de los neutrófilos atraídos hacia el tejido uveal (Alió y col., 1995).

1.3.- Mediadores de la inflamación

Los mediadores son sustancias presentes en el medio extracelular que permiten la comunicación entre las diferentes células que participan en las reacciones inflamatorias o inmunológicas.

Académicamente podemos distinguir dos tipos de mediadores: humorales y celulares. Por un lado la estimulación de la célula desencadena la síntesis de **mediadores humorales** a

partir de precursores inactivos presentes en los humores (plasma). Por otro lado, los **mediadores celulares** son preformados en las células y la activación de las mismas produce su liberación.

Los mediadores son múltiples según su naturaleza química (aminas, péptidos, proteínas, lípidos) y su actividad biológica. Tienen como característica común una vida biológica muy corta, ya que sólo son activos durante el período de inflamación porque son rápidamente inactivados por el catabolismo o por la acción de antagonistas.

Los **mediadores celulares** y los factores que activan los **mediadores humorales** proceden de las diferentes células que participan en las reacciones inflamatorias e inmunológicas. Citaremos las propiedades de los que participan fundamentalmente en la reacción inflamatoria.

1.3.1.- Mediadores humorales

Cuatro sistemas humorales principales contribuyen a iniciar y mantener las respuestas inflamatorias: sistema del complemento, sistema de cininas, coagulación y fibrinólisis.

a) Sistema del complemento

El sistema de complemento está integrado por nueve componentes (C1 a C9), algunos de ellos (C3a y C5a) pueden inducir la liberación de otros factores de la inflamación por parte de los mastocitos (histamina, heparina) manteniéndose así la respuesta inflamatoria.

b) Sistema de cininas

Este sistema produce uno de los mediadores más potentes de la inflamación, la bradicinina. Se trata de uno de los más potentes factores vasoactivos. Contrae las fibras musculares lisas, aumenta la permeabilidad vascular y estimula las fibras nerviosas sensitivas (dolor).

A nivel ocular, la bradicinina provoca la aparición de miosis pupilar, rotura de la barrera hematoacuosa y elevación de la presión intraocular (PIO) seguida de hipotonía (Alió y col., 1995).

c) Coagulación y fibrinólisis

La cascada de la coagulación participa tanto en los procesos inflamatorios con lesión vascular como sin ella.

El sistema de la coagulación, a través de la trombina, principal enzima en este sistema, puede activar a su vez, el sistema del complemento y el sistema extrínseco de la coagulación a través del factor XII o de Hageman que está implicado en la activación tanto del sistema de la cininas como en la fibrinólisis.

En los procesos de uveítis, la coagulación se activa en mayor medida en aquellos cuadros que conllevan lesión ocular (por ejemplo, traumatismos oculares). La activación de la coagulación determina la formación de mallas de fibrina en las estructuras oculares de las cámaras anterior y posterior que se estabilizan por la activación plaquetaria durante la inflamación (Alió y col., 1995).

1.3.2.- Mediadores celulares

a) La histamina

En el foco inflamatorio la principal fuente de histamina se encuentra en los mastocitos, aunque también está presente en los basófilos y en las plaquetas.

La acción de la histamina se produce a través de su unión a receptores específicos de membrana (H₁ y H₂), de manera que, a nivel capilar, la unión a los receptores H₁ contribuye a la extravasación sanguínea y la unión a los receptores H₂ a la vasodilatación y al aumento del aporte arterial al foco inflamatorio.

La histamina posee un efecto regulador sobre las reacciones inflamatorias inmunes, ya que estimula la formación de linfocinas por los linfocitos T.

b) Metabolitos del ácido araquidónico

Los metabolitos del AA implicados en los procesos de inflamación son el resultado de la acción de dos oxigenasas sobre el AA liberado de los fosfolípidos de la membrana mediante una serie de reacciones en cascada. Entre los metabolitos derivados de la acción del enzima ciclooxigenasa destacan los prostanoideos (PGs, PGL₂ y TXs), mientras que mediante la ruta del enzima lipoxigenasa los metabolitos resultantes son los LTs.

Debido a que los prostanoideos son los mediadores inflamatorios objeto de nuestro estudio los describiremos detalladamente en los apartados siguientes.

Casi todas las células del organismo, incluyendo las células intermediarias de la inflamación, son capaces de sintetizar LTs.

El LTB₄ ejerce efecto sobre los neutrófilos y eosinófilos, estimulando su agregación celular, su quimiotactismo hacia el foco inflamatorio, la liberación del contenido de sus gránulos y su metabolismo oxidativo. El LTC₄, LTD₄ y LTE₄, se sintetizan en mayor cantidad en los macrófagos. Estos provocan un aumento de la permeabilidad vascular (Lewis y Austen, 1981) y una marcada vasodilatación arteriolar. Además son capaces de activar la síntesis del TXA₂ y de las PGs a nivel de los macrófagos (Feurstein y col., 1981).

A nivel ocular, la síntesis de LTs es máxima en el tejido uveal. El LTB₄ posee una actividad quimiotáctica muy marcada, y es el principal implicado en el acúmulo de células fagocitarias durante la uveítis. Debido a esta acción tiene lugar la infiltración en el tejido uveal por los neutrófilos activados, y el acúmulo de las células inflamatorias en el humor acuoso, produciendo el efecto tyndall celular (Bhattacharjee y Paterson, 1990). El LTB₄ también interviene estimulando la actividad oxidativa de los neutrófilos reclutados en la úvea y en el humor acuoso.

c) Factores de activación plaquetaria

Estos factores, conocidos bajo las siglas PAF, encierran a un grupo de mediadores lipídicos que se sintetizan cuando empieza el proceso inflamatorio. Estos mediadores se sintetizan en neutrófilos, plaquetas, basófilos, mastocitos, eosinófilos, células endoteliales y macrófagos. Todos estos tipos de células sintetizan PAF cuando son estimuladas por complejos inmunes, factores del complemento, trombina, antígenos, bradicinina, histamina, anticuerpos y linfocinas.

En cuanto a su acción, el PAF liberado provoca la agregación y degranulación de las plaquetas y la liberación de sus mediadores. También provoca vasoconstricción venular con incremento de la permeabilidad vascular. Por otro lado, el PAF determina la marginación vascular de neutrófilos y monocitos, y aumenta su diapédesis a través de la pared vascular. Sobre los neutrófilos y macrófagos de los tejidos actúa estimulando la secreción de sus

gránulos lisosomales al mismo tiempo que estimula su metabolismo oxidativo (Moilanen y col., 1993).

Debido a su efecto sobre la permeabilidad vascular, el PAF participa en la formación del acúmulo de proteínas y macromoléculas en la cámara anterior y en el tejido uveal inflamado (Lin y col., 1991). Por otra parte, estimula la actividad oxidativa de las células inflamatorias acumuladas en la úvea durante el proceso inflamatorio. Se sabe que la inyección intracamerular del PAF da lugar a tyndall de cámara anterior, miosis y edema corneal (Sheng y Birkle, 1992).

d) Factores quimiotácticos

Los factores quimiotácticos son de naturaleza muy variada. Ciertos productos exógenos (bacterianos) tienen actividad quimiotáctica propia, pero la mayor parte de los tipos de antígeno depositados en los tejidos, atraen a los leucocitos indirectamente por la intermediación de factores endógenos de naturaleza muy variada tales como el sistema del complemento o fibrina.

Entre los lípidos bioactivos, el principal quimioatrayente es el LTB₄, actuando fundamentalmente sobre los neutrófilos. El quimiotactismo es una función accesoria para el PAF, linfocitos y mastocitos.

Durante los procesos de uveítis, los factores quimiotácticos intervienen en el acúmulo de células fagocitarias a nivel de la úvea inflamada. El aumento de permeabilidad vascular que tiene lugar durante los episodios de uveítis, también provocan el acúmulo de estas células a nivel de la cámara anterior (Alió y cols, 1995).

e) Linfocinas

Las linfocinas juegan un papel esencial en las manifestaciones inflamatorias, provocando el reclutamiento y la activación de los linfocitos, monocitos-macrófagos y Polimorfonucleares, e incluso la liberación de ciertos mediadores.

De todos los tipos de interleucinas conocidos, la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF α) son las principales interleucinas detectadas en el foco inflamatorio. Ambos estimulan la síntesis de PGE₂ en diversas células inflamatorias (células endoteliales, macrófagos y

fibroblastos) y la síntesis de PAF en las células endoteliales durante el proceso inflamatorio (Bussolino y col., 1986; Elias y col., 1987).

Las principales citocinas implicadas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria ocular son la IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF α . Están implicadas en desarrollo de diferentes reacciones inflamatorias intraoculares, tanto agudas como crónicas (Samples y col., 1993).

f) Oxido nítrico

El óxido nítrico es un radical gaseoso implicado recientemente en numerosos procesos patológicos. Se sabe que en determinados procesos inflamatorios, los polimorfonucleares, los macrófagos y las células del endotelio vascular sintetizan óxido nítrico. Esta molécula presenta efecto citotóxico (Stuehr y Nathan, 1989) y un marcado efecto vasodilatador (Kubes y Granger, 1992).

Recientes investigaciones han sugerido que el óxido nítrico puede actuar como mediador de algunas inflamaciones oculares, como la uveítis (Parks y col., 1994).

g) Radicales libres

Las células inflamatorias producen radicales libres como el O₂⁻ (anión superóxido) y OH \cdot (radical hidroxilo). Los neutrófilos activados son una fuente importante de producción de estos radicales, aunque éstos también pueden formarse durante la cascada del AA, tanto por la vía de la ciclooxygenasa como por la de la lipooxygenasa.

Los radicales libres liberados causan lesiones macromoleculares del espacio extracelular, membrana celular y entorno microvascular produciendo un aumento de la permeabilidad y adhesión de leucocitos al endotelio vascular (Del Maestro, 1980).

A nivel ocular, se sabe que los radicales libres participan en los procesos inflamatorios corneales contribuyendo a la ulceración corneal (Carubelli y col., 1990) y en la uveítis (De Kozak y col., 1989).

2.- PROSTAGLANDINAS: CARACTERÍSTICAS GENERALES

Von Euler en 1936 acuñó por primera vez el nombre de prostaglandina a una sustancia presente en el líquido seminal humano responsable de sus actividades hipotensoras y espasmogénicas. Von Euler creyó que esa sustancia se originaba en la glándula prostática y por eso la llamó “prostaglandina”.

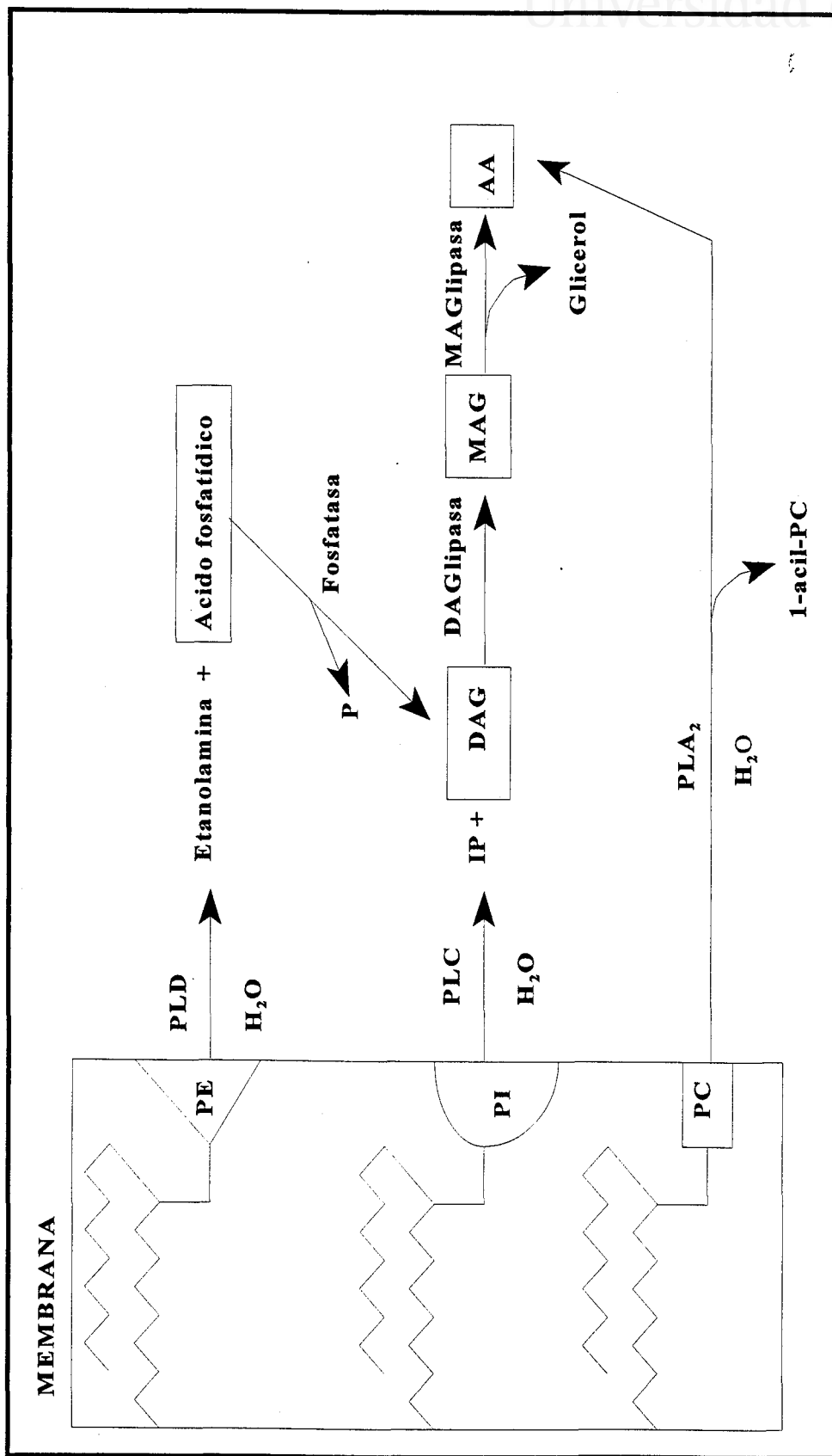
2.1.- Biosíntesis

Las PGs se sintetizan en todos los tejidos a excepción de los glóbulos rojos (Higgs y col., 1981) a partir del AA, un ácido graso insaturado de 20 átomos de carbono que contiene cuatro dobles enlaces. El AA es un ácido graso esencial que se obtiene directamente de la dieta o indirectamente a partir del metabolismo del ácido linoleico. La concentración de AA libre es muy baja debido a su rápida esterificación, almacenándose formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular.

El paso inicial y limitante de la velocidad de la síntesis de las PGs es la liberación del AA. Este proviene mayoritariamente de los fosfolípidos de las membranas celulares aunque en algunos casos otros lípidos o lipoproteínas pueden también ser fuente del mismo. Por ejemplo, Habenicht y col. (1990) descubrieron que las células 3T3 de ratón utilizaban el AA obtenido de la hidrólisis de los ésteres de colesterol o fosfolípidos de baja densidad como precursor de las PGs. Otra fuente de AA menos frecuente puede ser los depósitos de triglicéridos de algunas células como es el caso de las células de la médula adrenal (O'Neil, 1994).

2.1.1.- Mobilización del ácido araquidónico

La liberación del AA se desencadena como respuesta a estímulos de muy diverso origen tales como impulsos nerviosos, antígenos, reacciones inmunitarias, daño celular, isquemia, hormonas, neuropéptidos... que son capaces de activar las fosfolipasas tisulares. Si partimos de la base de que el AA está esterificado en los diversos tipos de fosfolípidos de la membrana celular, normalmente en la posición dos, entonces podemos encontrar tres posibles vías que pueden proporcionar AA (figura 1):



Enzima	Sustrato
PLD	PE, PC
PLC	PI, PE, PC
PLA ₂	1-2 diacil PI
	1-0-alkil2acil PI
	PE, PC

Figura 1: VIAS BIOSINTÉTICAS DEL ACIDO ARAQUIDÓNICO (Smith, 1992; O'Neill, 1994.)

DAG: diacilglicerol; IP: inositolfosfato; MAG: monoacilglicerol; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol

- a) La hidrólisis secuencial de los fosfolípidos por la acción de la fosfolipasa C (PLC) seguida de la diacilglicerol lipasa y la monoacilglicerol lipasa originando AA y glicerol (Balsinde y col., 1991).
- b) La conversión de los fosfolípidos en ácido fosfatídico catalizada por la fosfolipasa D (PLD) seguida de la acción de una fosfatasa, la diacilglicerol lipasa y de la monoacilglicerol lipasa originando AA y glicerol (Balsinde y col., 1991).
- c) La acción directa de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) sobre los fosfolípidos.

De los diversos tipos de fosfolipasas mencionados, el enzima principal implicado en la liberación del AA es la PLA₂. Podemos destacar dos tipos de PLA₂ (tabla I):

- Las extracelulares o de bajo peso molecular también denominadas PLA_{2s} debido a su origen secretor.
- Las intracelulares o de alto peso molecular a su vez conocidas como PLA_{2c} debido a su origen citosólico.

De todos los tipos de PLA₂ descritos hasta el momento, únicamente la PLA_{2s} tipo II y las PLA_{2c} (45kDa y 85kDa) parecen estar implicadas en la liberación del AA. La contribución de un tipo u otro de PLA₂ viene condicionado por el tipo celular, el estímulo y el entorno fisiológico (Goetzl y col., 1995). Como se refleja en la tabla I, en la mayoría de las células la actividad de la PLA₂ está controlada por la concentración del calcio libre intracelular (Waite y VanDeenan, 1967). Se sabe que un gran número de moléculas tales como la angiotensina, la bradicinina, la noradrenalina y las hormonas tiroideas estimulan la PLA₂ al unirse a receptores de membrana. Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G que activan a la PLC provocando la liberación del segundo mensajero inositol trifosfato. Este se une a receptores del retículo endoplásmico provocando así la liberación del calcio desde los depósitos intracelulares. Este aumento de calcio activa a la PLA₂ y conlleva como consecuencia la liberación del AA (Berridge e Irvine, 1989). El AA liberado puede difundir fuera del entorno celular sin causar efecto conocido alguno, ser incorporado a los fosfolípidos de la membrana, mecanismo responsable de su baja concentración en circunstancias basales, o bien ser metabolizado por tres vías diferentes: la **ciclooxigenasa** de cuya actuación proceden los prostanoideos (PGs, PGI₂ y TXs); las diversas **lipooxigenasas** que median la producción de los LTs; el **citocromo P-450** que origina los productos de la vía de la epoxigenasa.

Tipos de PLA ₂	P.M. (kDa)	Requerimiento de Ca ⁺²	Sustrato	Regulación
PLA_{2S}				
Tipo I: pancreática	14	≥ 1 mM	Todos los fosfolípidos	Ca ⁺² actúa como cofactor enzimático
Tipo II: no pancreática (fluido sinovial, plaquetas, hígado y bazo)	14	≥ 1 mM	Todos los fosfolípidos	Ca ⁺² actúa como cofactor enzimático
PLA_{2C}				
Intestinal	97	-----	Fosfolípidos con AA	
Macrófagos, hígado	85,5	≥ 1 μM	Fosfolípidos con AA	El Ca ⁺² es necesario: -translocación de la PLA ₂ del citosol a la membrana. -unión de la PLA ₂ a los fosfolípidos de membrana. - fosforilación
Miocardio	45	-----	Fosfolípidos con AA	
Asociada a la membrana (hígado células P388D ₁ ,) (También puede considerarse como un PLA ₂ Tipo II)	14-18	≥ 1 mM	Todos los fosfolípidos	Ca ⁺² actúa como cofactor enzimático

Tabla I: CLASIFICACION DE LOS TIPOS DE FOSFOLIPASA A₂.

Ref.: Smith, 1992; Glaser y cols, 1993 (a); Gelb y cols, 1994.

2.1.2.- Síntesis de endoperóxidos intermedios

La síntesis de todas las PGs se inicia en una primera etapa catalizada por la prostaglandina endoperóxido-sintetasa (PGH-sintetasa), una glicoproteína de membrana que se encuentra mayoritariamente en el retículo endoplásmico de las células que sintetizan PGs (Smith, 1986). Se trata de un dímero compuesto por dos subunidades idénticas que posee dos actividades catalíticas:

- La primera es una ciclooxigenasa (COX), encargada de insertar dos moléculas de oxígeno en el AA, ciclándolo y produciendo un endoperóxido intermedio denominado PGG₂.
- La segunda es una actividad peroxidasa, que cataliza la reducción del grupo 15-hidroperoxilo de la PGG₂ para convertirla en PGH₂ (Smith, 1989).

PGG₂ y PGH₂ se denominan endoperóxidos intermedios; aunque son biológicamente activos (poseen potente acción vasoconstrictora) son químicamente muy inestables con una semivida biológica de unos 30 segundos (Hamberg y Samuelson, 1974).

Se han descrito dos isoenzimas para la PGH-sintetasa: PGH-sintetasa 1 o COX-1 y la PGH-sintetasa 2 o COX-2 (Smith, 1992). Ambas son capaces de oxidar el AA a PGG₂ y de reducir la PGG₂ a PGH₂.

La COX-1 está presente en la mayoría de los tejidos que sintetizan PGs en ausencia de cualquier tipo de estímulo. De ahí que se la conozca como **COX constitutiva**. Su función es regular la síntesis fisiológica de PGs. La concentración de este enzima permanece generalmente estable y sólo se detectan pequeños aumentos de su expresión (2-4 veces) como respuesta a la estimulación provocada por hormonas o factores de crecimiento (De Witt, 1991; Wu y col., 1991). La COX-2, también denominada **COX inducible**, se expresa como respuesta a un estímulo aumentando notablemente su expresión en células tales como fibroblastos, monocitos o células endoteliales que hayan sido expuestas a endotoxinas bacterianas, citocinas o ésteres de forbol (Vane y Botting, 1995).

Estudios recientes han demostrado que la COX-1 se localiza en el retículo endoplásmico mientras que la COX-2 reside en el retículo endoplásmico y en la envoltura nuclear (Morita y col., 1995). De este modo se podría decir que la COX-2 produce PGs que actúan a nivel del núcleo en procesos de crecimiento, replicación y diferenciación celular, y en respuesta a hormonas y citocinas que actúan a nivel nuclear, mientras que la COX-1 genera

PGs que actúan como mediadores intercelulares de la homeostasis en el riñón, estómago, plaquetas y células del endotelio vascular. Es decir, la COX-1 está implicada en las necesidades fisiológicas de PGs mientras que la COX-2 es responsable de la producción rápida y transitoria de PGs frente a los mediadores de la inflamación, inmunológicos y de reparación de los tejidos (Goetzl y col.,1995) (Figura 2).

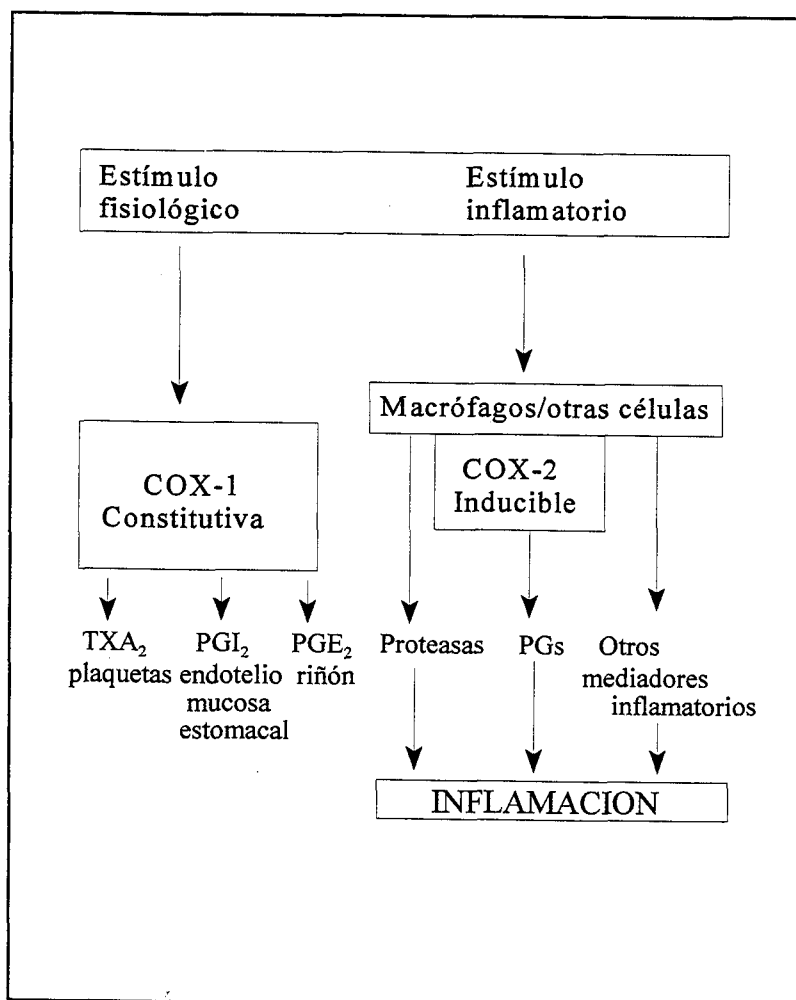


Figura 2: VIAS DE LAS ISOENZIMAS DE LA COX IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS DE PROSTANOIDEOS (Vane y Botting, 1995).

2.1.3.- Metabolismo de los endoperóxidos intermedios: síntesis de prostanoideos

Tras la biosíntesis de la PGH₂, este endoperóxido se transforma en uno de los derivados de una serie de posibles prostanoideos. En general este proceso es específico para cada tipo celular, de forma que cualquier célula capaz de sintetizar prostanoideos tiende a formar sólo uno de esos compuestos como producto mayoritario. La presencia de uno o de varios de sus derivados, así como su abundancia relativa está determinada por la dotación

enzimática presente en las células. Por ejemplo, las células del músculo liso o del endotelio vascular de las arterias grandes sintetizan principalmente PGI₂ (Smith, 1986), las plaquetas TXA₂, la PGF_{2α} es el producto mayoritario de las células del endometrio y la PGE₂ del túbulo distal (Kirschbaum y col.1982).

A partir de la PGH₂ las endoperóxido isomerasas sintetizan PGD₂ y PGE₂. No existe mucha información sobre las enzimas implicadas en la biosíntesis de estas PGs. Se sabe que existen PGD-sintetasas dependientes e independientes de glutatión. También se han identificado proteínas que presentan actividad PGE-sintetasa dependiente de glutatión, pero todavía no se ha podido determinar *in vivo* si alguna de esas proteínas son capaces de catalizar la síntesis de PGE₂. La PGF_{2α}-reductasa, utilizando NADPH como cofactor, cataliza la reacción de reducción que transforma la PGH₂ en PGF_{2α} (Smith, 1992). La PGH₂ también es el origen de dos compuestos inestables y muy potentes: el TXA₂ que se crea por la actuación de la TXA₂-sintetasa y la PGI₂ tras la acción de la PGI₂-sintetasa. Ambas enzimas pertenecen a la familia del citocromo P-450 (Graf y col., 1983; Haurand y Ullrich, 1985) (Figura 3).

2.2.- Mecanismo de acción y receptores

Las PGs no se almacenan sino que se generan en respuesta a estímulos de naturaleza variada. Una vez sintetizadas salen al espacio extracelular por difusión facilitada (Smith, 1986), y podrán actuar de manera local sobre el mismo tipo de células que han originado las PGs (acción autocrina) o sobre otros tipos celulares o tejidos (acción paracrina) a través de diversos receptores específicos localizados en las membranas celulares asociados a proteínas G, que estimulan o inhiben cambios en los niveles de los segundos mensajeros celulares (Smith, 1989). Según estudios de clonaje molecular los receptores de las PGs poseen siete dominios transmembrana, lo que les hace pertenecer a la familia de receptores tipo rodopsina (Narumiya y col., 1993). Estos receptores no son específicos de un solo tipo de PGs sino que presentan una gradación de afinidades por las diferentes PGs y se denominan en función de la PG natural por la que muestran mayor afinidad. Por ejemplo, el receptor de la PGE₂ muestra el siguiente orden de afinidades: PGE₂ = PGE₁ > PGI₂ > PGF_{2α}.

La clasificación de los receptores y sus principales acciones se resumen en la tabla II.

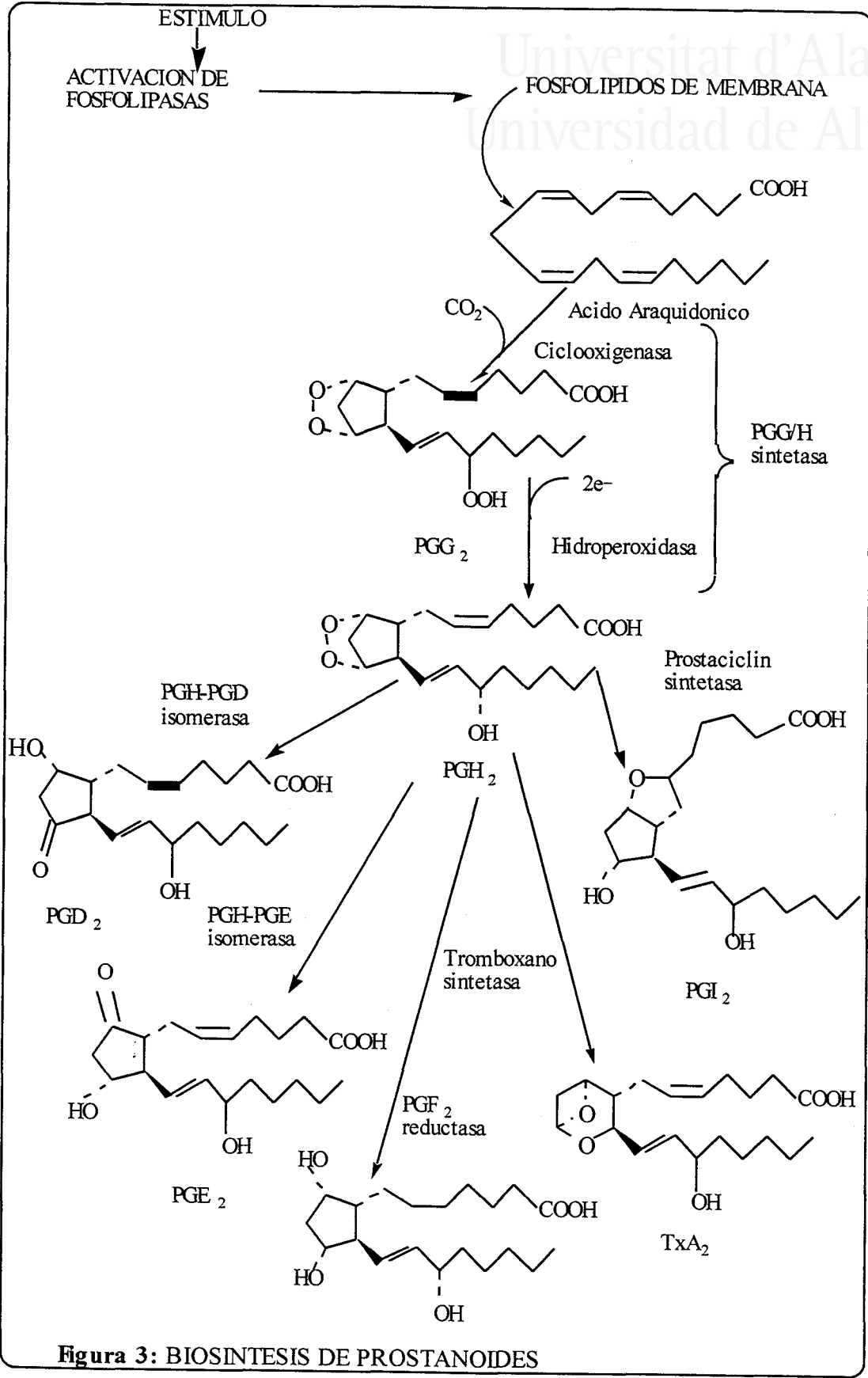


Figura 3: BIOSINTESIS DE PROSTANOIDES

Introducción

Receptor	Distribución tisular	Efectos	Sistema de Transducción
DP	Plaquetas, músculo liso, SN (incluyendo el SNC)	Inhibición: agregación plaquetaria y liberación de neurotransmisores. Relajación del músculo liso e hiperalgesia.	↓ AMPc vía G _s
IP	Plaquetas, músculo liso arterial y nervios sensoriales aferentes	Inhibición: agregación plaquetaria e hiperalgesia. Relajación del músculo liso.	↓ AMPc vía G _s
FP	Cuerpo lúteo, riñón, músculo liso (útero y esfínter del iris)	Luteolisis (débil efecto en humanos) y contracción del músculo liso	↑ Ca ⁺² _i mediante el aumento del recambio de los polifosfoinositoles fosfato vía G _q
TP	Plaquetas, músculo liso (arterias venas, vías aéreas) riñón y células epiteliales.	Estimulación: agregación plaquetaria, filtración glomerular y secreción gastrointestinal. Contracción del músculo liso.	↑ Ca ⁺² _i mediante el aumento del recambio de los polifosfoinositoles fosfato vía G _q
EP EP ₁	Músculo liso (tracto gastrointestinal, útero vías pulmonares y vejiga).	Contracción del músculo liso	↑ Ca ⁺² _i por 2 mecanismos: -Movilización del Ca ⁺² _i por una vía independiente de la de los polifosfoinositoles -Activación de canales de Ca ⁺² que permite la entrada de Ca ⁺² extra celular
EP ₂	Músculo liso, células epiteliales, pulmón, mastocitos, nervios sensoriales aferentes riñón y leucocitos.	Relajación del músculo liso. Estimulación: secreción intestinal no ácida y nervios sensoriales. Inhibición de la secreción de los mastocitos.	↓ AMPc vía G _s
EP ₃	Músculo liso (vascular, tracto gastrointestinal, útero), adipocitos, SNA, SNC, células epiteliales, riñón y plaquetas.	Contracción del músculo liso. Inhibición: lipólisis, liberación de neurotransmisores, secreción ácida gastrointestinal y reabsorción renal de agua. Potencia la acción de los agentes agregantes	↓ AMPc vía G _i ↑ Ca ⁺² intracelular mediante el aumento del recambio de los polifosfoinositoles fosfato vía G _q
EP ₄	Músculo liso (venas, útero y vías pulmonares)	Relajación del músculo liso	↓ AMPc vía G _s

Tabla II: CLASIFICACION DE LOS RECEPTORES DE PROSTANOIDES.

Ref.: Coleman y col., 1994; Goetzl y col., 1995; Negishi y col., 1995.

2.3.- Catabolismo

El catabolismo de las PGs es rápido y activo. Una vez han actuado sobre los receptores de las membranas celulares se produce una captación altamente específica al interior de las células mediada por un transportador, seguida de dos pasos de inactivación principales:

- Una fase inicial rápida catalizada por las enzimas intracelulares específicas de PGs 15- hidroxiprostaglandina deshidrogenasa y Δ^{13} reductasa, obteniéndose el metabolito 13,14-dihidro-15-ceto-PG (Hansen, 1976). Este metabolito se acumula en la orina y su medida es una forma de cuantificar la producción de PGs.

Las enzimas citadas se encuentran en la mayoría de los tejidos, pero su actividad es máxima en pulmón, corteza renal, hígado y placenta. La localización estratégica de estas enzimas en el pulmón evita el paso de las PGs desde la circulación venosa a la arterial. PGE₂ y PGF_{2 α} se eliminan casi totalmente durante su paso por la circulación pulmonar (Cambell, 1993). Sin embargo la PGI₂ y el TXA₂ no son catabolizados en el pulmón, sino que se hidrolizan rápidamente en la sangre a 6-ceto PGF_{1 α} (Moncada y Vane, 1979) y TXB₂ (Hamberg y col., 1974) respectivamente.

- Una segunda fase lenta, a nivel hepático, catalizada por enzimas oxidantes de los ácidos grasos, determinando una ω -oxidación y una β -oxidación de las cadenas laterales.

3.- PROSTAGLANDINAS E INFLAMACION

En 1969 Willis descubrió que los exudados inflamatorios inducidos por carragenina contenían PGs y Piper y Vane demostraron la liberación de PGs en la anafilaxia (Piper y Vane, 1969). Todos estos experimentos condujeron a la detección de las PGs estables, principalmente de la serie E y predominando la PGE₂, en numerosos tipos de respuestas inflamatorias tanto en animales de experimentación, como en el hombre (Ferreira y Vane, 1979).

Posteriormente se demostró que los TXs y la PGI₂ también se generaban durante los procesos inflamatorios. Se detectó TXA₂ (en forma de TXB₂), PGI₂ (en forma de 6-oxo-PGF_{1α}) y PGE₂ en los exudados inflamatorios inducidos por carragenina así como PGI₂ en fluido sinovial humano (Higgs y col., 1981).

Inicialmente, la liberación de PGs está provocada por la agresión directa sobre los tejidos pero ésta se puede ver aumentada por la presencia de leucocitos. A nivel del foco inflamatorio, son los macrófagos los que sintetizan la mayor cantidad de PGs, aunque los neutrófilos y eosinófilos también las pueden sintetizar.

A pesar de que en las lesiones inflamatorias se han detectado todos los metabolitos de la COX, es la PGE₂ la que predomina en los procesos inflamatorios encontrándose desde en edemas de origen inflamatorio hasta en procesos de artritis crónica (Vane y Botting, 1995).

3.1.- Efectos a nivel vascular

Las PGs (las de la serie E y la PGI₂ principalmente) contribuyen a la aparición de los primeros síntomas de la inflamación gracias a su potente acción dilatadora sobre el músculo liso vascular. A parte de esta acción directa, las dos características que diferencian a las PGs del resto de los mediadores de la inflamación son su acción prolongada y su capacidad de contrarrestar los efectos vasoconstrictores de sustancias como la noradrenalina o la angiotensina. Estas propiedades hacen a las PGs responsables de la vasodilatación característica y el eritema observados en la inflamación aguda (Solomon y col., 1968).

Estudios *in vivo* mostraron que la administración de PGI₂ y PGE₂ incrementaban el flujo sanguíneo sin causar un aumento significativo de la exudación del plasma. Sin embargo, cuando se administraban conjuntamente con agentes que aumentaban la permeabilidad vascular tales como bradicinina o histamina, se producía un aumento notable de la exudación plasmática (Ferreira, 1972). Posteriormente se demostró que el aumento de la exudación del plasma era consecuencia del efecto vasodilatador ejercido por las PGs. Es decir, la vasodilatación eleva el flujo sanguíneo a través de los tejidos inflamados provocando un incremento de la extravasación del fluido (edema) causada por los agentes que potencian la permeabilidad vascular (Williams y Peck, 1977).

3.2.- Hiperalgnesia y fiebre

Ferreira descubrió que la administración subcutánea de PGs, bradicinina o histamina a dosis bajas no producía dolor, pero si la PGE₁ se administraba previamente a la histamina o la bradicinina sí producía una sensación dolorosa fuerte. Por otra parte, la mezcla de histamina y bradicinina resultó inactiva y la administración de una u otra antes de la administración de PGE₁ tampoco potenciaba la sensación dolorosa (Ferreira, 1972). Posteriormente se observó que todas las PGs de la serie E intensifican los efectos dolorosos producidos por la bradicinina (Moncada y col., 1974). Gracias a todas estas investigaciones se llegó a la conclusión de que las PGs no son mediadores del dolor *per se* sino que se caracterizan por sensibilizar las terminaciones nociceptivas sin producir dolor de forma directa; es decir, incrementan la intensidad y la duración de la sensación de dolor (hiperalgnesia) inducida por diferentes estímulos (calor, presión o distensión) o por potenciación en la acción de otros mediadores como bradicinina, histamina, etc.

La duración y la intensidad del efecto hiperalgésico no es el mismo para todas las PGs. Así, mientras que el efecto hiperalgésico de la PGE₂ es acumulativo y de larga duración, la PGI₂ induce dolor de manera inmediata pero de duración corta (Ferreira y col., 1978). También se ha observado que cada tipo de PGs potencia la sensación dolorosa de un determinado mediador inflamatorio. De este modo la sensación dolorosa que produce la bradicinina está inducida por la PGE₂, mientras que la producida por norepinefrina está mediada por la PGI₂ (Taiwo y col., 1988). Por otro lado en experiencias realizadas con

ratas a la que se les había administrado intradérmicamente a nivel plantar PGE₂, PGI₂, PGF_{2α}, PGD₂ y TXB₂, demostraron que la PGE₂ y la PGI₂ son las PGs con mayor efecto hiperalgésico ante estímulos de tipo mecánico (Taiwo y col., 1990).

Las PGs parecen desempeñar un papel importante en la génesis de la fiebre. La hipertermia aparece en un elevado número de procesos patológicos acompañando a la producción de pirógenos bacterianos o endógenos.

Estudios realizados en animales de experimentación han puesto de manifiesto que tras la inyección sistémica de lipopolisacáridos bacterianos (pirógenos exógenos) o IL-1 (pirógeno endógeno), la concentración de PGE₂ cerebral aumenta de forma paralela al incremento de temperatura (Sirko y col., 1989). Hasta el momento se supone que los lipopolisacáridos estimulan la secreción de IL-1 por parte de los macrófagos que activa a la PLA₂ (Stitt, 1986) e induce la COX-2 (Kenedy y col., 1993) a nivel cerebral, y de este modo se eleva la concentración de PGE₂ que a su vez actúa sobre el hipotálamo para desencadenar la fiebre.

3.3.- Función leucocitaria

A pesar de que en los exudados inflamatorios la concentración de PGs aumenta de forma paralela a la acumulación de leucocitos durante las primeras etapas de la inflamación, la síntesis de PGs no influye en la migración leucocitaria, ya que la administración de ácido acetil salicílico o indometacina a dosis capaces de inhibir la síntesis de PGs no reducen la migración leucocitaria en estos exudados (Salmon y col., 1983; Gómez y col., 1988).

En cambio, las PGs son capaces de inhibir la proliferación y la función de linfocitos, moderando así la respuesta inflamatoria inmune (Goodwin y col., 1977). Concretamente la PGE₂ impide la activación de los linfocitos T, reduciendo así su capacidad de producir linfocinas (Betz y Fox, 1991; Goetzl y col., 1995).

4.- LA CORNEA

La córnea es una estructura lenticular convexo-cóncava situada en la porción anterior del globo ocular, que posee la propiedad fundamental de ser transparente; esto permite, al tiempo que protege al globo ocular, que la luz penetre en su interior para estimular la capa sensible del ojo: la retina.

4.1.- Anatomía de la córnea

La córnea está formada por cinco capas que de fuera a dentro son: epitelio, capa de Bowman, sustancia propia o estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 4). En situación normal carece de vasos sanguíneos y linfáticos.

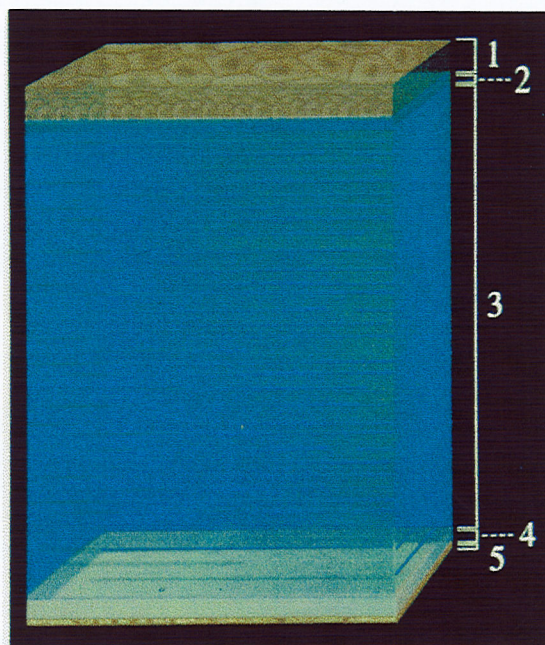


Figura 4: ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA CORNEA.

- 1: Epitelio
- 2: Membrana de Bowman.
- 3: Estroma.
- 4: Membrana de Descemet.
- 5: Endotelio.

4.1.1.- Epitelio

El epitelio corneal es un epitelio escamoso estratificado, que no está queratinizado, con una profundidad de 5 o 6 capas celulares que representan el 10% del espesor corneal. El epitelio está dividido morfológicamente en 3 capas:

- capa superficial o de células escamosas: constituyen dos capas celulares, observándose células epiteliales planas y fundamentalmente hexagonales unidas entre sí a través de

límites celulares rectos (Klyce y Beuerman, 1989). Además, existen uniones estrechas alrededor de todos los bordes laterales de cada célula, que ejercen una función de barrera anatómica al paso de sustancias al espacio intercelular.

-capa mediana o de células alares poligonales: tiene una profundidad de tres células y cuanto más superficial es la célula, más plano es su aspecto. Existe una intensa interdigitación de las células alares y alfombrillas de tonofilamentos que mantienen la forma celular.

-capa profunda o de células basales columnares: situadas en la capa más interna; se trata de células mitóticamente activas, y las células hijas producidas se desplazan anteriormente para transformarse en células alares y superficiales. Al igual que en la capa anterior, existen conjuntos de tonofilamentos para mantener la forma celular.

Las células epiteliales están interdigitadas y fuertemente unidas entre sí por numerosos desmosomas que proporcionan estabilidad mecánica a la capa epitelial. También existen uniones gap entre todas las células adyacentes en el epitelio, a través de las cuales pueden pasar pequeñas moléculas de una célula a otra (Arffa, 1992).

Bajo la capa basal de células epiteliales y producida por ellas, se encuentra una lámina o membrana basal. Esta lámina participa en la adherencia de las células epiteliales al estroma.

4.1.2.- Capa de Bowman

Es una zona acelular situada debajo del epitelio compuesta por fibrillas cortas de colágeno dispuestas al azar, que en las porciones más profundas se transforman gradualmente en el estroma regular. Juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad y en la defensa frente a agentes traumáticos e infecciosos. Por otro lado carece de capacidad regeneradora cuando se lesiona (Arffa, 1992).

4.1.3.- Estroma

El estroma constituye el 90% del espesor corneal. Es la capa intermedia de la córnea. Consta fundamentalmente de fibras de colágeno, células del estroma y sustancia fundamental que participa en el mantenimiento de la disposición regular de las fibras de

colágeno. El queratocito es la célula predominante. Se trata de una célula grande y plana que contiene el colágeno y la matriz extracelular del estroma. La disposición de forma regular de las fibras de colágeno garantiza la transparencia de la córnea

En el estroma se observa, además de los queratocitos, una pequeña cantidad de leucocitos polimorfonucleares, células plasmáticas y macrófagos que se localizan entre las láminas de las fibras de colágeno (Klyce y Beuerman, 1989).

4.1.4.- Membrana de Descemet

Se trata de una lámina basal gruesa que separa el estroma profundo del endotelio. Está considerada como el producto de la secreción de las células endoteliales. Posee cierta elasticidad y es la más resistente de las capas de la córnea, regenerándose con rapidez tras una lesión (Urdiain y Diaz-Flores, 1977).

4.1.5.- Endotelio

El endotelio es una capa única de células planas hexagonales que tapiza la membrana de Descemet. Su superficie interna está bañada por el humor acuoso. En el hombre esta capa celular tiene una capacidad de reproducción limitada. Por lo general, no existe actividad mitótica en el endotelio tras el nacimiento. Algunas células endoteliales mueren a lo largo de la vida, dando como resultado una disminución progresiva de la población de estas células con la edad. Cuando se produce una pérdida celular bien por la edad o bien por otra causa como traumatismo, inflamación o cirugía, las células vecinas cubren la zona que ha quedado vacía. Ello da como resultado un aumento del área celular y una disminución de la densidad celular. Las células endoteliales pueden conservar su función a pesar del enorme incremento de tamaño (Waltman y Hart, 1988).

Estas células presentan una actividad metabólica elevada, como indican la presencia de numerosas mitocondrias, retículos endoplásmicos lisos y rugosos, un aparato de Golgi bien desarrollado y ribosomas libres. Eventualmente se pueden observar microvellosidades, que suelen apuntar algún estado patológico. Las células endoteliales se unen lateralmente mediante zónulas ocludens, adherens y desmosomas. Hay alguna resistencia al paso de intercelular de sustancias debido a la complicada interdigitación de los bordes celulares,

que incrementa la distancia que deben recorrer las sustancias, y a las uniones celulares oclusivas localizadas, pero esto no impide la penetración de moléculas grandes (Klycer y Beurman, 1989).

La función principal de las células del endotelio es el transporte de sustancias osmóticamente activas, así como la síntesis de algunos componentes de la membrana de Descemet.

4.2.- Inervación

La córnea presenta una abundante inervación sensitiva, que se efectúa a través de los nervios ciliares procedentes de la rama oftálmica del trigémino. Estas fibras discurren entre la esclera y la coroides, ramificándose en la parte externa de la misma; se dirigen hacia el cuerpo ciliar y algunas se distribuyen por la esclera, aunque la mayor parte abordan la córnea en el tercio medio periférico como ramas mielínicas, la mayoría de ellas pierden la mielina después de penetrar 2 o 3 mm. Ya en la córnea, las fibras amielínicas se ramifican a través del estroma. En la membrana de Bowman, se distribuyen formando un plexo del que parten ramas que se sitúan en el epitelio, concretamente por debajo de la membrana basal. Las fibras simpáticas también inervan la córnea, aunque su función no está clara. Sus axones los transporta el nervio trigémino pasando junto con las fibras sensoriales al epitelio corneal (Arffa, 1992).

La córnea es uno de los tejidos más sensibles del cuerpo y esta sensibilidad sirve para protegerla. La sensibilidad corneal es mucho mayor en el centro que en la periferia, y mucho más en el área exterior que en la conjuntiva. El dolor parece ser la única sensación que perciben los nervios corneales.

4.3.- Fisiología de la córnea

4.3.1.- Metabolismo corneal

Las células epiteliales, queratocitos y células endoteliales son metabólicamente activas y requieren nutrientes para desarrollar su función. Debido a que la córnea es una estructura avascular, el aporte nutritivo corneal se efectúa desde el humor acuoso y desde la fina película lagrimal que mantiene húmeda la córnea. Además, la zona periférica de la córnea

también recibe nutrientes, en pequeñas cantidades, a partir de las ramas terminales de los vasos que irrigan el limbo esclero-corneal.

De los componentes nutritivos, los más importantes para el metabolismo de la córnea son la glucosa y el oxígeno. Tras numerosos estudios se ha podido comprobar que la córnea obtiene glucosa principalmente del humor acuoso y sólo un 10% o menos de la misma procede de los vasos límbicos o de las lágrimas. La glucosa puede ser almacenada en el epitelio como glucógeno, que puede mobilizarse en caso de que el aporte de glucosa libre sea insuficiente (por ejemplo en caso de hipoxia o traumatismo). Casi todo el oxígeno que obtiene la córnea se consume en el epitelio y en el endotelio. El epitelio obtiene el oxígeno de los capilares en el limbo y por difusión desde la película lagrimal, mientras que la necesidad endotelial de oxígeno la satisface el humor acuoso (Stanifer y col., 1983; Fatt y Weissman, 1992).

4.3.2.- Control de la hidratación del estroma

El control de la hidratación del estroma es fundamental para la transparencia. El agua constituye aproximadamente el 75-80% del peso de la córnea, cantidad superior a la encontrada en el tejido conectivo de cualquier otra parte del organismo. Si la hidratación aumenta demasiado el espesor del estroma puede duplicarse, manifestándose una marcada pérdida de transparencia. Los mecanismos que desempeñan algún papel en la regulación de la hidratación corneal son: la función de barrera del epitelio y el endotelio, la presión de hinchado del estroma, el transporte iónico por el epitelio y el endotelio, la presión intraocular y la evaporación de agua desde la superficie corneal.

a) Función de barrera del epitelio y del endotelio

El epitelio y el endotelio actúan como barreras frente al movimiento de agua e iones en el estroma. La mayor resistencia a la difusión de los electrolitos se observa en el epitelio, fundamentalmente en las capas superficiales (Mishima y Hedbys, 1967). Las membranas externas de las células epiteliales son relativamente impermeables al paso de iones. Además las células epiteliales están conectadas a las células circundantes



mediante uniones estrechas que también impiden el flujo de iones (Marshall y Klyce, 1983).

Sin embargo, el endotelio es 200 veces más permeable a los electrolitos que el epitelio, pero aún es 10 veces más resistente que el estroma. La resistencia al paso intercelular de iones está producida por la interdigitación de los bordes celulares y por las uniones celulares oclusivas localizadas (Fatt y Weissman, 1992).

b) Presión de hinchado del estroma

Si se elimina el epitelio y el endotelio, el estroma se hinchará alrededor del doble de su espesor normal como consecuencia de la absorción de agua por la sustancia fundamental del estroma. La presión de hinchado del estroma es de 50-60 mm Hg con su espesor normal y disminuye exponencialmente a medida que se hincha. Por tanto, con un espesor normal, la presión de hinchado debe estar contrarrestada por una fuerza que haga salir el agua del estroma (Arffa, 1992).

c) Transporte iónico por el epitelio y el endotelio

Se sabe que el endotelio es el responsable de la deshidratación activa de la córnea. Para ello el endotelio ha desarrollado un mecanismo de transporte activo de iones desde el estroma al humor acuoso, con un movimiento secundario pasivo de agua. De este modo el endotelio transporta activamente bicarbonato y sodio creando un gradiente osmótico que equilibra la presión de hinchado del estroma corneal (Fischbarg y col., 1985).

También existe transporte iónico en el epitelio corneal, aunque el papel que desempeña es mucho menor. El epitelio secreta cloruro a las lágrimas por transporte activo; esta secreción se regula mediante un receptor β -adrenérgico y está mediado intracelularmente por la adenilato ciclasa (Stanifer y col., 1983; Arffa, 1992).

d) Presión intraocular

En el ojo, la PIO tiene un ligero efecto sobre el espesor del estroma. Sin embargo, cuando la PIO supera la presión de hinchado del estroma, aparece un edema epitelial. Así, en una córnea normal aparece un edema epitelial cuando la PIO supera los 55 mm de Hg. El mecanismo de este proceso todavía no se ha establecido pero parece ser que está relacionado con las láminas anteriores del estroma que soportan el estrés de la PIO (McPhee y col., 1985; Arffa, 1992).

e) Evaporación de agua desde la superficie corneal

En 1956 Von Bahr fue el primero en darse cuenta de la evaporación de agua desde la película lagrimal precorneal y superficie corneal anterior. La evaporación de agua desde la película lagrimal precorneal produce una hipertonicidad de las lágrimas, y extrae agua de las células epiteliales y más tarde del estroma. Esta hipertonicidad de la película corneal contribuye al mantenimiento del estado relativo de deshidratación de la córnea (Mishima y Maurice, 1961).

4.4.- Inflamación corneal

La córnea es un tejido avascular que tiene tres funciones principales: protección, refracción y transmisión de imágenes. Cuando el epitelio corneal está intacto, la córnea no es accesible ni a patógenos microbianos ni a moléculas extrañas, pero cuando éste es dañado se hace muy permeable. Un proceso inflamatorio puede ser crucial, ya que el edema corneal es consecuencia de un daño en el epitelio o endotelio corneal, los cuales regulan la hidratación corneal mediante un mecanismo de transporte iónico que se opone a la absorción pasiva a partir de los fluidos procedentes de la película lagrimal y humor acuoso. Una hidratación excesiva de la cornea y subsecuente hinchamiento conduce a la opacidad de la misma (Arffa, 1992).

Los fenómenos inflamatorios en la córnea son similares a los de los otros tejidos, con la particularidad de que en el ojo no hay vasos en la córnea y los fenómenos vasculares de la inflamación corneal ocurren en los vasos situados en el limbo esclero corneal y en el iris.

Los signos de inflamación corneal se producen en el segmento anterior y en la propia córnea.

La respuesta inflamatoria en el segmento anterior se produce por la estimulación de las terminaciones nerviosas sensitivas y la liberación de mediadores químicos de la inflamación, que provocan en mayor o menor medida contracción del músculo liso, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y ruptura de la barrera hematoacuosa. El conjunto de todos estos signos se traduce en la aparición de hiperemia de los vasos del limbo, miosis y presencia de células en la cámara anterior.

Los signos de la inflamación en la córnea dependen de la presencia de edema e infiltrado inflamatorio y de la lesión tisular. Consisten en grados variables de pérdida de transparencia, originada por la aparición de edema, infiltración, necrosis, fibrosis y neoformación de vasos en la córnea, mayor hidratación y pérdida de epitelio (erosión), de estroma (adelgazamiento) y pérdida combinada de epitelio y estroma (úlceras) (Carreras y col., 1995).

Es probable que una abrasión de la córnea o cualquier condición que lleve a la pérdida del **epitelio** produzca áreas de tumefacción y turbidez corneales. Afortunadamente, el epitelio corneal se regenera rápidamente y normalmente la hidratación excesiva de la córnea es leve y transitoria (Waltman y Hart, 1988). En respuesta a la lesión del **estroma** los queratocitos emigran a la zona de la herida y se transforman en fibroblastos. Estas células contribuyen a los procesos cicatriciales reparadores mediante la proliferación y formación de colágeno (Arffa, 1992). Cuando el proceso ulcerativo alcanza las capas profundas de la córnea, se detiene en la **membrana de Descemet**, membrana muy resistente a los enzimas proteolíticos liberadas en las reacciones inflamatorias aunque tiene poca resistencia mecánica. El empuje de la presión del humor acuoso provoca que la membrana haga prominencia hacia fuera y se origina lo que se denomina un descemetocele. Los descemetocelos pueden romperse por pequeños traumatismos y dar lugar a una perforación corneal (Carreras y col., 1995). Cuando tras una lesión se produce una pérdida de **células endoteliales**, las células vecinas cubren la zona que ha quedado vacía, dando como resultado un aumento del área celular y una disminución de la densidad celular. Las células endoteliales pueden conservar su función a pesar de su enorme aumento de tamaño, pero si

la destrucción de esta capa es muy extensa se produce una hidratación corneal excesiva que conlleva a una tumefacción y pérdida de transparencia muy marcadas y algunas veces permanente (Waltman y Hart, 1988)

Los procesos cicatriciales reparadores no producen colágeno estromal ordenado por lo que se producen pérdidas de transparencia permanentes, a veces acompañadas de neovascularización. Esta vascularización de la córnea se considera un mecanismo de defensa, por medio de la cual la córnea trata de eliminar influencias tóxicas.

Las inflamaciones corneales son enfermedades graves porque constituyen una amenaza para la visión, ya que producen alteraciones en la transparencia y en la curvatura corneal y por las posibles complicaciones derivadas de la perforación del globo ocular como hipotonía, glaucoma o cataratas.

4.4.1.- Metabolitos de la ciclooxigenasa implicados en la inflamación corneal

Durante los últimos años una parte de la investigación oftalmológica se ha centrado en estudiar en qué medida los metabolitos derivados de la COX participan en la respuesta inflamatoria corneal. Entre los numerosos cambios bioquímicos que acontecen en un proceso inflamatorio de este tipo, uno de ellos es la formación de diversos mediadores inflamatorios. Entre ellos, los metabolitos de la COX están considerados unos de los mediadores más importantes.

Se ha documentado la síntesis a nivel ocular de todos los derivados del AA por la vía de la COX. Las cantidades sintetizadas no están en función únicamente del tipo de tejido, sino que también dependen de la especie animal. La úvea y la conjuntiva son los tejidos oculares en los que tienen lugar la síntesis de la mayor cantidad de PGs (tabla III).

La retina, el cristalino y la córnea también son capaces de sintetizar derivados de la COX. Sin embargo estos tejidos poseen una actividad enzimática mucho más baja que la conjuntiva y la úvea anterior (Kulkarni, 1990). Hay que destacar que los metabolitos de la COX en la córnea difieren de unas capas a otras: los metabolitos mayoritarios del epitelio son la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y la PGE_2 . El estroma, que es la capa con mayor metabolismo, forma PGI_2 y TXA_2 . Y el endotelio produce $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 y PGD_2 (Bazan, 1985a).

Especies	% Metabolitos de la COX	
	Conjuntiva	Uvea anterior
Conejo albino	47 ± 1	35,1 ± 0,7
Perro	5,3 ± 0,3	13,2 ± 1,2
Gato	13,7 ± 0,2	48,5 ± 3
Vaca	N.I.	3,6 ± 0,2
Hombre	N.I.	26,9 ± 0,5
Hurón	10,8 ± 0,2	N.I.
Mono	24,3 ± 4,2	2,1 ± 0,7

Tabla III: METABOLITOS DE LA COX EN CONJUNTIVA Y UVEA ANTERIOR DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES (Kulkarni, 1990).

La mayor evidencia de que las PGs son agentes proinflamatorios oculares procede de experimentos realizados en conejos. Las PGs aparecen en el humor acuoso de conejos después de una paracentesis, una lesión térmica o mecánica y al mismo tiempo se observa un aumento de la PIO y un aumento de la concentración de proteínas en el humor acuoso (Bhattacharjee, 1989). Sin embargo en primates la respuesta a la paracentesis es de menor magnitud (Kass y col., 1975).

Por otra parte, durante la uveítis inducida por endotoxina, el aumento de los niveles de PGs en el humor acuoso coincide con el momento del pico de la reacción inflamatoria (Bhattacharjee, 1975). Eakins y col. (1972 a,b) también observaron lo mismo en conejos con una inflamación de tipo inmunogénica y en humanos con una uveítis anterior aguda.

Las PGs están fundamentalmente implicados en la **vasodilatación** y en **el aumento de permeabilidad vascular**, lo cual explica la inyección ciliar y el incremento de las proteínas y macromoléculas en el humor acuoso. Las principales PGs que intervienen en estas acciones son la PGI₂, PGE₂ y PGF_{2α} (Bhattacharjee, 1989). Por otro lado, la PGE₁ y la PGE₂ poseen un efecto inhibitor sobre el quimiotactismo y la fagocitosis de los neutrófilos y macrófagos. Ninguna de las PGs estudiadas hasta el momento han sido capaces de producir **miosis** en humanos (Alió y col., 1995) y en conejos (Bhattacharjee,

1989). Sin embargo en otras especies animales, como el gato, la aplicación tópica de PGE₂ y PGF_{2α} produce miosis (Bito y col., 1989).

Las PGs ejercen un papel destacado en la **rotura de la barrera hemato-acuosa**. Se sabe que el aumento de la liberación de la PGE₂ en el humor acuoso está relacionado con la ruptura de la barrera hemato-acuosa (Bhattacharjee, 1989). La principal fuente de PGs en el humor acuoso es el cuerpo ciliar, el cual es capaz de sintetizar una gran variedad de metabolitos del ácido AA, aunque en algunas situaciones la córnea o el cristalino pueden contribuir a la cantidad total de estos metabolitos encontrados en el humor acuoso (Bazan, 1989).

También hay que destacar que en especies superiores como el mono o el hombre, la aplicación tópica a dosis bajas de PGE₂ y PGF_{2α} produce una disminución de la **PIO** sin causar inflamación ocular. Pero el tratamiento prolongado con PGF_{2α} provoca hiperemia en la conjuntiva y aumenta la sensibilidad de los tejidos corneales en el hombre (Bito, 1987). Por tanto se puede decir que las PGs poseen acción hipotensora ocular dependiendo de la dosis y de la especie.

La producción de PGs por parte de **la córnea** ante una inflamación depende tanto del tipo de estímulo que produce la lesión como de la capa de la córnea afectada.

En estudios realizados en conejos se ha encontrado que las diferentes capas de la córnea sintetizan PGs de forma progresiva. Así tras una lesión criogénica, el epitelio y el estroma son las primeras capas que aumentan la síntesis de PGs. La respuesta del epitelio es rápida pero de corta duración ya que a los 5 días de la lesión, los niveles de PGs epiteliales vuelven a alcanzar los valores fisiológicos normales. El estroma responde con la misma rapidez que el epitelio pero su respuesta es más duradera, ya que a los 15 días después de la lesión los niveles de PGs estromales todavía se mantienen elevados. Por último, el endotelio responde más lentamente que las capas anteriores. En esta capa el incremento de la síntesis empieza a ser manifiesto 5 días después de la lesión, pero al igual que el estroma la respuesta es sostenida (Bazan y col., 1985a).

Por otra parte, como hemos citado anteriormente, el tipo de PGs producido también depende de la naturaleza del estímulo lesivo. Por ejemplo, mientras que en una lesión

criogénica las PGs mayoritarias originadas son la PGF_{2α} y la PGE₂ (Bazan, 1989); después de una infección por herpes virus se generan fundamentalmente PGI₂, PGF_{2α} y TXA₂.

Actualmente se sabe que las PGs participan en la formación del edema y la neovascularización corneal. Mediante estudios farmacológicos realizados tanto en conejos como en ratas, se demostró que la administración tópica de fármacos inhibidores específicos del enzima COX durante el proceso inflamatorio disminuían los síntomas del edema y reducían el período de neovascularización de la córnea (Verbey y col., 1988; Haynes y col., 1989).

4.5.- Efectos de la PGE₂ sobre el endotelio corneal

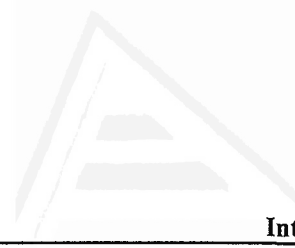
En los últimos años se ha demostrado que la PGE₂ afecta a la función del endotelio corneal tanto en condiciones normales como patológicas.

Cuando las células endoteliales se aíslan y se mantienen en cultivo se ha demostrado que la PGE₂ es el metabolito del AA que se sintetiza en mayor cantidad (Neufeld y col., 1986; Gerristen y col., 1989; Jumblatt, 1994) aunque *in vivo* los niveles de PGE₂ sintetizados por estas células son mucho más bajos (Bazan y col., 1985b; Bazan, 1987).

Los estudios farmacológicos realizados por Jumblatt y Paterson han permitido identificar en células endoteliales de conejo un receptor específico de PGE₂ del subtipo EP₂ acoplado a la producción de AMPc (Jumblatt y Paterson, 1991; Jumblatt, 1994). Otros estudios realizados en tejidos oculares porcinos también han evidenciado la existencia de un receptor EP₂ en estas células (Zhao y Sichi, 1995).

Las acciones fisiológicas de la PGE₂ no están totalmente definidas. Estudios realizados con células en cultivo revelaron que la PGE₂ ayuda a mantener la forma hexagonal característica de este tipo celular (Neufeld y col., 1986; Jumblatt, 1994). También ha sido observado que la PGE₂ es un factor autocrino que modula el crecimiento y la diferenciación celular, comportándose como un inhibidor de la mitosis (Jumblatt, 1994).

Por otra parte, se supone que la PGE₂ debe afectar a los procesos de cicatrización corneal *in vivo*, ya que se ha descrito un aumento de la concentración de PGE₂ en las células endoteliales después de una lesión criogénica (Bazan y col., 1985a) y en el humor acuoso tras diversos tipos de lesión corneal (Bazan, 1987; Skorpik y col., 1987).



De la misma forma que en el ojo la PGE₂ media la ruptura de la barrera hemato-acuosa, en el endotelio media la ruptura de las uniones existentes entre las células que forman la capa del endotelio, produciendo de este modo un aumento de la capacidad de migración celular a la zona endotelial dañada y una concomitante disminución de la capacidad de expansión que poseen estas células (Joyce y col., 1995).

En los últimos estudios *in vitro* realizados con el objeto de poder establecer el papel que desempeña la PGE₂ durante la lesión corneal y los posteriores procesos de cicatrización, muestran que tras una lesión las células del endotelio corneal responden aumentando la producción de PGE₂ (Jumblatt y Willer, 1996). Este incremento se debe a la estimulación de la PLA₂, la PLC (Jumblatt y col., 1996) y de la COX-2 (Jumblatt y Willer, 1996) presentes en las células endoteliales.



5.- FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS

En el intento de controlar y tratar la inflamación podemos utilizar dos tipos de fármacos antiinflamatorios, los antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides) y los antiinflamatorios no esteroideos (AINES). A pesar de que presentan mecanismos de acción diferentes, el efecto de todos estos fármacos se produce mediante la inhibición de la síntesis de PGs. Los esteroideos son los antiinflamatorios más potentes y con mayor aplicación clínica, pero no están libres de complicaciones. Los AINES muestran menos efectos secundarios, pero su actividad antiinflamatoria es menor con respecto a los anteriores.

5.1.-Glucocorticoides

La acción de los glucocorticoides depende de su unión con receptores situados en el citoplasma celular. Estos receptores son miembros de una gran familia de receptores citosólicos que incluye también a los receptores de otras hormonas esteroideas, como la progesterona y los estrógenos, de la hormona tiroidea, del ácido retinoico y de la vitamina D (Evans, 1988). La mayoría de las células expresan receptores de glucocorticoides aunque la densidad de los receptores puede diferir de una célula a otra (Barnes y Adcock, 1993).

Como consecuencia de la unión se producen cambios conformacionales en la proteína receptora que incrementan su afinidad por los sitios aceptores de la cromatina nuclear; ello provoca un proceso de translocación hacia el núcleo. La unión del complejo glucocorticoide-receptor al ADN en el núcleo celular provoca un incremento o un descenso de la transcripción del material genético (Barnes y Adcock, 1993).

Gran parte de las acciones antiinflamatorias de los glucocorticoides se basan en la interferencia de la actividad enzimática de la PLA₂. Cuando el complejo glucocorticoide-receptor se une a un lugar específico en el ADN, induce la síntesis de unas proteínas denominadas **lipocortinas**. Estas proteínas actúan como antifosfolipasas, ya que poseen la capacidad de unirse los fosfolípidos de membrana aniónicos en presencia de calcio bloqueando de este modo el acceso de la PLA₂ a su sustrato. De este modo se impide la liberación del AA y por consiguiente la formación de sus derivados tales como PGs, LTs y PAF (Davidson y Dennis, 1989). De todas formas existen algunos tipos de células que no

forman lipocortinas como respuesta a los glucocorticoides (Barnes y Adcock, 1993; Flower y Rothwell, 1994).

Por otro lado, otros efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides se deben a su efecto inhibitor sobre la transcripción de enzimas implicadas en el proceso de formación de mediadores lipídicos. Los glucocorticoides inhiben la transcripción del gen que codifica la PLA_{2c} inducida por citocinas (Schalkwijk y col., 1991). Estudios realizados en monocitos también han desvelado el papel inhibitor de los glucocorticoides sobre la expresión de la COX-2 inducida por lipopolisacáridos bacterianos o citocinas (Fu y col., 1990; O'Banion y col., 1992) que conlleva a una disminución de la síntesis de PGs.

También son capaces de inhibir la transcripción de los genes que codifican mediadores relevantes en los procesos inflamatorios crónicos tales como: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 y TNF α (Barnes y Adcock, 1993).

Los glucocorticoides mejoran notablemente los signos y síntomas de las inflamaciones y en este momento constituyen la terapéutica más eficaz frente a la mayoría de las inflamaciones oculares. Los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides son inespecíficos y no afectan a la causa de cualquier proceso ocular, proporcionando una protección temporal a los tejidos implicados, pero usados adecuadamente pueden controlar los efectos dañinos de la inflamación ocular y constituir la diferencia entre la preservación de la visión y su pérdida (Carreras y Jordano, 1995).

A parte del potente efecto antiinflamatorio, los glucocorticoides producen efectos no deseados en el organismo. Por eso a nivel ocular, cuando la formulación del fármaco y la patología lo permitan, se usará la vía tópica (Tabla IV) de forma que se reduzca su capacidad de difusión con el fin de circunscribir su acción al nivel local y restringir la acción sistémica. En cualquier caso la aplicación tópica a nivel ocular causa numerosos efectos secundarios:

- Alteraciones musculares: ptosis, midriasis moderada, alteraciones en la acomodación.
- Retraso de la epitelización y cicatrización de las heridas.
- Disminución de la resistencia a la infección.
- Elevación de la PIO y glaucoma de ángulo abierto en individuos predispuestos.
- Cataratas.

Débiles	Medroxiprogesterona 1%
Intermedios	Hidrocortisona 1%
	Fluormetolona 0,1%
	Fluorcinolona 0,025%
	Fluormetolona 0,25 %
	Clobetasona 0,1%
Potentes	Clobetasona 0,5%
	Fluormetolona acetato 0,25%
	Dexametasona 0,1%
	Betametasona 0,1%
	Prednisona 0,1%
	Prednisolona 1%

Tabla IV: GLUCOCORTICOIDES DISPONIBLES POR VIA TOPICA
(Carreras y Jordano, 1995)

5.2. AINES

Otra posible alternativa al tratamiento de la inflamación son los AINES. Su mecanismo de acción se fundamenta en la inhibición de la actividad de la COX, por consiguiente impiden la producción de PGs, PGI₂ y TXs (Vane y Botting, 1987). Son menos potentes como antiinflamatorios que los glucocorticoides pero presentan menos complicaciones locales que estos. Además de su acción antiinflamatoria son analgésicos y antitérmicos.

Es preciso destacar que tras la identificación de la COX-2, COX inducible (Simmons y col., 1989) cuya actividad está ligada fundamentalmente a estímulos de tipo inflamatorio como se describió en el apartado 1.2. de esta misma sección, no han cesado los intentos por conseguir inhibidores selectivos de la misma (Gans y col., 1990; Hirschelmann y col., 1991; Bendele y col., 1992; Futaki y col., 1993; Mansferrer y col., 1994 (a); Oullet y Percival, 1995).

Pero por el momento todos los AINES utilizados en terapéutica inhiben tanto la actividad COX-1 como la COX-2. Esto significa que los AINES actuales bloquean tanto la

producción de PGs proinflamatorias (vía COX-2) como la producción fisiológica de las mismas en órganos tales como el estómago o el riñón (vía COX-1). El desarrollo y uso de AINES selectivos frente a la COX-2 podría eliminar las reacciones adversas asociadas a la inhibición de la COX-1 a la vez que proporcionaría la acción antiinflamatoria (acción terapéutica) deseada derivada de la inhibición de la COX-2.

El mecanismo molecular por el que los AINES inhiben la actividad de la COX no es idéntica sino que difiere entre sí. Por ejemplo en el caso del ácido acetil salicílico se produce una acetilación irreversible del enzima, mientras que indometacina, meclofenamato y flurbiprofeno también provocan una inhibición irreversible pero sin modificación covalente del enzima. Sin embargo, otros AINES como ibuprofeno, ácido flufenámico y sulindaco son inhibidores reversibles que compiten con el AA por los sitios de unión al enzima (Smith, 1989; Mitchell y col. 1994).

Al igual que ocurría en el caso de los glucocorticoides, para evitar la aparición de los efectos indeseables en su aplicación por vía general en la terapéutica antiinflamatoria oftalmológica, así como para mejorar su penetración podemos recurrir a la administración de AINES por vía tópica. De todas formas una cantidad significativa de los mismos alcanza la circulación general tras su administración tópica por medio de su absorción por el sistema de excreción lacrimonasal (Flach, 1992).

En la actualidad disponemos de tres diferentes AINES en forma tópica para su administración a nivel ocular en forma de colirio:

- Diclofenac sódico 0,1%
- Ibuprofeno 0,03%
- Indometacina 1%

La toxicidad más frecuente que originan por vía tópica es la aparición de hiperemia, picor y sensación de quemazón tras su instilación. La aparición de reacciones alérgicas y de hipersensibilidad se han presentado con todos ellos (Ruiz-Moreno y Alió, 1995).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

OBJETIVOS

Debido a que el endotelio corneal está desprovisto de elementos vasculares y neurales, se suponía que los mediadores que intervenían en los procesos inflamatorios y reparadores del mismo llegaban a través del humor acuoso o se producían en los tejidos adyacentes. Sin embargo, una vez demostrado que las células de este tejido son capaces de sintetizar *per se* factores de crecimiento o mediadores inflamatorios, las investigaciones de estos últimos años se han encaminado a intentar dilucidar los posibles factores y mecanismos que intervienen en la producción de los mismos. Así pues, el objetivo general de la presente memoria está orientado al estudio de la síntesis de PGE₂ por las células del endotelio corneal bovino en cultivo, para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Estudio de la acción de diferentes agentes estimulante de naturaleza diversa sobre la síntesis de PGE₂.
- 2.- Modulación de la síntesis de PGE₂ por fármacos antiinflamatorios que impiden la síntesis de la misma.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

MATERIAL Y METODOS

1.- CULTIVO DE LAS CELULAS DEL ENDOTELIO CORNEAL

1.1.- Cultivos primarios

En la realización del presente trabajo se utilizaron cultivos primarios en monocapa de células endoteliales corneales bovinas (CECB). Para el aislamiento de las CECB se utilizaron de 18 a 24 ojos de reses bovinas recién sacrificadas en el matadero Municipal de Alicante. El transporte de los ojos desde el matadero al laboratorio se llevó a cabo en menos de una hora en un frasco de vidrio estéril sumergido en hielo.

Las células se obtuvieron con algunas modificaciones siguiendo el método propuesto MacCallum y col. (1982). En primer lugar se lavaron los ojos con un tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS) estéril que contenía 200UI/ml de penicilina, 50µg/ml de gentamicina y 2,5µg/ml de amfotericina B. Se fijó el globo ocular con la ayuda de dos pinzas sobre una placa Petri. Se hizo una incisión perforante en la córnea con una hoja de bisturí y se cortó un botón corneal. Este se depositó con la cara endotelial hacia arriba en una de las cavidades de un estuche de lentillas estéril. Seguidamente se cubrió la superficie endotelial con 100µl de una solución de tripsina-EDTA (tripsina (1:250) al 0,05% y ácido etilendiamintetracético (EDTA) 0,54mM), incubándose durante 15 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se paró la acción de la tripsina añadiendo un volumen igual al de la solución tripsina-EDTA de medio completo. Este medio completo (medio A) contenía una mezcla de medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado con 3,7g/l de NaHCO₃, más el medio nutriente HAM-F12 (v/v) complementada con un 20% de suero fetal bovino (desactivado previamente a 60°C durante 40 minutos), 50µg/ml de gentamicina y 2,5µg/ml de amfotericina B. A continuación se raspó suavemente la superficie endotelial con ayuda de un raspador metálico. Las CECB se obtuvieron entonces aspirando con una micro-pipeta y finalmente se depositaron en 2 ml de medio completo en uno de los pocillos de una placa de cultivo de 6 pocillos. En cada pocillo se sembraron las CECB extraídas de una única córnea (Figura 5).

Las CECB se mantuvieron en un incubador (BB16; Heraeus, Alemania) a 37°C, bajo una atmósfera húmeda que contenía un 5% de CO₂, hasta que alcanzaron la confluencia (aproximadamente 10 días). Durante este tiempo se hicieron cambios de medio cada 2 días utilizando, en este caso, medio completo con un 10% de suero fetal bovino (medio B).

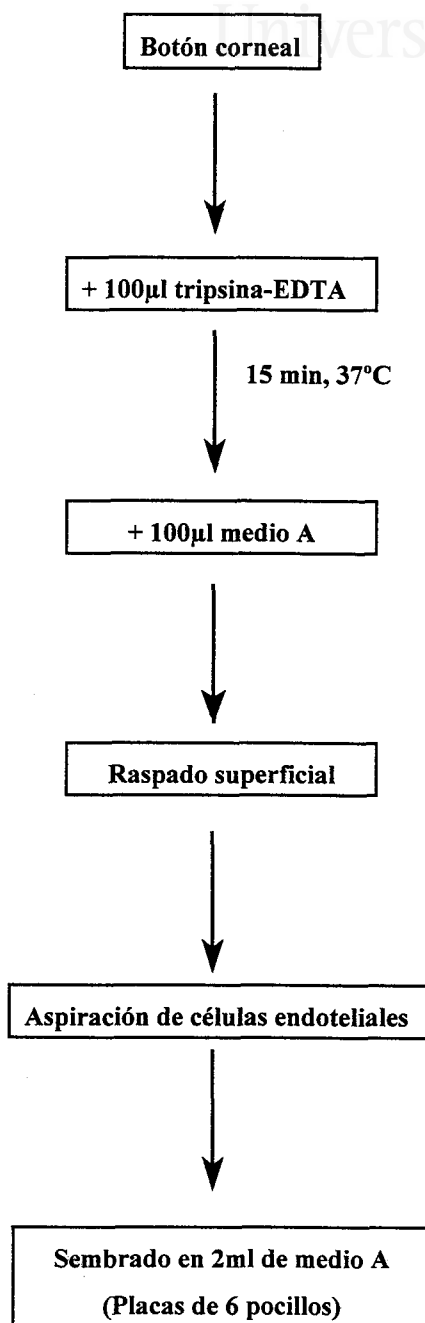


Figura 5: PROTOCOLO DE CULTIVO DE CELULAS DEL ENDOTELIO CORNEAL BOVINO

1.2.- Subcultivos

Una vez alcanzada la confluencia las CECB se subcultivaron. Primero se lavaron las células con una solución de PBS estéril y luego se incubaron con 1 ml de una solución de tripsina-EDTA a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se detuvo la acción de la tripsina añadiendo 1 ml de medio B. Las células se despegaron de los pocillos con ayuda de un raspador estéril de plástico. Una vez despegadas se centrifugaron (centrífuga GS-6 Beckman) suavemente a 200 xg durante 10 minutos y el precipitado celular se resuspendió en 3 ml de medio B.

La viabilidad de las células, generalmente superior al 90%, se determinó tomando una alícuota de la suspensión final y mezclándola a igual volumen con una solución al 0,04% de azul tripán. El rendimiento medio de esta preparación celular fue de 3 a 5 millones de células.

A continuación la suspensión celular se diluyó hasta 120.000-150.000 células por ml de medio B, dependiendo del número total de células obtenido. Una vez diluida la suspensión celular, se sembró en placas de 24 pocillos a razón de 120.000-150.000 células/pocillo (Figura 6). Las placas se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación que las placas del cultivo primario hasta que las células volvieran a alcanzar la confluencia (aproximadamente 8 días), momento en el que se utilizaron para la realización de los experimentos.

En todos los experimentos se utilizaron células confluentes con un único pase de tripsina.

La confluencia la definimos como el momento a partir del cuál las células cubren toda la superficie de los pocillos de una placa.

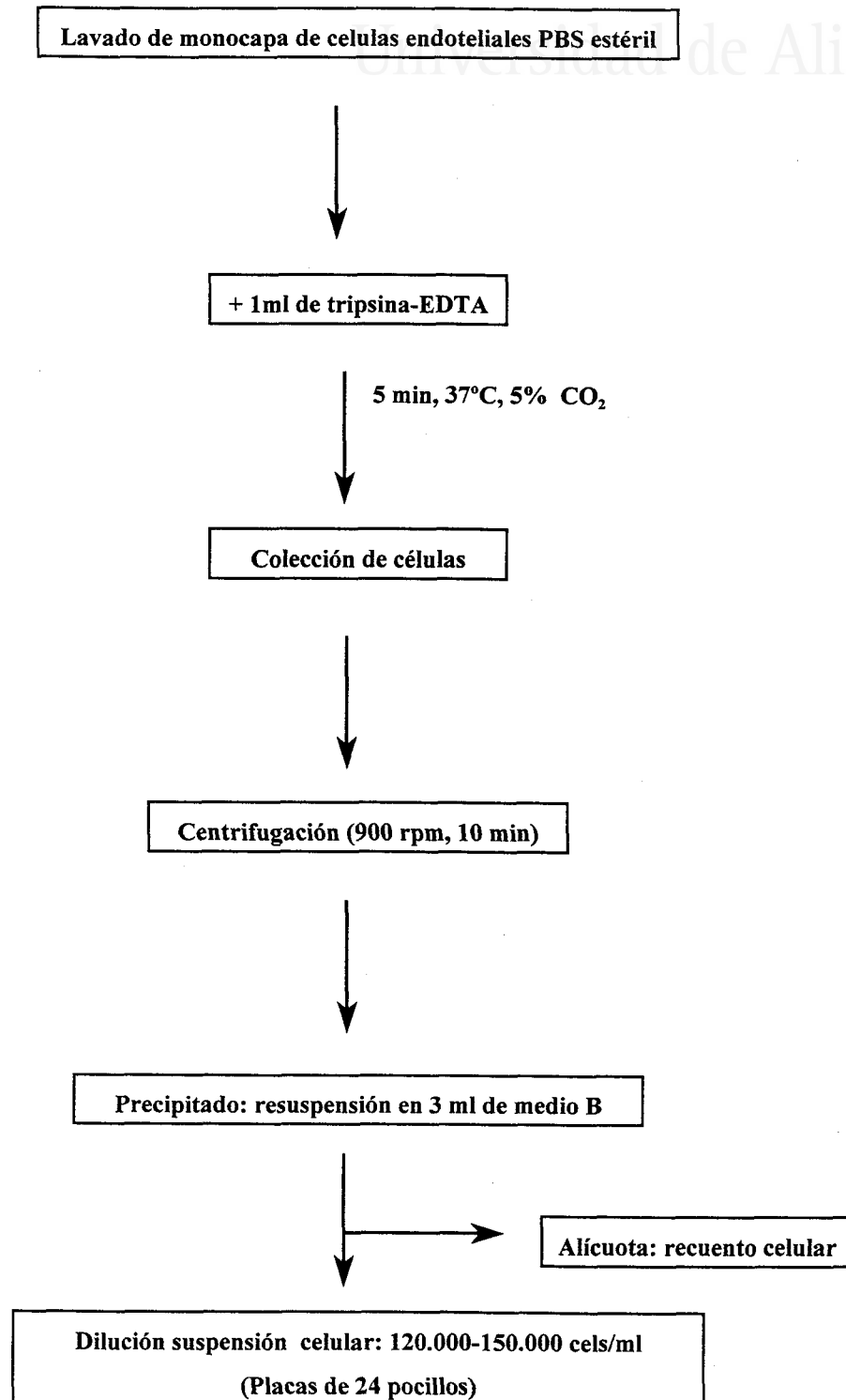


Figura 6: PROTOCOLO DE SUBCULTIVO DE CELULAS DE ENDOTELIO CORNEAL BOVINO

2.- SÍNTESIS DE PGE₂ POR LAS CELULAS DE ENDOTELIO CORNEAL BOVINO

2.1.- Síntesis de PGE₂ en condiciones basales

El objetivo fue determinar el curso temporal de la síntesis basal de PGE₂ con el fin de definir el tiempo óptimo para estudios posteriores.

Para ello las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ (estas condiciones se mantuvieron constantes a lo largo de todos los experimentos) con medio B fresco durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Transcurridos los tiempos de incubación propuestos se colectaron los medios y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la determinación de los niveles de PGE₂. Tras la recolección de los medios, las células de cada pocillo se despegaron para la posterior determinación de ADN. La determinación de PGE₂ y ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito en los apartados 4 y 5 respectivamente.

2.2.- Efectos del AA exógeno y el ionóforo del calcio A₂₃₁₈₇

El propósito de estos experimentos fue estudiar las posibles modificaciones de la síntesis de PGE₂ producidas por la acción del AA (suplemento exógeno del sustrato de la COX) y del ionóforo del calcio A₂₃₁₈₇ (A₂₃₁₈₇) (sustancia que estimula la PLA₂).

El protocolo experimental se detalla a continuación: las células se preincubaron con medio B fresco en ausencia (condiciones basales) o presencia de los siguientes agentes: A₂₃₁₈₇ 10µM, AA 10µM o la combinación de ambos durante 10, 30, 60 y 120 minutos.

Transcurridos los tiempos de incubación propuestos, los medios se colectaron y almacenaron a -80°C para la posterior cuantificación de PGE₂. Seguidamente las células se incubaron nuevamente con medio completo fresco B, en ausencia de los agentes estimulantes propuestos, durante 24 horas. A continuación se colectaron los medios para determinar los niveles de PGE₂ 24 horas después de haber sido estimulada su síntesis durante 10, 30, 60 y 120 minutos con los agentes anteriores como se describe en el apartado 4. Tras la recolección de los medios, las células se procesaron para la determinación de ADN según se describe en el apartado 5.

2.3.- Curso temporal de la síntesis de PGE₂ inducida por el ionóforo del calcio A₂₃₁₈₇

El propósito fue estudiar el curso temporal de la producción de PGE₂ modulada por el aporte de A₂₃₁₈₇.

El protocolo experimental comenzó preincubando las células con medio B fresco durante 10 minutos, tiempo tras el cual se añadió a los diferentes pocillos el agente estimulante A₂₃₁₈₇ 10µM, exceptuando los pocillos destinados a la síntesis basal. Tras 10 minutos de aplicación del tratamiento se retiraron los medios de cultivo (almacenándolos a -80°C para la posterior determinación de PGE₂) y las células se incubaron durante 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas con medio B fresco. A medida que se fueron cumpliendo los tiempos de incubación se colectaron los medios para procesarlos como se describe posteriormente.

3.- EFECTO DE FARMACOS SOBRE LA SINTESIS DE PGE₂ INDUCIDA POR DIFERENTES AGENTES ESTIMULANTES

El estudio de diferentes fármacos sobre la síntesis de PGE₂ se realizó utilizando como estímulo de la síntesis A₂₃₁₈₇ y el lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* (LPS), endotoxina bacteriana que posee la capacidad de estimular la PLA₂ y la COX-2.

Para ello escogimos fármacos antiinflamatorios inhibidores de la síntesis de PGE₂ con diferentes mecanismos de acción:

- Indometacina y diclofenac, pertenecientes a grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), que actúan inhibiendo simultáneamente la COX-1 y COX-2.
- Prednisolona y dexametasona, correspondientes al grupo de los antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides), que actúan inhibiendo la PLA₂ y la COX-2.

El protocolo experimental empezó preincubando las células durante 10 minutos con medio B fresco (pocillos control) o medio B fresco que contenía indometacina 0,1nM-10µM, diclofenac 0,1nM-10µM, prednisolona 0,3-30µM o dexametasona 0,3-30µM. Seguidamente se añadió el agente estimulante (A₂₃₁₈₇ 10µM o LPS 1µg/ml) a los pocillos correspondientes. Las células se incubaron en estas condiciones durante 10 minutos tras los cuales se retiraron los medios (que se colectaron para posterior determinación de PGE₂) y las células se incubaron por segunda vez, durante 24 horas, con medio B fresco en ausencia (grupo control) o

presencia del fármaco objeto de estudio. Transcurrido el período de incubación se recogieron los medios para determinar los niveles de PGE₂ y las células se procesaron para la determinación de ADN, tal y como se describe en los apartados 4 y 5.

Los parámetros que definen el efecto de los fármacos estudiados sobre la síntesis de PGE₂ por CECB fueron calculados mediante regresión no lineal, ajustando los datos a la ecuación clásica de la curva dosis-respuesta, obteniendo así la eficacia de acción (efecto máximo en %) y potencia de acción (IC₅₀) de los fármacos estudiados.

Tanto los agentes estimulantes como los fármacos utilizados, a excepción del LPS y diclofenac que son solubles en agua, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) o en etanol absoluto. A partir de soluciones concentradas se prepararon las distintas diluciones en medio completo de forma que la concentración de DMSO o de etanol absoluto en los pocillos nunca fue superior al 0,1%, concentración que no afecta a la síntesis de PGE₂ tal como se estableció en controles previos.

4.- CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE PGE₂ EN EL MEDIO DE CULTIVO.

La cuantificación de los niveles de PGE₂ en el medio de cultivo se realizó utilizando un radioinmunoensayo (RIA) específico ([¹²⁵I]PGE₂). Para ello, las muestras se atemperaron y se centrifugaron (centrífuga Biofuge 15 Heraeus, Alemania) a 13.800 xg durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se diluyó (1:20) con tampón de ensayo del RIA y se utilizó para la determinación de PGE₂.

Este método está basado en la unión competitiva entre un antígeno marcado radioactivamente (Ag*), en nuestro caso un análogo iodado de la PGE₂, denominado comunmente trazador y otro no marcado (Ag), PGE₂ de los estándares o muestras, por un número determinado de sitios de unión de un anticuerpo anti-PGE₂ (Ac). La separación del complejo Ag*-Ac del Ag* libre en exceso es llevada a cabo mediante la precipitación del Ac unido al trazador con polietilenglicol en presencia de una γ - globulina que actúa como transportador. Después de centrifugar (centrífuga GS-6 R Beckman) a 2000 xg durante 5 min a 4°C, el sobrenadante que contiene el Ag* libre se decanta y el precipitado conteniendo el complejo Ag*-Ac se cuenta en un contador Gamma (Cobra II Autogamma; Packard) durante

1 minuto. Los valores obtenidos de los estándares expresados en cpm y transformados posteriormente en $\mu\text{g PGE}_2/\text{ml}$ se utilizaron para construir una curva patrón a partir de los cuales se determinaron por interpolación las concentraciones de PGE₂ de las muestras. El límite de detección de RIA fue de 10 pg/ml.

5.- DETERMINACION DE ADN

La concentración de ADN se determinó siguiendo el método descrito por Rago (Rago y col., 1990) con algunas modificaciones. Tras la recolección de los medios al finalizar el experimento correspondiente las células se lavaron con una solución de PBS. Luego se incubaron con 1 ml de una solución de tripsina-EDTA a 37°C y 5% de CO₂ durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se despegaron las células de cada pocillo raspando la superficie de los mismos con la ayuda de la punta de una pipeta Pasteur de plástico. Una vez despegadas, las células de cada uno de los pocillos se transfirieron a viales Eppendorf. Se centrifugaron (centrífuga Biofuge 15 Heraeus, Alemania) a 13.800 xg durante 10 minutos, los precipitados celulares obtenidos se resuspendieron en 1ml de agua desionizada y se congelaron a -80°C. El día de la determinación de ADN las células se descongelaron a temperatura ambiente y a cada vial se le añadió 500 μl del fluorocromo Hoechst 33258 1 μM . La solución del fluorocromo 1 μM se realizó en el tampón TNE (tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) 10mM, NaCl 2M, EDTA 1mM) a partir de una solución concentrada (1 mg/ml) en agua desionizada.

Las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro (SLM-8000C) con una λ de excitación de 350 nm y una λ de emisión de 460 nm. La concentración de ADN de las muestras se determinó a partir de una curva patrón de ADN (mg/ml), empleando ADN de timo de ternero como estándar.

6.- ANALISIS Y EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos experimentalmente se expresan como $\mu\text{g PGE}_2/\text{mg ADN}$. El número de experimentos $n=2$ realizados por triplicado representados en la sección de resultados corresponde a aquéllos en los que el nivel de PGE₂ obtenido tras 10 minutos de incubación en presencia o ausencia de algún agente estimulante incrementó como mínimo 10 veces tras 24 horas de incubación en ausencia o presencia de ese mismo agente estimulante, dependiendo del tipo de experimento.

Análisis estadístico: se realizó un ANOVA de doble vía para la comparación de 3 o más grupos y un test de “t” de Student no pareada para la comparación de 2 grupos, considerando como límite de significación estadística $p \leq 0,05$.

7.- REACTIVOS

PBS, DMEM, HAM-F12, suero fetal bovino, tripsina, A₂₃₁₈₇, LPS, AA, ADN, fluorocromo Hoechst 33258, prednisolona, dexametasona e indometacina fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO. EE.UU.)

El diclofenac fue cedido por Ciba-Vision Ophthalmics (Hettlingen, Suiza).

El RIA de PGE₂ fue suministrado por Dupon (NEN Research Products, Boston, MA EE.UU.).

Todo el material de cultivos fue suministrado por Costar (Cambridge, Inglaterra).

El resto de materiales y reactivos cuyo origen no se ha especificado fueron de grado analítico suministrados por Sigma, Merck o Panreac.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

RESULTADOS

1.- LIBERACION DE PGE₂ POR LAS CELULAS DE ENDOTELIO CORNEAL BOVINO

El primer objetivo de esta memoria fue describir la liberación basal de PGE₂ por las CECB en nuestras condiciones experimentales y en función del tiempo. Para ello, las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ con medio completo fresco durante 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas.

Como muestra la figura 7, la síntesis basal de PGE₂ aumentó progresivamente hasta alcanzar valores de $3,97 \pm 0,36$ $\mu\text{g PGE}_2/\text{mg ADN}$ a las 24 horas de incubación, tiempo a partir del cual no se observó un aumento significativo de los niveles de PGE₂ en el medio de cultivo.

En base a estos resultados elegimos 24 horas como tiempo óptimo de liberación de PGE₂ para la realización de experimentos posteriores.

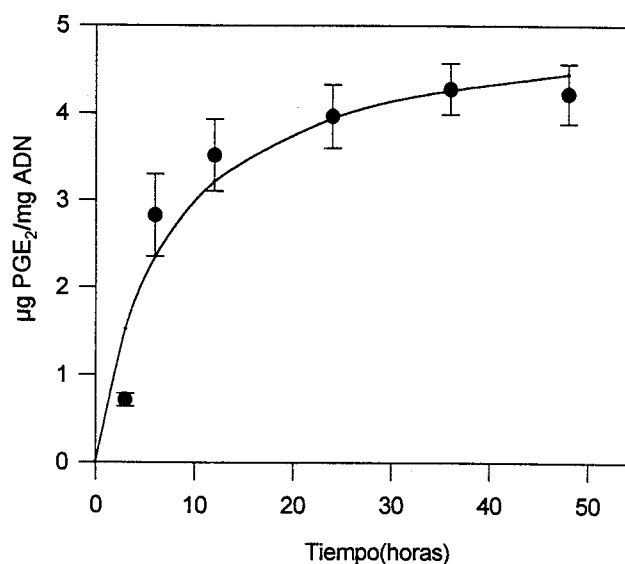


FIGURA 7.- LIBERACION DE PGE₂ POR LAS CELULAS DE ENDOTELIO CORNEAL BOVINO

Las células se incubaron con medio completo fresco a 37°C y 5% de CO₂ y se determinó la liberación de PGE₂ en el medio de cultivo a tiempos crecientes tal y como se describe en material y métodos.

Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado utilizando cultivos celulares diferentes

2.- EFECTO DEL IONOFORO DEL CALCIO A₂₃₁₈₇ Y ACIDO ARAQUIDONICO EXOGENO SOBRE LA SÍNTESIS DE PGE₂

2.1.- Utilización del AA exógeno para la síntesis de PGE₂

La finalidad de este estudio fue determinar si las CECB utilizan el AA exógeno como sustrato para la síntesis de PGE₂.

Para realizar este estudio, las células se incubaron durante 10, 30, 60 y 120 minutos en ausencia (condiciones basales) o presencia de AA 10µM. La concentración de AA utilizada se eligió en función de los datos existentes en la bibliografía (Alpert y col., 1992). Una vez finalizados los diferentes tiempos de incubación, los medios fueron colectados y reemplazados por medio de cultivo fresco durante un periodo de 24 horas. Se hicieron dos determinaciones de PGE₂, una al terminar el primer periodo de incubación del AA (10, 30, 60 y 120 minutos) y otra a las 24 horas en ausencia de AA.

Como se aprecia en la figura 8.a, las células suplementadas con AA exógeno mostraron un aumento progresivo de la producción de PGE₂ en función del tiempo de incubación con respecto a las células en condiciones basales. De este modo, los niveles de PGE₂ obtenidos se triplicaron a los 30 minutos de incubación con AA exógeno, alcanzándose valores 5 veces superiores con respecto a la síntesis de PGE₂ en condiciones basales a los 120 minutos.

Al representar los niveles de PGE₂ tras 24 horas de incubación en ausencia del AA (figura 8.b) se observó que independientemente del tiempo que éste había sido aplicado, la producción de PGE₂ se igualaba al nivel de PGE₂ obtenido en condiciones basales.

Estos resultados demostraron que las CECB sí son capaces de utilizar el AA exógeno presente en el medio como sustrato para la producción de PGE₂, ya que en presencia del mismo se incrementaron los niveles de PGE₂ en el medio de cultivo mientras que al retirarlo, los niveles obtenidos por las células a las que se les había suministrado inicialmente AA exógeno y las que estaban en condiciones basales se igualaron.

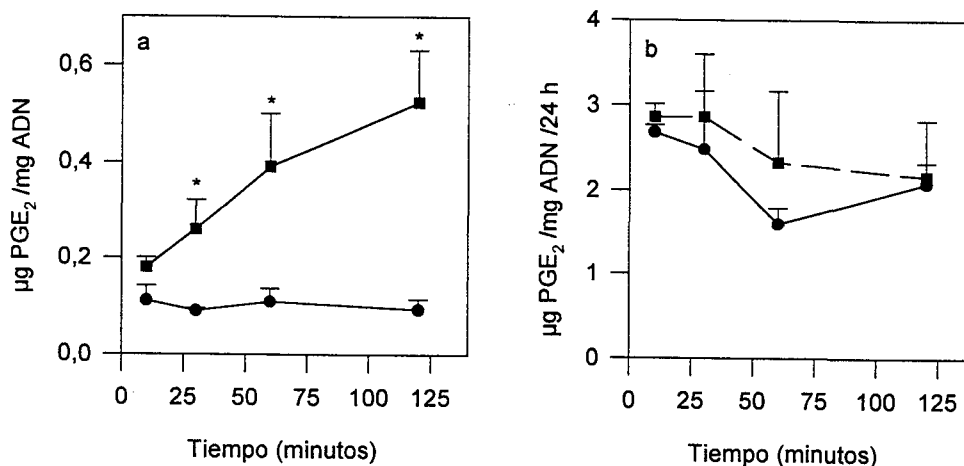


FIGURA 8.- UTILIZACION DEL ACIDO ARAQUIDONICO EXOGENO PARA LA SINTESIS DE PGE₂

Figura 8a.- Las células se incubaron en ausencia (●) o presencia de AA 10µM (■) durante 10, 30, 60 y 120 minutos. Se representan los niveles de PGE₂ en el medio de cultivo una vez finalizados los tiempos de incubación propuestos (*p<0,05 vs basal).

Figura 8b.- Se representan los niveles de PGE₂ en el medio de cultivo tras 24 horas de incubación con medio completo fresco de las células que previamente habían sido tratadas con AA 10µM (■) durante los tiempos indicados en la figura 8a siguiendo el protocolo descrito en material y métodos. Se comparan los niveles de PGE₂ con los obtenidos en condiciones basales (●).

Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado utilizando cultivos celulares diferentes.

2.2.- Determinación del tiempo de incubación del ionóforo del calcio A₂₃₁₈₇.

El ionóforo del calcio A₂₃₁₈₇ pertenece al grupo de los ionóforos carboxílicos y actúa como lanzadera de intercambio iónico formando complejos liposolubles estables con cationes divalentes, aumentando así el flujo del calcio extracelular al interior de la célula. Por otra parte, también es capaz de aumentar las concentraciones intracitoplasmáticas de calcio mediante la movilización del calcio del interior del retículo endoplásmico (Pressman, 1976). Este aumento de calcio activa la PLA₂ y como consecuencia produce la liberación de AA de los fosfolípidos de la membrana plasmática.

Para estudiar el papel estimulante del A₂₃₁₈₇ sobre la síntesis de PGE₂, se determinó en primer lugar el tiempo de incubación necesario para observar su efecto. La elección de la concentración del A₂₃₁₈₇ se basó en los datos existentes en la bibliografía sobre el papel activador del mismo sobre PLA₂. La concentración elegida, 10 μM, está definida como la concentración a la cual se obtiene la mayor actividad de la PLA₂ y la mayor liberación de AA (Chakraborti y Michael, 1993).

Así pues, las células se incubaron durante 10, 30, 60 y 120 minutos en ausencia (condiciones basales) o presencia de A₂₃₁₈₇ o la combinación de A₂₃₁₈₇ con AA exógeno.

Tras ese tiempo de incubación los medios fueron colectados y reemplazados por medio de cultivo fresco durante un periodo de 24 horas. La determinación de PGE₂ se realizó al igual que en el apartado anterior al finalizar el primer periodo de incubación, 10, 30, 60 y 120 minutos y a las 24 horas.

En la figura 9.a se aprecia que la producción de PGE₂ en las células estimuladas con A₂₃₁₈₇ es tiempo dependiente, observándose un incremento significativo ($p \leq 0,05$) con respecto a la síntesis basal a partir de los 30 minutos de incubación ($0,19 \pm 0,02$ μg PGE₂/mg ADN), alcanzándose el máximo nivel de PGE₂ a los 60 minutos ($0,40 \pm 0,06$ μg PGE₂/mg ADN), tiempo a partir del cuál se mantuvo constante hasta los 120 minutos ($0,37 \pm 0,09$ μg PGE₂/mg ADN).

Por otro lado, el efecto del A₂₃₁₈₇ en presencia de AA exógeno tuvo el mismo efecto aunque en este caso el incremento en la síntesis de PGE₂ con respecto a la síntesis basal fue máximo a los 30 minutos ($0,37 \pm 9,08 \cdot 10^{-4}$ μg PGE₂/mg ADN), tiempo a partir del cual los niveles de PGE₂ obtenidos se mantuvieron constantes hasta los 120 minutos.

Los niveles de PGE₂ obtenidos al estimular con A₂₃₁₈₇ sólo o en combinación con AA solamente fueron diferentes significativamente a los 30 minutos, mostrándose similares entre sí a partir de los 60 minutos de incubación (0,40±0,06 µg PGE₂/mg ADN y 0,31±0,04 µg PGE₂/mg ADN respectivamente).

Sin embargo, al retirar el A₂₃₁₈₇ o la combinación de A₂₃₁₈₇ con AA exógeno del medio de cultivo, e incubar estas mismas células durante 24 horas (figura 9.b) con medio completo fresco, se observó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) en los niveles de PGE₂ con respecto a las condiciones basales. El aumento observado en la síntesis de PGE₂ fue independiente del tiempo de estimulación previa en ambos casos. Además, al comparar el efecto de ambos tratamientos sobre la síntesis de PGE₂ se observó que los niveles discurrieron de forma paralela y sin diferencias significativas entre ellos.

Ante los resultados obtenidos, el tiempo de incubación del estímulo elegido para determinar la síntesis de PGE₂ a las 24 horas fue de 10 minutos.

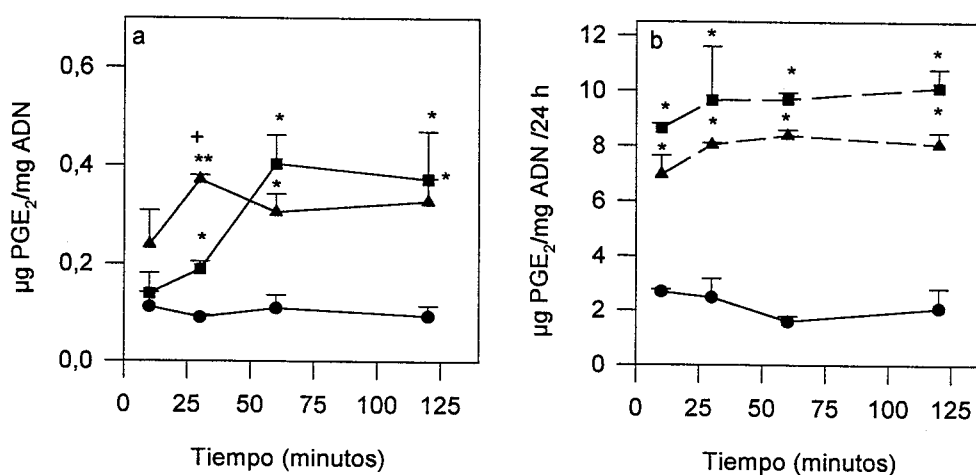


FIGURA 9.- DETERMINACION DEL TIEMPO DE INCUBACION DEL IONOFORO DEL CALCIO A₂₃₁₈₇
Se siguió el mismo protocolo experimental que en la figura 8.

Figura 9a.- Se representan los niveles de PGE₂, transcurridos los tiempos de estimulación propuestos (10-120 minutos) en ausencia (●) o presencia de A₂₃₁₈₇ 10µM (■) o A₂₃₁₈₇ 10µM+AA 10µM (▲) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ vs basal; + $p < 0,005$ vs A₂₃₁₈₇).

Figura 9b.- Se representan los niveles de PGE₂ 24 horas después de finalizar la incubación con A₂₃₁₈₇ 10µM (■), A₂₃₁₈₇ 10µM+AA 10µM (▲) o la síntesis basal (●) (* $p < 0,05$ vs control).

Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado utilizando cultivos celulares diferentes.

2.3.- Curso temporal de la síntesis de PGE₂ en células tratadas con A₂₃₁₈₇.

Una vez establecido que la liberación de PGE₂ en las CECB en condiciones basales se estabilizaba a partir de las 24 horas, tal y como quedó demostrado en el apartado 1 de los resultados, y determinado que 10 minutos era el tiempo de incubación del A₂₃₁₈₇ necesario para inducir un aumento en la síntesis de PGE₂ a ese tiempo, se realizó un estudio del curso temporal de la liberación de PGE₂ inducida con A₂₃₁₈₇ en CECB.

Para ello las células se incubaron durante 10 minutos con A₂₃₁₈₇, periodo tras el cuál el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo fresco donde se determinó la liberación de PGE₂ a diferentes tiempos. Los tiempos de incubación elegidos fueron 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas. Paralelamente se realizó el mismo ensayo en condiciones basales.

Los resultados representados en la figura 10 mostraron que la síntesis de PGE₂ inducida por A₂₃₁₈₇ se mantuvo sin variación durante el primer intervalo de tiempo estudiado (3-12 horas), aumentando significativamente con respecto a la síntesis basal ($p \leq 0,05$) a partir de las 24 horas alcanzando valores de $8,01 \pm 0,53 \mu\text{g PGE}_2/\text{mg ADN}$ frente a $4,33 \pm 1,29 \mu\text{g PGE}_2/\text{mg ADN}$ obtenidos en condiciones basales a ese mismo tiempo. Dicho incremento se mantuvo sin cambios significativos durante las 36 y 48 horas de incubación.

Basándonos en los resultados obtenidos podemos decir que el tratamiento previo de las CECB con A₂₃₁₈₇ durante 10 minutos produce un aumento en la síntesis de PGE₂ que se manifiesta a las 24 horas sin observarse ningún incremento a partir de ese momento.

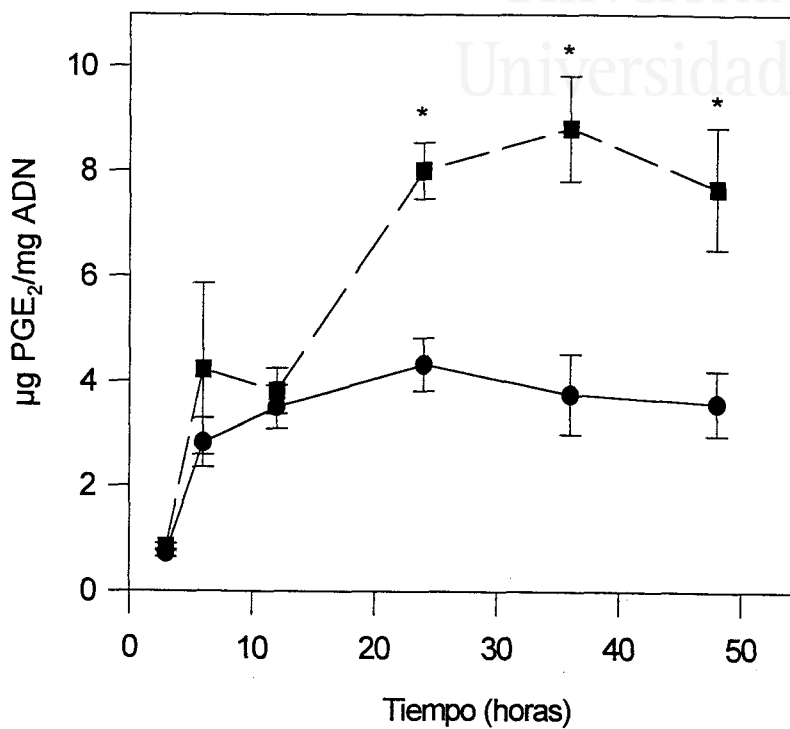


FIGURA 10.- CURSO TEMPORAL DE LA SÍNTESIS DE PGE₂ EN CELULAS TRATADAS CON EL IONOFORO DEL CALCIO A₂₃₁₈₇.

Los niveles de PGE₂ se midieron tras 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas de incubación con medio completo fresco. Las células habían sido incubadas previamente durante 10 minutos en ausencia (●) o presencia de A₂₃₁₈₇ 10µM (■) (*p<0,05 vs basal).

Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado utilizando cultivos celulares diferentes.

3.- EFECTO DE FARMACOS SOBRE LA SÍNTESIS DE PGE₂ INDUCIDA POR A₂₃₁₈₇.

3.1- Efecto de indometacina y prednisolona.

Se realizó un estudio preliminar con el fin de comparar el efecto sobre la síntesis de PGE₂ de 2 fármacos pertenecientes a distintos grupos de antiinflamatorios.

Se utilizó indometacina, perteneciente al grupo de los AINES, que inhibe de forma irreversible la actividad de los dos isoenzimas de la COX (Gierse y col., 1995) y prednisolona, perteneciente a los glucocorticoides, inhibidores de la PLA₂ y del isoenzima inducible de la COX (COX-2) (Barnes y Adcock, 1993).

Este estudio se realizó tanto en condiciones basales de síntesis de PGE₂ como inducida por el A₂₃₁₈₇ y utilizando la misma concentración para ambos fármacos (1 μ M). Para ello, las células se incubaron previamente durante 10 minutos en ausencia (control) o presencia de indometacina 1 μ M o prednisolona 1 μ M, tiempo tras el cual se añadió el A₂₃₁₈₇ a los pocillos, excepto a aquellos destinados al estudio de la síntesis basal. Tras 10 minutos más de incubación, los medios fueron colectados y reemplazados por medio de cultivo B fresco (pocillos control) o medio de cultivo B fresco que contenía indometacina 1 μ M o prednisolona 1 μ M, incubándose en estas condiciones durante 24 horas.

Al representar los datos experimentales (figura 11) como porcentaje de síntesis de PGE₂ con respecto a la síntesis obtenida en ausencia de fármaco (control) tanto en condiciones basales como inducida con A₂₃₁₈₇, se observó que indometacina ejercía un efecto inhibitor sobre la síntesis de PGE₂ en ambas condiciones experimentales, alcanzando un porcentaje de inhibición superior al 95%.

Sin embargo, la prednisolona careció de efecto sobre la síntesis de PGE₂, manteniéndose el nivel de PGE₂ en el medio de cultivo sin variación en presencia de prednisolona tanto en condiciones basales como en presencia del A₂₃₁₈₇.

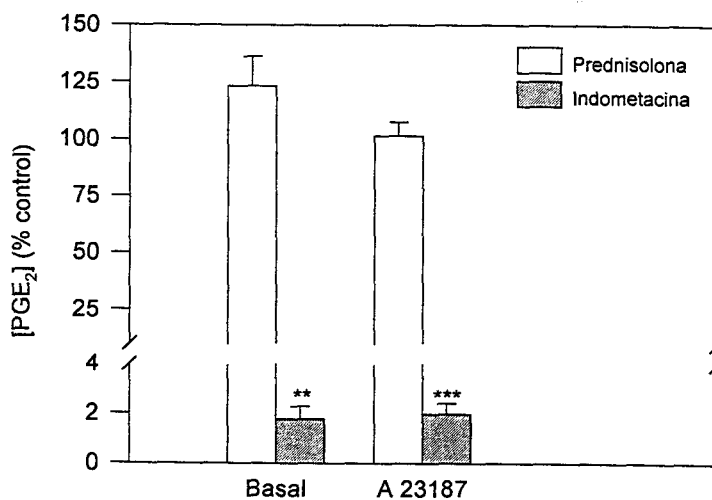


FIGURA 11.- EFECTO DE INDOMETACINA Y PREDNISOLONA SOBRE LA SÍNTESIS DE PGE₂ INDUCIDA POR EL IONOFORO DEL CALCIO A₂₃₁₈₇.

Las células se preincubaron con indometacina 1 μM o prednisolona 1 μM durante 10 minutos y a continuación se incubaron con A₂₃₁₈₇ 10 μM siguiendo el protocolo experimental descrito en material y métodos. Los niveles de PGE₂ se midieron tras 24 horas de incubación con indometacina 1 μM o prednisolona 1 μM. Los resultados se expresan como el porcentaje de síntesis de PGE₂ con respecto al nivel de PGE₂ obtenido en ausencia de fármaco (**p<0,005, ***p<0,0005 vs control).

Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado con cultivos celulares diferentes.

3.2.- Curvas dosis-respuesta

El estudio del efecto de los diferentes fármacos antiinflamatorios sobre la síntesis de PGE₂ se realizó mediante curvas dosis-respuesta.

Para ello las CECB se preincubaron durante 10 minutos en ausencia (grupo control) o presencia de los antiinflamatorios objeto de estudio. Pasado este intervalo de tiempo, se adicionó al medio el agente estimulante (A₂₃₁₈₇ 10 μ M) incubándolo durante otros 10 minutos, periodo tras el cual se colectó el medio de cultivo y se reemplazó por medio de cultivo fresco en ausencia/presencia de los diferentes fármacos durante 24 horas. La determinación de PGE₂ se realizó al finalizar los 10 minutos de incubación en presencia del A₂₃₁₈₇ y a las 24 horas de haber sido inducida.

Como se mencionó en el apartado de material y métodos, sólo se analizaron aquellos resultados en los que el nivel de PGE₂ obtenido tras 10 minutos de estímulo en ausencia de fármacos aumentó como mínimo 10 veces tras 24 horas de incubación.

3.2.1.- AINES

Entre los fármacos pertenecientes al grupo de los AINES, se estudió el efecto de indometacina y diclofenac sobre la síntesis de PGE₂, utilizando un rango de concentraciones comprendido entre 0,1nM -10 μ M.

Al representar los datos experimentales en porcentaje de inhibición de la síntesis de PGE₂ con respecto a las condiciones control frente al logaritmo de las concentración de los fármacos empleados (figura 12), se obtuvieron los parámetros que definieron la acción de los mismos sobre la producción de PGE₂.

Como se observa en la figura 12.a y a partir del análisis de los datos experimentales (descrito en la sección de Material y Métodos) se obtuvo un valor de IC₅₀ para indometacina de 87,9 \pm 12,2 nM y para diclofenac de 46,4 \pm 18,4 nM (figura 12.b). A pesar de que el diclofenac fue 2 veces mas potente que indometacina, ambos fármacos fueron igual de eficaces inhibiendo la síntesis de PGE₂, alcanzando niveles de inhibición \geq 99%.

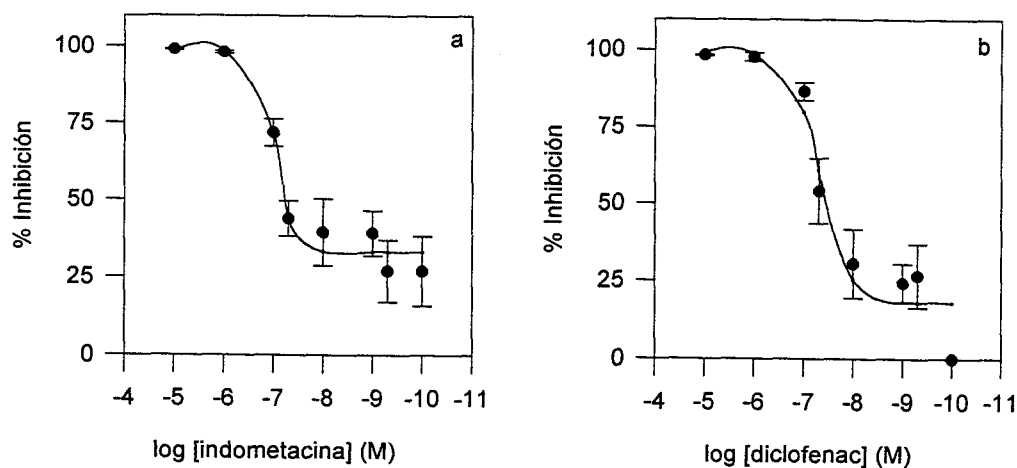


FIGURA 12.- CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE AINES

Figura 12a.- Las células se preincubaron con indometacina (0,1nM-10 μ M) durante 10 minutos. Tras la adición del A₂₃₁₈₇ 10 μ M durante 10 minutos más, se retiraron los medios y las células se incubaron durante 24 horas con las mismas concentraciones de indometacina. Se representa el porcentaje de inhibición de la síntesis de PGE₂ inducida por A₂₃₁₈₇ con respecto al control (ausencia de fármaco).

Figura 12b.- Las mismas condiciones experimentales pero el fármaco utilizado fue diclofenac (0,1nM-10 μ M)

Los parámetros obtenidos a partir de las dos curvas se describen en el texto y en la tabla VII. Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado con cultivos celulares diferentes.

3.2.2.- Glucocorticoides

En base al efecto no inhibitor manifestado por la prednisolona en un estudio previo en el que se utilizó una concentración de 1 μ M, se procedió a la realización de un estudio dosis-respuesta en células tratadas con A₂₃₁₈₇, en las que se encontraba estimulada la PLA₂, utilizando un rango de concentraciones entre 0,1-30 μ M.

Con el fin de poder observar diferencias o similitudes relevantes con respecto al efecto sobre la síntesis de PGE₂ de otros glucocorticoides, realizamos un estudio análogo con la dexametasona que es el fármaco modelo dentro de este grupo para los estudios de este tipo.

Con respecto a la prednisolona, los datos experimentales no se ajustaron a una curva clásica de dosis-respuesta. Como se observa en la tabla V, la prednisolona no mostró efecto inhibitor sobre la síntesis de PGE₂ con ninguna de las concentraciones estudiadas.

Prednisolona (μ M)	Síntesis PGE ₂
0	9,08 \pm 0,98
0,1	6,74 \pm 0,43
0,3	6,69 \pm 0,72
1	8,29 \pm 0,98
3	7,53 \pm 0,80
10	9,33 \pm 0,77
30	9,19 \pm 1,09

TABLA V.- EFECTO DE PREDNISOLONA SOBRE LA SINTESIS DE PGE₂ ESTIMULADA CON EL IONOFORO DEL CALCIO A₂₃₁₈₇.

Las células se preincubaron con prednisolona (0,1 μ M-30 μ M) durante 10 minutos. A continuación se añadió A₂₃₁₈₇ 10 μ M durante 10 minutos. Se retiraron los medios y las células se incubaron durante 24 horas con las mismas concentraciones de prednisolona. Se representan los niveles de PGE₂ en μ g PGE₂/mg ADN en presencia o ausencia de fármaco.

Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado con cultivos celulares diferentes.

Sin embargo, la dexametasona si mostró efecto inhibitor sobre la síntesis de PGE₂. Al ajustar los datos experimentales a una curva dosis-respuesta (figura 13), se observó que la concentración necesaria para inhibir un 50% la síntesis de PGE₂ fue $0,37 \pm 0,09 \mu\text{M}$. Aunque menos potente que los AINES estudiados, la dexametasona fue también un fármaco eficaz inhibiendo la síntesis de PGE₂ inducida por A₂₃₁₈₇ ya que presentó una inhibición máxima del 80%.

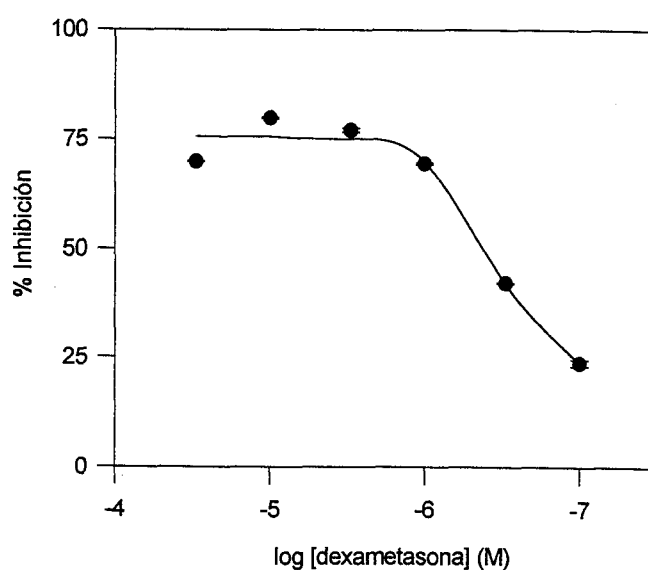


FIGURA13.- CURVA DOSIS-RESPUESTA DE DEXAMETASONA

Se preincubaron las células durante 10 minutos con dexametasona ($0,1 \mu\text{M}$ - $30 \mu\text{M}$). Se siguió el mismo protocolo descrito en la figura 12.

Los parámetros obtenidos a partir de la curva se describen en el texto y en la tabla VII. Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado con cultivos celulares diferentes.

4.- EFECTO DEL LPS SOBRE LA SÍNTESIS DE PGE₂

Cuando las células se exponen a estímulos inflamatorios tales como endotoxinas bacterianas, interleucinas, etc. la producción de PGs aumenta notablemente debido a la inducción/activación de la PLA₂ y de la COX-2 provocada por este tipo de estímulos. Este aumento de PGs contribuye al desarrollo de los signos inflamatorios en el tejido afectado, que en el caso de la córnea son la formación de edema y la neovascularización corneal.

El objetivo de todos los estudios que se van a desarrollar a continuación consistió en someter a las CECB a un estímulo inflamatorio, en este caso LPS 1 µg/ml, y mostrar como afecta a la producción de PGE₂.

Con el fin de mantener las mismas condiciones experimentales que en los estudios realizados con A₂₃₁₈₇, se eligió un tiempo de incubación para el LPS de 10 minutos. Tras 10 minutos de incubación en ausencia (condiciones basales) o presencia de LPS, los medios fueron recogidos y reemplazados por medio de cultivo fresco durante un periodo de 24 horas.

A partir de los resultados mostrados en la figura 14, se observa que durante los 10 minutos de aplicación del agente estimulante proinflamatorio no se produce un aumento en la síntesis de PGE₂ con respecto a la síntesis basal (0,22±0,09 µg PGE₂/mg ADN y 0,16±0,04 µg PGE₂/mg ADN respectivamente). Por el contrario, al retirar el LPS del medio, la producción de PGE₂ aumentó significativamente tras 24 horas de incubación con medio completo fresco alcanzándose valores de 11,54±1,84 µg PGE₂/mg ADN frente a 3,97±0,24 µg PGE₂/mg ADN en condiciones basales.

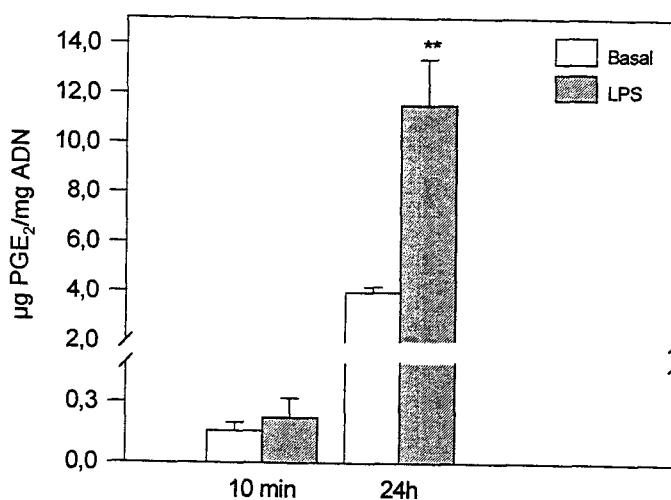


FIGURA 14.- EFECTO DEL LIPOPOLISACARIDO DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* SOBRE LA SINTESIS DE PGE₂.

Las células se preincubaron con LPS 1 µg/ml durante 10 minutos. A continuación se retiraron los medios y se incubaron durante 24 horas con medio completo fresco. Se representan los niveles de PGE₂ a los 10 minutos de incubación en ausencia o presencia de LPS y a las 24 horas una vez retirado el LPS (**p<0,005 vs basal).

Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado con cultivos celulares diferentes.

5.-EFECTO DE FARMACOS SOBRE LA SÍNTESIS DE PGE₂ INDUCIDA POR LPS

5.1.- Efecto de indometacina y prednisolona

El siguiente objetivo a cubrir fue determinar el efecto de la indometacina y la prednisolona sobre la síntesis de PGE₂ cuando las células se encontraban expuestas a LPS 1 µg/ml.

Para ello se siguió el mismo protocolo experimental descrito en el apartado 3.1. de esta sección. En este caso no hicimos un estudio del curso temporal de la síntesis de PGE₂ en células estimuladas con LPS y elegimos el mismo tiempo de incubación utilizado con A23187 (24 horas) para mantener las mismas condiciones experimentales en ambos casos.

Los resultados (figura 15) reflejaron un potente efecto inhibitor de la indometacina 1 µM sobre la síntesis de PGE₂ tanto en ausencia como en presencia del LPS, obteniéndose un valor de inhibición del 98% en condiciones basales y un 95% cuando las células se estimularon con LPS. Sin embargo la prednisolona al igual que en ausencia o presencia de A23187, careció de efecto inhibitor sobre la síntesis de PGE₂.

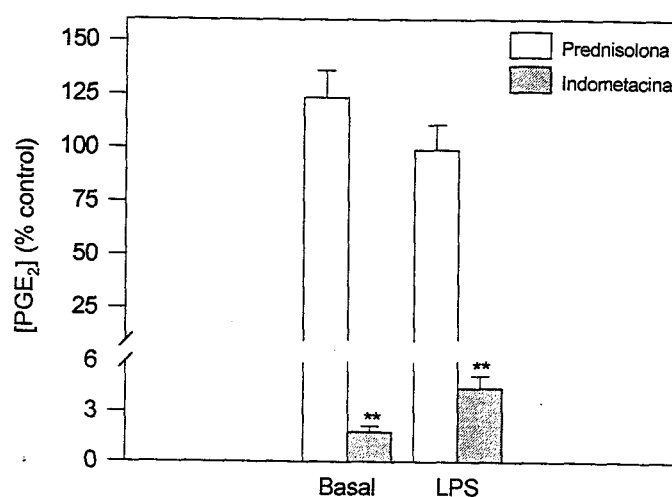


FIGURA 15.- EFECTO DE INDOMETACINA Y PREDNISOLONA SOBRE LA SÍNTESIS DE PGE₂ INDUCIDA POR LIPOPOLISACARIDO DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*.

Las células se trataron siguiendo el mismo protocolo que la figura 11, pero en este caso el agente estimulante utilizado fue LPS 1 µg/ml.

Los niveles de PGE₂ se representan como el porcentaje de síntesis de PGE₂ con respecto a la síntesis en ausencia de fármaco (**p<0,005 vs control). Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado con cultivos celulares diferentes.

5.2- Curvas dosis - respuesta

En último lugar se estudió el efecto de los fármacos utilizados en el apartado 3.2. de resultados sobre la síntesis de PGE₂ inducida por LPS.

5.2.1- AINES

Como se representa en la figura 16.a y 16.b, el análisis de los datos experimentales mostró nuevamente un efecto inhibitor de indometacina y diclofenac sobre la síntesis de PGE₂. Sin embargo la concentración de indometacina necesaria para observar un 50% de inhibición fue de $64,5 \pm 14,25$ nM, 1,4 veces inferior a la observada al estimular las CECB con A₂₃₁₈₇. Mientras que en el caso del diclofenac su efecto inhibitor fue, al igual que en las células en las que la síntesis fue inducida por A₂₃₁₈₇, más potente ($IC_{50} = 16,7 \pm 3,5$ μ M) que indometacina. Además, en este caso, el diclofenac fue 2,4 veces más potente que en el caso de células estimuladas con A₂₃₁₈₇. Por otro lado, al igual que en caso de la síntesis de PGE₂ inducida por A₂₃₁₈₇, ambos fármacos presentaron una eficacia de acción similar, alcanzando niveles de inhibición $\geq 99\%$.

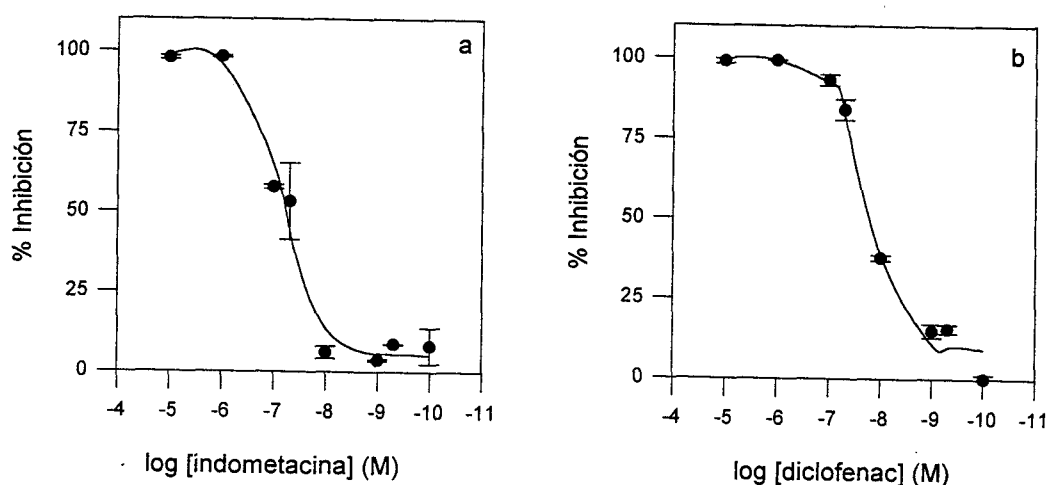


FIGURA 16.- CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE AINES.

Figura 16a.- Se incubaron las células con indometacina (0,1nM-10 μ m) siguiendo el mismo protocolo experimental descrito en la figura 12, pero en este caso el agente inductor de la síntesis de PGE₂ fue LPS 1 μ g/ml.

Figura 16b.- Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 16a, pero el fármaco utilizado fue diclofenac (0,1nM-10 μ m).

Los parámetros obtenidos a partir de las dos curvas se describen en el texto y en la tabla VII. Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado con cultivos celulares diferentes.

5.2.2.- Glucocorticoides

El efecto de prednisolona sobre la síntesis de PGE₂ inducida por LPS fue similar a los resultados obtenidos al inducir la síntesis de PGE₂ con A23187. Nuevamente, la prednisolona careció de efecto inhibitor en el rango de concentraciones utilizado (0,1-30 μM).

Los resultados obtenidos con dexametasona no se ajustaron en este caso a una curva clásica de dosis-respuesta aunque sí tuvo efecto inhibitor a todas las concentraciones estudiadas. Sin embargo el porcentaje de inhibición obtenido no superó en ninguno de los casos el 53% de inhibición (Tabla VI).

Concentración (μM)	Prednisolona	Dexametasona
0	14,32 ± 0,80	13,58 ± 1,93
0,1	12,99 ± 1,96	6,35 ± 0,33 (*)
0,3	12,53 ± 1,70	8,19 ± 0,68 (*)
1	12,06 ± 1,41	7,13 ± 0,22 (*)
3	12,08 ± 2,34	6,39 ± 1,68 (*)
10	12,54 ± 1,82	7,74 ± 0,72 (*)
30	12,21 ± 1,77	7,35 ± 0,10 (*)

TABLA VI.- EFECTO DE GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA SINTESIS DE PGE₂ ESTIMULADA CON LIPOPOLISACARIDO DE *SALMONELLA TIPHYMURIUM*.

El protocolo experimental seguido es el mismo que el descrito en la tabla V pero los fármacos utilizados fueron dexametasona o prednisolona (0,1 μM-30 μM) (*p<0,05 vs. control).

Se representan los niveles de PGE₂ como μg PGE₂/mg ADN en ausencia o presencia de los fármacos objeto de estudio. Los resultados corresponden a 2 experimentos realizados por triplicado con diferentes cultivos celulares.

TABLA VII.- RESUMEN DEL EFECTO DE FÁRMACOS SOBRE LA SÍNTESIS DE PGE₂ POR CECB EN CULTIVO.

Estímulo	Fármaco	IC ₅₀	% máxima inhibición	n
A₂₃₁₈₇	Indometacina	87,9 ± 12,2	98,6	2
	Diclofenac	46,4 ± 18,4	99,6	2
	Dexametasona	370 ± 90	80	2
	Prednisolona	s.e.		2
LPS	Indometacina	64,5 ± 14,3	99,0	2
	Diclofenac	16,7 ± 3,5	99,8	2
	Dexametasona	----	53	2
	Prednisolona	s.e.		2

La potencia de efecto de los fármacos (IC₅₀) sobre la síntesis de PGE₂ están expresados en nM. s.e. corresponde a la ausencia de efecto del fármaco en el rango de concentraciones utilizado.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

DISCUSION

La inflamación ocular en general, y la corneal en particular, por su frecuencia y posibles repercusiones visuales supone una patología importante desde los puntos de vista epidemiológico y clínico. En los últimos años el interés de la investigación en los procesos inflamatorios oculares se ha centrado en el estudio del papel que desempeñan los derivados del AA, y fundamentalmente las PGs.

La respuesta de la córnea ante cualquier tipo de agresión presenta diferentes modalidades que están en función de factores diversos como la naturaleza del estímulo responsable de la lesión y los tipos celulares dañados en las distintas capas que constituyen la córnea. En la actualidad se sabe que las PGs participan en la formación del edema y la neovascularización corneal (Verbey y col., 1988; Haynes y col., 1989).

En el presente trabajo hemos centrado el estudio en la liberación de PGE₂ por las células endoteliales de la córnea bovina, cuando éstas se exponen a agentes estimulantes de naturaleza diversa, así como su posible modulación por diferentes fármacos antiinflamatorios.

Bazan y colaboradores fueron los primeros autores en describir la participación de las PGs en los procesos de inflamación corneal (Bazan y col., 1985a,b; Bazan, 1987). Posteriormente, Gerritsen y colaboradores (1989) caracterizaron la producción de PGs por las CECB cultivadas, demostrando que la PGE₂ era el principal metabolito del AA producido por las células endoteliales de origen bovino tanto en condiciones basales como frente a agentes estimulantes del tipo A₂₃₁₈₇, trombina, bradiquinina e histamina. Estudios realizados con cultivos endoteliales corneales, de otras especies animales como el conejo, han demostrado resultados similares siendo la PGE₂ el producto mayoritario entre los metabolitos del AA (Jumblatt, 1994).

En el presente estudio se ha comprobado la existencia de una relación entre la liberación de PGE₂ y el tiempo en condiciones basales. Nuestros resultados mostraron un incremento progresivo de la misma con respecto al tiempo que se estabiliza a partir de las 24 horas. Se ha descrito que la PGE₂ sintetizada por las células del endotelio corneal en condiciones basales interviene en distintos procesos fisiológicos actuando, a través de un receptor EP₂, como un factor autocrino que mantiene la morfología celular (Neufeld y col., 1986; Jumblatt y col., 1991), inhibe la mitosis y a su vez regula de forma inversamente proporcional la actividad de su propio receptor (Jumblatt, 1994). Teniendo presente todos los

efectos descritos podríamos deducir que la estabilización en la producción de PGE₂ es una regulación de su propia biosíntesis.

La adición al medio de AA exógeno nos permite diferenciar las dos etapas principales de la síntesis de PGE₂ en las que están implicadas las enzimas PLA₂ y COX. Nuestros resultados comprobaron que cuando el AA está disponible libremente, sin necesidad de la intervención de la PLA₂, los niveles basales de PGE₂ aumentaron progresivamente hasta 5 veces en el intervalo de tiempo estudiado (10-120 minutos). Este hecho demuestra, como han descrito otros autores (Smith, 1992), la existencia de una actividad COX constitutiva, COX-1, responsable de la biosíntesis de PGE₂ en condiciones fisiológicas.

Como los niveles de AA libre en el citoplasma en condiciones basales son bajos, el paso limitante en la síntesis del intermediario lipídico PGE₂ es la disponibilidad del AA procedente de los fosfolípidos de membrana, y el responsable directo de dicha disponibilidad es la acción de la PLA₂. La utilización del ionóforo del calcio A₂₃₁₈₇ produce un aumento de calcio intracelular que provoca la activación de la PLA₂ (Matsumoto y col., 1988; Chakraborti y Michael, 1993). Esta activación de la PLA₂ incrementa la disponibilidad del AA endógeno libre y por consiguiente aumenta la producción de metabolitos derivados del mismo tales como la PGE₂ (Shibata y col., 1992; Lin y col., 1992). Cuando las CECB son tratadas con A₂₃₁₈₇ la síntesis de PGE₂ va aumentando al incrementar el periodo de incubación del mismo, presentando un máximo a los 60 minutos que se mantiene constante a partir de ese momento. El efecto tiempo-dependiente observado por el A₂₃₁₈₇ sobre la producción de PGE₂, también ha sido descrito con otros metabolitos del AA, además de PGE₂, en células epiteliales alveolares (Griminger y col., 1992) y células endoteliales cerebrales (Hsu y col., 1993).

Por otro lado, al combinar el A₂₃₁₈₇ con AA exógeno el máximo nivel de liberación de PGE₂ se consigue a los 30 minutos, manteniéndose la síntesis constante a partir de ese momento, sin observarse diferencias significativas entre las células tratadas con A₂₃₁₈₇ en ausencia o presencia de AA exógeno a los 60 y 120 minutos. Resultados similares se han obtenido con células endoteliales cardíacas donde la combinación del A₂₃₁₈₇ con AA adelantó en el tiempo la producción máxima de metabolitos de AA con respecto a las tratadas con A₂₃₁₈₇ o AA (Linssen y col., 1993).

Existen datos en la bibliografía que demuestran que al aumentar el tiempo de aplicación del A₂₃₁₈₇ o AA aparecen efectos tóxicos, sobre todo con A₂₃₁₈₇, que se traducen en alteraciones morfológicas y disminución del metabolismo celular (Revtyak y col., 1988; Linszen y col., 1993).

Sin embargo, un hecho importante a resaltar en las células tratadas con A₂₃₁₈₇ es que 24 horas después de haberlo retirado del medio, se observa un aumento de la producción de PGE₂ de casi 5 veces con respecto a la síntesis basal. Este comportamiento induce a pensar que la PLA₂ se mantiene activada, debido al aumento del calcio intracelular, aunque ya no esté presente el agente estimulante responsable de dicha activación.

Además, podríamos destacar que el curso temporal de la síntesis de PGE₂ sigue el mismo comportamiento tanto en condiciones basales como activada por A₂₃₁₈₇, ya que en ambos casos los niveles de PGE₂ observados se mantienen constantes a partir de las 24 horas.

Por otra parte, nuestros resultados nos permitieron comprobar que el tratamiento durante 10 minutos con LPS, logró aumentar la síntesis de PGE₂ 24 horas después de haberlo retirado del medio de cultivo. El LPS es un potente agente inflamatorio que actúa, a través de la vía de la tirosin-quinasa, sobre las dos enzimas reguladoras de la síntesis de PGs (Mitchell y col., 1995; Blanco y col., 1995; Akarasereenont y col., 1994).

En primer lugar, el LPS es capaz de activar la PLA₂ fosforilándola (Fouda y col., 1995). Este hecho aumenta la disponibilidad del AA endógeno libre y por tanto produce un aumento de la síntesis de metabolitos derivados del mismo (Glaser y col., 1993 a).

En segundo lugar, el LPS actúa sobre la síntesis *de novo* del isoenzima inducible de la COX, COX-2, bien induciendo la síntesis de ARNm de la COX-2 (Arias-Negrete y col., 1995) o aumentando la síntesis de proteínas de la COX-2 (Akarassenont y col., 1995). Estas dos acciones contribuyen a la elevada producción de PGs durante los procesos inflamatorios.

Existen un gran número de estudios realizados en diferentes tipos celulares: monocitos humanos (Nüsing y Ulrich, 1992), células de Kupffer (Victorov y Hock, 1995), células endoteliales de aorta bovina o macrófagos de la línea J774.2 (Akarasereenont y col., 1995) que demuestran que el efecto del LPS sobre la síntesis de metabolitos del AA es tiempo-dependiente necesitándose varias horas de exposición para obtener un incremento de la producción de los mismos. Sin embargo, estudios realizados en macrófagos expuestos a LPS

durante un periodo de 15 minutos, han demostrado que la actividad de la tirosin-quinasa estimulada por LPS fue máxima a los 2 minutos de incubación (Glaser y col., 1993 b). Este hecho indica, como muestran nuestros resultados, que 10 minutos de incubación con LPS fue un tiempo suficiente para desencadenar toda la cascada enzimática necesaria para aumentar la síntesis de PGE₂ en las CECB.

Al analizar los resultados obtenidos sobre el estudio del efecto de los antiinflamatorios pertenecientes al grupo de los AINES sobre la producción de PGE₂, se observa que tanto indometacina como diclofenac presentaron la misma eficacia, ya que los dos fármacos fueron capaces de inhibir hasta un 99% la síntesis de PGE₂, independientemente del agente estimulante utilizado. Por el contrario, presentaron diferentes potencias de acción, siendo el diclofenac el inhibidor más potente de la síntesis de PGE₂ en ambos casos. Al igual que en las CECB, en estudios realizados con células humanas sinoviales en cultivo el diclofenac (IC₅₀ = 1,6±0,02nM) fue más potente que indometacina (IC₅₀ = 5,5±0,1nM) inhibiendo la síntesis de PGE₂ inducida por IL-1 α (O'Neil y Lewis, 1989). Por otra parte, mientras que la potencia inhibidora de indometacina fue similar con ambos estímulos, diclofenac fue más potente inhibiendo la síntesis de PGE₂ inducida por LPS que la inducida por A₂₃₁₈₇.

La posible explicación a esta diferencia de potencia existente entre ambos AINES, especialmente cuando la liberación es inducida por LPS, puede ser consecuencia de la distinta acción de ambos antiinflamatorios sobre las isoenzimas COX-1 y COX-2.

La identificación de una forma inducible del enzima COX, COX-2, ha llevado al desarrollo de numerosas investigaciones intentando dilucidar sobre qué isoenzimas de la COX actúan los AINES conocidos. De este modo, estudios realizados en células endoteliales de aorta bovina (sólo expresan la COX-1) comparados con estudios realizados con la línea de macrófagos J774.2 tratados con LPS (expresan la COX-2) demostraron que indometacina era 60 veces más potente sobre la actividad de la COX-1 que sobre COX-2, mientras que diclofenac era equipotente frente a ambas enzimas (Mitchell y col., 1994). Por otro lado es importante resaltar que la mayor o menor potencia que presentan los AINES sobre la COX-1 o COX-2 difiere de unas especies animales a otras, ya que autores que han utilizado enzimas recombinantes de la COX-1 y COX-2 para estudiar el efecto de estos fármacos sobre la producción de PGE₂, obtienen diferentes resultados dependiendo de que utilicen enzimas

recombinantes de ratón, donde indometacina es más potente sobre la COX-2 (Masferrer y col., 1994a) o enzimas recombinantes humanas donde indometacina es más potente sobre la COX-1 y diclofenac sobre la COX-2 (Gierse y col., 1995). Otros estudios comparten la teoría de que el efecto inhibitor irreversibile de indometacina sobre la COX-2 es directamente proporcional al tiempo de aplicación de la misma (Gierse y col., 1995; Oullet y col., 1995).

Por otra parte en modelos *in vivo* se ha demostrado que indometacina inhibe la síntesis de PGE₂ producida por la COX-1 y la COX-2 (Masferrer y col., 1994a; Seibert y col., 1997) y que diclofenac manifiesta cierta selectividad por la COX-2 debido a su menor poder ulcerogénico (Todd y Clissold, 1990).

Nuestros resultados nos permitirían apoyar la teoría de que en las CECB, la indometacina es equipotente sobre ambas isoenzimas porque los valores de IC₅₀ obtenidas tanto con A₂₃₁₈₇ (en la que está COX-1) como con LPS (en la que puede estar inducida la COX-2) son semejantes. Sin embargo, el efecto inhibitor del diclofenac parece ser mayor cuando la síntesis de PGE₂ es inducida por LPS. Este hecho podría sugerir que en las CECB, el diclofenac es algo más selectivo frente a la COX-2. Además nuestros resultados están en concordancia con los resultados obtenidos en células endoteliales corneales de conejo en cultivo cuando sufren una lesión mecánica (donde se produce una inducción de la COX-2), ya que en este caso, el diclofenac inhibe en mayor grado la síntesis de PGE₂ comparado con el grado de inhibición obtenido con indometacina (Jumblatt y col., 1996). Para comprobar si la mayor potencia del diclofenac en las células estimuladas con LPS se debe a una mayor selectividad del mismo por la COX-2 expresada como consecuencia del efecto del LPS, sería interesante realizar un estudio de las mismas características utilizando un inhibidor selectivo de la COX-2, como por ejemplo el NS-398 (Futaki y col., 1993)

Analizando globalmente los resultados obtenidos con los glucocorticoides y comparándolos con los obtenidos con los AINES, llama la atención que ambos grupos de fármacos (glucocorticoides y AINES) no se comportan cualitativamente de forma semejante.

Así nuestros resultados muestran que la dexametasona inhibe de forma concentración-dependiente la producción PGE₂ inducida por A₂₃₁₈₇. Aunque fue menos potente que los AINES y menos eficaz, ya que incluso utilizando concentraciones 3 veces superiores a las de los AINES no se sobrepasó el 80% de inhibición. Sin embargo, cuando la síntesis de PGE₂ se

induce con LPS el grado de inhibición obtenido no es concentración dependiente y en ningún caso supera el 53% de inhibición.

La teoría según la cuál los glucocorticoides inhiben la reacción inflamatoria bloqueando la biosíntesis de PGE₂ a través de la inhibición a nivel de la PLA₂ es excesivamente simplista. Existen obviamente hallazgos experimentales y clínicos en la bibliografía (Kulkarni y col., 1994; Oluyomi y col., 1995) que muestran una acción multidireccional de los glucocorticoides responsables de su efecto antiinflamatorio.

En la actualidad no podemos afirmar que la dexametasona presente un único mecanismo capaz de inhibir la síntesis de PGE₂. A la vista de los datos encontrados en la bibliografía podemos decir que es capaz de actuar inhibiendo la expresión o la actividad de PLA₂ o la expresión de la COX-2. Así se ha demostrado que dexametasona es capaz de disminuir la síntesis de PGE₂ en fibroblastos humanos, al inhibir la inducción de la PLA₂ mediada por la IL-1 α (Lin y col., 1992). Esta misma acción se ha observado en la línea celular HeLa donde la dexametasona inhibe la inducción de PLA₂ pero no la fosforilación de la misma provocada por TNF α (Hoeck y col., 1993).

Por otra parte, el mecanismo inhibitor de la dexametasona sobre la síntesis de PGE₂ inducida por LPS no es siempre el mismo. Así, disminuye la expresión del ARNm de la COX-2 en macrófagos humanos (Arias -Negrete y col., 1995), mientras que experiencias realizadas en macrófagos alveolares y peritoneales de rata demostraron también que inhibe la expresión de las proteínas de la COX-2, pero no ejerció ningún efecto sobre las proteínas de la COX-1 (Wilborn y col., 1995). Otros estudios realizados in vivo apoyaron estos resultados, concluyendo que la dexametasona es capaz de inhibir la expresión de la COX-2 pero no afecta la expresión de la COX-1 (Masferrer y col., 1994 a,b). Estudios recientes sugieren que el efecto inhibitor de la dexametasona sobre la síntesis de PGE₂ inducida por LPS en células mononucleares sanguíneas humanas, se realiza a través de la lipocortina-1 que actúa inhibiendo la actividad de la PLA₂ (Sundlow y col., 1996).

Con esta técnica in vitro que hemos empleado sólo podemos apreciar la disminución cuantitativa en la producción de PGE₂ por las CECB pero no podemos identificar que enzimas han sido inhibidas en cada uno de los casos. Ahora bien podemos deducir que independientemente del enzima o enzimas que se inhiban en cada uno de los casos, la mayor

o menor acción de la dexametasona está en función del nivel del calcio intracelular disponible en cada momento, a tenor de los resultados obtenidos con el ionóforo del calcio A_{23187} . Así, cuando las células se tratan con A_{23187} , y se incrementan los niveles de calcio intracelular, se produce, por una parte un aumento de la fosforilación de la PLA₂, y por tanto de su actividad (Zor y col., 1990) y por otro lado, se facilita la translocación de dicho enzima a la membrana y su unión a los fosfolípidos (Yoshihara y Watanabe, 1990) favoreciendo así la liberación de AA endógeno libre. Estas dos acciones se van a traducir en un aumento de la producción de PGE₂. Por otra parte, la dexametasona induce la formación de lipocortinas, las cuales se unen a los fosfolípidos de la membrana en presencia de calcio bloqueando de este modo el acceso de la PLA₂ activada a su sustrato (Raynal y Pollard, 1994). Por tanto, si a la vez que se está activando toda la cascada de síntesis de PGE₂, tuviésemos una elevada producción de lipocortinas provocada por la presencia de la dexametasona, la PLA₂ accedería con dificultad a los fosfolípidos de membrana que contengan AA y de ahí que observemos una disminución en la producción PGE₂.

Sin embargo el LPS, aunque es capaz de activar la PLA₂ fosforilándola, no aumenta los niveles de calcio intracelular y, en consecuencia, menores cantidades de PLA₂ activada se translocarán a la membrana para actuar sobre su sustrato (Fouda y col., 1995). Probablemente en estas condiciones las lipocortinas inducidas por la presencia de dexametasona también se unirían en menor grado a los fosfolípidos de la membrana y el efecto inhibitorio obtenido sería mucho menor. Esta teoría se ve apoyada por los estudios realizados por Sundlow y colaboradores donde la dexametasona mediante la acción de la lipocortina-1 sólo inhibe un 30% la síntesis PGE₂ producida por LPS (Sundlow y col., 1996).

Hay que destacar, como ya hemos citado anteriormente, que el LPS también es capaz de inducir la COX-2, y aunque en nuestro caso no hemos cuantificado la inducción de dicho enzima, podríamos deducir a partir de los resultados obtenidos con diclofenac que la COX-2 sí se encuentra presente. Otra posible explicación sobre el efecto de dexametasona podría ser que ésta inhibiera la inducción de la COX-2, y por tanto el AA liberado sólo se metabolizaría a través de una sola ruta.

En cualquier caso, la potencia de la dexametasona difiere mucho de un tipo celular a otro, así en macrófagos de la línea J774.2 la dexametasona inhibe un 80% los metabolitos del

AA inducida por la acción de LPS mientras que sólo inhibe un 40% en células endoteliales de aorta bovina (Akarasereenont y col., 1995). Nuestros resultados demuestran que la dexametasona inhibe la liberación de PGE₂ de forma menos potente que los AINES, como han demostrado otros autores en células endoteliales de conejo sometidas a una lesión mecánica (Jumblatt y Willer, 1996).

Por último deberíamos destacar que a diferencia de dexametasona, prednisolona no fue capaz de modificar en ninguno de los casos la producción de PGE₂. No existen datos en la bibliografía donde se haya estudiado específicamente el efecto de la prednisolona sobre la PLA₂ o sobre la COX-2. Desde el punto de vista clínico la dexametasona presenta una potencia antiinflamatoria 6 veces mayor que la prednisolona, considerándose equivalentes en terapéutica 0,75 mg de dexametasona con 5 mg de prednisolona (Carreras y Jordano, 1995). Sin embargo, esta relación no se observa en nuestras condiciones experimentales, ya que ni tan siquiera la mayor concentración de prednisolona utilizada (30 μM) disminuyó la síntesis de PGE₂ por las CECB. Este hecho sugiere obviamente que la actividad antiinflamatoria de los glucocorticoides depende también de la inhibición de otros mediadores proinflamatorios además de la PGE₂. Sería interesante estudiar por lo tanto, el efecto de estos fármacos sobre la producción de otros posibles mediadores producidos por estas células que puedan participar en la reacción inflamatoria corneal.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la acción de los glucocorticoides depende de su unión con receptores situados en el citoplasma celular (Barnes y Adcock, 1993) y que dexametasona presenta mayor afinidad por estos receptores que prednisolona (Rang y col., 1995). Por otra parte, el número de receptores varía de unos tipos celulares a otros, y dentro de un mismo tipo celular el número de receptores es diferente para cada tipo de glucocorticoide (Schaeffers y Goppelt-Struebe, 1996). A pesar de que se ha demostrado la existencia de receptores glucocorticoide en las células del endotelio corneal (Wilson y col., 1994), hasta el momento no existe ningún estudio que demuestre la mayor o menor afinidad de los glucocorticoides conocidos por sus receptores en estas células, o el número de receptores existentes para cada tipo de glucocorticoide.

De este modo, la diferencia observada entre dexametasona y prednisolona en nuestras condiciones experimentales sobre CECB podría ser debida a que en este tipo de células el



Discusión

número de receptores para prednisona sea muy bajo con respecto a los existentes para dexametasona, o que prednisona presente baja o nula afinidad por este tipo de receptores y por tanto sea incapaz de desarrollar acción alguna sobre la síntesis de cualquier mediador producido por estas células.

En cualquier caso, no podemos concluir que la distinta acción de la prednisona sobre la síntesis de PGE₂, sea debida a una menor afinidad o a la existencia de un menor número de receptores de glucocorticoides en estas células.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CONCLUSIONES



1.- La liberación de PGE₂ por las células de endotelio corneal bovino en condiciones basales experimenta una autorregulación de su biosíntesis a las 24 horas.

2.- Las células de endotelio corneal bovino son capaces de utilizar el ácido araquidónico exógeno como sustrato para la síntesis de PGE₂.

3.- Tanto el ionóforo del calcio A₂₃₁₈₇ como el lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* incrementan la síntesis de PGE₂ por las CECB. Tan solo 10 minutos de incubación fueron suficientes para observar su efecto 24 horas después haber sido aplicada.

4.- Los fármacos antiinflamatorios estudiados pertenecientes al grupo de los AINES ejercen un efecto inhibitor sobre la síntesis de PGE₂ en CECB.

La eficacia de estos fármacos fue similar (superior al 95%), sin embargo la potencia de acción varió en función de los agentes estimulantes utilizados. Utilizando A₂₃₁₈₇ como estímulo de la síntesis de PGE₂ los valores de IC₅₀ obtenidos para diclofenac e indometacina fueron respectivamente 46,4±18,4 nM y 87,9±12,2 nM, mientras que al inducir la síntesis de PGE₂ con LPS la potencia de acción de ambos fue mayor (IC₅₀=16,7±3,5 nM para diclofenac, IC₅₀= 64,5±14,3 nM para indometacina). En ambos casos diclofenac fue mas potente que indometacina.



5.- El efecto de los glucocorticoides estudiados fue contradictorio. Mientras que prednisolona no ejerció efecto alguno sobre la síntesis de PGE₂, ni en condiciones basales ni inducida por cualquiera de los dos agentes utilizados, dexametasona sí mostró un efecto inhibitor, aunque diferente dependiendo del estímulo utilizado. La eficacia (80%) y potencia de acción (IC₅₀=370±90 nM) de la dexametasona sobre la síntesis de PGE₂ inducida por el ionóforo del calcio A23187 fue mayor que al utilizar LPS como estímulo, condiciones en las que la acción de la dexametasona fue independiente de la concentración utilizada, en un rango comprendido entre 0,1-30µM, no superando el 53% inhibición.

6.- El modelo farmacológico experimental presentado en esta memoria podría ser utilizado como sistema *in vitro* para determinar la potencia de acción de los AINES como bloqueantes de la síntesis de PGE₂ por las CECB. Así mismo podría indicar, aunque de forma indirecta, el índice de actividad antiinflamatoria. Sin embargo, no parece ser un método idóneo para medir la actividad antiinflamatoria de los glucocorticoides debido a su acción multifactorial.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

BIBLIOGRAFIA

Akarasereenont, P., Mitchell, J.A., Appleton, C., Thiemermann, C. y Vane, J.R. Involvement of tyrosine kinase in the induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in cultured cells. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1522-1528, 1994.

Akarasereenont, P., Mitchell, J.A., Bakhle, Y.S., Thiemermann, C. y Vane, J.R. Comparison of the induction cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 273: 121-128, 1995.

Alió, J.L., García, C. y Artola, A. Fisiopatología. En: Alió, Ruiz-Moreno, Carreras (Eds.) *Inflamaciones oculares.* Edika Med- Barcelona, pgs. 3-44, 1995.

Arffa, R.C. Anatomía. En: Graison: *Enfermedades de la Córnea.* Mosby División de Times Mirrow de España, S.A., pgs 1-32, 1992.

Arias-Negrete, S., Keller, K. y Chadee, K. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 582-589, 1995.

Balsinde, J., Diez, E. y Mollinedo, F. Arachidonic acid release from diacylglycerol in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266: 15638-15643, 1991.

Barnes, P.J. y Adcock, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanism. *Trends. Pharmacol. Sci.* 14: 436-441, 1993.

Bazan, H.E.P., Birkle, D.L., Beuerman R. y Bazan, N.G. Cryogenic lesion alters the metabolism of arachidonic acid in rabbit cornea layers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 474-480, 1985. (a)

Bazan, H.E.P., Birkle, D., Beuerman, R.W. y Bazan, N.G. Inflammation-induced stimulation of the synthesis of prostaglandins and lipoxygenase-reaction products in rabbit cornea. *Curr. Eye Res.* 4: 175-179, 1985. (b)

Bazan, H.E.P. Corneal injury alters eicosanoids formation in the rabbit anterior segment *in vivo.* *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 314 -319, 1987.

Bazan, H.E.P. The synthesis and effects of eicosanoids in avascular ocular tissues. En: Bito L.S. Stjernschantz J (Eds): *The Ocular Effects of Prostaglandin and Other Eicosanoids.* New York, Liss, pgs. 73-84, 1989.

Bazan, H.E.P. Response of inflammatory lipid mediators following corneal injury. En: Bazan, N.G. (Eds.) *Lipids mediators in eye inflammation,* New Trends Lipids Mediators Res. Basel, Karger, vol.5, pgs.1-11, 1990.

- Bendele, A.M., Benslay, D.N., Hom, J.T., Spaethe, S.M., Rutebories, K.L., Lindstrom, T.D., Lee, S.J. y Naismith, R.W.** Anti-inflammatory activity of BF 389, a Di-T-butylphenol, in animal models of arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 300-305, 1992.
- Berridge, M.J. y Irvine, R.F.** Inositol phosphate and cell signaling. *Nature* 341: 197-205, 1989.
- Betz, M. y Fox, B.S.** Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 146:108-113, 1991.
- Bhattacharjee, P.** Release of prostaglandin-like substances by *Shigella* endotoxin and its inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Br. J. Pharmacol* 54: 489-494, 1975.
- Bhattacharjee, P.** The role of arachidonate metabolites in ocular inflammation; in Bito L.S. Stjernschantz J (eds): *The Ocular Effects of Prostaglandin and Other Eicosanoids*. New York, Liss, pgs.211-227, 1989.
- Bhattacharjee, P. y Paterson, C.A.** Further investigation into the ocular effects of prostaglandin E2, leukotriene B4 and formyl-methionyl-leucyl phenilalanine. *Exp. Eye Res.* 51: 93-96, 1990.
- Bito, L.Z.** Prostaglandins. *Arch. Ophthalmol.* 105: 1036-1039, 1987.
- Bito, L.Z., Camaras, C.B. y Gum, G.G.** The ocular hypotensive effects and side effects of prostaglandin on the eye of experimental animals; in Bito L. S., Stjernschantz J (eds): *The Ocular Effects of Prostaglandin and Other Eicosanoids*. New York, Liss, pgs. 349-368, 1989.
- Blanco, A., Habib, A., Levy-Toledano, S. y Maclouf, J.** Involvement of tyrosine kinases in the induction of cyclo-oxygenase-2 in human endothelial cells. *Biochem. J.* 312: 419-423, 1995.
- Bussolino, F., Breviario, F., Tetta, C., Aglietta, M., Mantovani, A. y Dejana, E.** Interleukin 1 stimulates platelet activating factor production in cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77: 2027-2033, 1986.
- Campbell, W.B.** Prostaglandinas y leucotrienos. En: Clark-Brater-Johnson (Eds.) *Farmacología Médica*. Mosby, División de Times Mirror de España, S.A. pgs. 220-252, 1993.
- Carreras, B., Bermúdez, J. y Guerrero, J.C.** Inflamaciones de la córnea En: Alió, Ruiz-Moreno, Carreras (Eds.) *Inflamaciones oculares*. Edika Med- Barcelona, pgs. 187-203. 1995.
- Carreras, B. y Jordano, J.** Corticoesteroides En: Alió, Ruiz-Moreno, Carreras (Eds.) *Inflamaciones oculares*. Edika Med- Barcelona, pgs. 187-203. 1995.

- Carubelli, R., Nordquist, R. y Rowsey, J.** Role of active oxygen species in corneal ulceration. *Cornea*. 2: 161-169, 1990.
- Chakraborti, S. y Michael, J.R.** Role of serine esterase in A₂₃₁₈₇- mediated activation of phospholipase A₂ in pulmonary endothelium. *Am. J. Physiol.* 264: L538-L542, 1993.
- Coleman, R.A., Smith, W.L. y Narumiya, S.** VIII. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological Reviews* 46: 204-229, 1994.
- Davidson F.F. y Dennis E.A.** Biological relevance of lipocortins and related proteins as inhibitors of phospholipase A₂. *Biochem. Pharmacol.* 38:3645-3651, 1989.
- De Kozak, Y., Nordman, J.P., Faure, J.P., Rao, N.A. y Marak, G.E.** Effect of antioxidant enzymes on experimental uveitis in rats. *Ophthalmic. Res.* 21: 230-234, 1989.
- De Witt, D.L.** Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1083: 121-134, 1991.
- Del Maestro, R.F.** An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.* 492: 153-168, 1980.
- Eakins K.E., Whitelocke R.A.F., Bennett A. y Martnet A.C.** Prostaglandin like activity in ocular inflammation . *Br Med J* 3: 452-453 , 1972 (a).
- Eakins, K.E., Whitelocke, R.A.F., Perkins, E.S., Bennet, A. y Unger, W.G.** Release of prostaglandin in ocular inflammation in the rabbit. *Nature* 239: 248-249, 1972 (b).
- Elias, J.A., Gustilo, K., Baeder, W. y Freundlich, B.** Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 138: 3812-3816, 1987.
- Evans, R.M.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 247: 889-895, 1988.
- Fatt, I. y Weissman, B.A.** Cornea II: Metabolism, oxygen, carbon dioxide and contact lens wear. En: Fatt y Weissman (Eds.) *Physiology of the eye*. Butterworth-Heinemann (U.S.A.), pgs. 151-204, 1992.
- Ferreira, S.H.** Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature*, 240: 200-203, 1972.
- Ferreira, S.H. y Vane, J.R.** Mode of action of anti-inflammatory agents which are prostaglandin synthetase inhibitors. En: *Anti-inflammatory Drugs* (eds. J.R. Vane and S.H. Ferreira), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 50/II, pgs.348-398, 1979.

- Ferreira, S.H., Nakamura, M. y Castor, M.S.A.** The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E₂. *Prostaglandins*, 16: 31-37, 1978.
- Feurstein, N., Foegh, M. y Ramwell, P.W.** Leukotriene C₄ and D₄ induce prostaglandin and thromboxane release from peritoneal macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 72: 389-391, 1981.
- Fischbarg, J., Hernandez, J., Liebovitch, L.S. y Koniarek, J.P.** The mechanism of fluid and electrolyte transport across corneal endothelium: critical review and update of a model. *Curr. Eye Res.* 4: 351-360, 1985.
- Flach, A.J.** Cyclo-oxygenase inhibitors in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* 36: 259-284, 1992.
- Flower, R.J. y Rothwell, N.J.** Lipocortin-1: cellular mechanism and clinical relevance. *Trends. Pharmacol. Sci.* 15: 71-76, 1994.
- Fouda, S.I., Molski, T.F.P., Ashour, M.S.E. y Sha'afi, R.I.** Effect of lipopolysaccharide on mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A₂. *Biochem. J.* 308: 815-822, 1995.
- Fu, J.Y., Masferrer, J.L., Seibert, K., Raz, A. y Needleman, P.** The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 16737-16740, 1990.
- Fujino, O Li, Whitcup, S.M., Nussenblatt, R.B. y Chan, C.C.** Association between mast cells and the development of experimental uveitis in different rat strains. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. ARVO Meeting. Abstract issue*, 32: 1297-1335, 1991.
- Futaki, N., Arai, I., Hamasaka, Y., Takahashi, S., Higuchi, S. y Otomo, S.** Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 45:753-755, 1993.
- Gans, K.R., Galbraith, W., Roman, R.J., Haber, S.B., Kerr, J.S., Schimdt, W.K., Smith, C., Hewes, W.E. y Ackerman, N.R.** Antiinflammatory and safety profile of DuP 697, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254:180-187, 1990.
- Gelb, M.H., Jain, M.K. y Otto, G.B.** Inhibition of phospholipase A₂. *FASEB J.* 8: 916-924, 1994.
- Gerritsen, M.E., Rimarachin, J., Perry, C.A. y Weinstein, B.I.** Arachidonic acid metabolism by cultured bovine corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30: 698-705, 1989.
- Gierse, J.K., Hauser, S.D., Creely, D.P., Koboldt, C., Rangwala, S.H., Isakson, P.C. y Seibert, K.** Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem. J.* 305: 479-484, 1995.

Glaser, K.B., Mobilo, D., Chang, J.Y. y Senko, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. *Tips review*. Vol.14 : 92-98, 1993 (a).

Glaser, K.B., Sung, A., Bauer, J. y Weichman, B.M. Regulation of eicosanoids biosynthesis in the macrophage. *Biochem. Pharmacol.* 45: 711-721, 1993 (b).

Goetzl, E.J., An, S. y Smith, W.L. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB-J.* 9: 1051-1058, 1995.

Gómez, L.A., Ramis, J., Julve, J., García-Rafanell, J. y Forn J. The effect of fosfosal and acetylsalicylic on leukocyte migration and PGE₂ concentration in experimentally induced acute inflammation. *European J. Pharmacol.* 147: 459-463, 1988.

Goodwin, J.S., Bankhurst, A.D. y Messner, R.P. Supresion of human T-cell mitogenesis by prostaglandins. *J.Exp.Med.* 146: 1719-1726, 1977.

Graf, H., Ruf, H. y Ullrich, V. Prostacyclin synthase, a cytochrome P450 enzyme. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22:487-488, 1983.

Grimminger, F., Von-Kurten, I., Walmarath, D. y Seeger, W. Type II alveolar epithelial eicosanoids metabolism: predominance of cyclooxygenase pathways and transcellular lipoxygenase metabolism in co-culture with neutrophils. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 6: 9-16, 1992.

Habenich, A.J.R., Salbach, P., Goering, M., Zeh, W., Janssen-Timmen, W., Blattner, C., King, C. y Glomset J.A. The LDL receptor pathway delivers aracidonic acid for eicosanoids formation in cells stimulated by platelet derived growth factor. *Nature Lond.* 345: 634-636, 1990.

Haeringen , N.J.V., Verbey, N.L.J. y Delft, J.L.V. Antagonist and inhibitors of lipid mediators in experimental inflammation of the cornea. *Journal of Ocular Pharmacology* 9:365-372, 1993.

Hamberg, M., Svensson, J. y Samuelsson, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 345- 351, 1974.

Hamberg, M. y Samuelson, B. Prostaglandins endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 3400-3404, 1974.

Hansen, H.S. 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase. A review. *Prostaglandins* 12: 647-665, 1976.

Haurand, M. y Ullrich, V. Isolation and characterization of thromboxane synthase from human platelets as a P-450 enzyme. *J. Biol. Chem.* 260: 15059- 15067, 1985.

- Haynes, W.L., Proia, A.D. y Klintworth, G.K.** Effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30: 1588-1593, 1989.
- Higgs, G.A., Palmer, R.M.J., Eakins, K.E. y Moncada, S.** Arachidonic acid metabolism as a source of inflammatory mediators and its inhibition as a mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Molec. Aspects Med.* 4: 275-301, 1981.
- Hirschelmann, R., Hentschel, M., Geissler, J. y Rickinger, O.** CGP 28238 a new potent nonsteroidal antiinflammatory agent: its relation to arachidonic acid metabolism. *Agents Actions* 32: 54-55, 1991.
- Hoeck, W.G., Ramesha, C.S., Chang, D.J., Fan, N. y Heller, R.A.** Cytoplasmic phospholipase A₂ activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: Dexamethasone blocks the induced synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 4475-4479, 1993.
- Hsu, P., Shibata, M. y Leffler, C.W.** Prostanoid synthesis in response to high CO₂ in newborn pig brain microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 264: H1485-H1492, 1993.
- Joyce, N.C., Joyce, S.J., Powell, S.M. y Meklir, B.** EGF and PGE₂: effects on corneal endothelial cell migration and monolayer spreading during wound repair *in vitro*. *Curr. Eye Res.* 14: 601-609, 1995.
- Jumblatt, M.M. y Paterson, C.A.** Prostaglandin E₂ effects on corneal endothelial cyclic adenosine monophosphate synthesis and cell shape are mediated by a receptor of the EP₂ subtype. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32: 360-365, 1991.
- Jumblatt, M.M.** Autocrine regulation of corneal endothelium by prostaglandin E₂ *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 2783-2790, 1994.
- Jumblatt, M.M. y Willer, S.S.** Corneal endothelial repair. Regulation of prostaglandin E₂ synthesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 1294-1301, 1996.
- Jumblatt, M.M., Stidam, J.M. y Patel, A.D.** Phospholipase signalling pathways in cultured corneal endothelium. ARVO Meeting. Abstract issue 1095, 1996.
- Kass, M.A., Neufeld, A.H. y Sears, M.L.** Systemic aspirin and indomethacin do not prevent the response of the monkey eye to trauma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 14: 604-606, 1975.
- Kennedy, B.P., Chan, C.C., Culp, S.A. y Cromlish, W.A.** Cloning and expression of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)-2 cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197: 494-500, 1993.

Kirschenbaum, M.A., Lowe, A.G., Trizna, W. y Fine, L.G.J. Regulation of vasopressin action by prostaglandins. Evidence for prostaglandin synthesis in the rabbit cortical collecting tubule. *Clin. Invest.* 70: 1193-1204, 1982.

Klyce, S.D. y Beurman, R.W. Structure and function of the cornea. En: Kaufman-McDonal-Banon-Waltman (Eds.). *The cornea.* Churchill-Livingstone Inc., pgs. 3-54, 1989.

Kubes, P. y Granger, D.N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am. J. Physiol.* 262: 611-615, 1992.

Kulkarni, P. Eicosanoids in ocular inflammation. En: Bazan, N.G. (Eds.) *Lipids mediators in eye inflammation, New Trends Lipids Mediators Res.* Basel, Karger vol.5, pgs. 12-28, 1990.

Kulkarni, P., Bhattacharjee, P. y Paterson, C.A. Dexamethasone inhibits interleukin-1 release in endotoxin-uveitis model. *Exp. Eye Res.* 58: 637-638, 1994.

Lee Stock, E., Roth, S.I., Kim, E., Kay Walsh, M. y Thammant, R. The effect of platelet-activating factor (PAF), histamine and ethanol on vascular permeability of the guinea pig conjunctiva. *Invest.Ophthalmol.Vis. Sci.* 31: 987-992, 1990.

Lewis, R.A. y Austen, K.F. Mediation of local homeostasis and inflammation by leukotrienes and other mast cell-dependent compounds. *Nature* 293: 103-108, 1981.

Lin, N., Bazan, H.E., Braquet, P. y Bazan, N.G. Prolonged effect of a new platelet-activating factor antagonist on ocular vascular permeability in an endotoxin model of uveitis. *Curr.Eye Res.* 10: 19 -24, 1991.

Lin, L.L., Lin, A.Y. y DeWitt D.L. Interleukin-1 α Induces the accumulation of cytosolic phospholipase A2 and the release of prostaglandin E2 in human fibroblast. *J. Biol.Chem.* 267: 23451-23454, 1992.

Linssen, M., Engels, W., Lemmens, P., Heijnen, V., Van Bilsen, M. Reneman, R. y Van Der Vusse, G. Production of arachidonic acid metabolites in adult rat cardiac myocytes, endothelial cells, and fibroblast-like cells. *Am. J. Physiol.* 264: H973-H982, 1993.

Liu, P., Wen, M., Sun., L. y Hayashi, J. Activation of phospholipase A2 and stimulation of prostaglandin E2 production by transforming growth factor-alpha in rat thymic epithelial cells requires influx of calcium. *Biochem. J.* 293: 109-113, 1993.

MacCallum, D.K., Lillie, J.H., Scaletta, L.J., Occhino, J.C., Frederick, W.G. y Ledbetter, S.R. Bovine corneal endothelium in vitro. *Exp. Cell Res.* 139: 1-13, 1982.

Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C. y Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3228-3232, 1994a.

Masferrer, J.L., Reddy, S.T., Zweifel, B.S., Seibert, K., Needleman, P., Gilbert, R.S. y Herschman, H.R. In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 1340-1344, 1994b.

Marshall, W.S. y Klyce, S.D. Cellular and paracellular pathway resistances in the tight Cl⁻ secreting epithelium of the rabbit cornea. *J. Membr. Biol.* 73: 275-282, 1983.

Matsumoto, T., Tao, W. y Sha'afi, R.I. Demonstration of calcium-dependent phospholipase A₂ activity in membrane preparation of rabbit neutrophils. *Biochem. J.* 250: 343-348, 1988.

McPhee, T.J., Bourne, W.M. y Brubaker, R.F. Location of the stress-bearing layers of the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26: 869-872, 1985.

Mishima, S. y Maurice, D. The effect of normal evaporation on the eye. *Exp. Eye Res.* 1: 46-52, 1961.

Mishima, S. y Hedbys, B.O. The permeability of the corneal epithelium and endothelium. *Exp. Eye Res.* 6: 10-32, 1967.

Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J. y Vane, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11693-11697, 1994.

Mitchell, J.A., Larkin, S. y Williams, T.J. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 50: 1535-1542, 1995.

Moilanen, E., Kirkkola, A.L., Kankaanranta, H, Nieminen, M.M. y Vapaatalo, H. Interactions between synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ in isolated polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 17: 705-714, 1993.

Moncada, S., Ferreira, S.H. y Vane, J.R. Sensitization of pain receptors of dog knee joints by prostaglandins. In: *Prostaglandin Synthetase Inhibitors* (eds. H.J. Robinson and J.R. Vane), Raven Press, New York, pgs.189-195, 1974.

Moncada, S. y Vane, J.R. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessels walls. *New England Journal of Medicine* 300: 1142-1146, 1979.

Morita, I., Schindler, M., Regier, M.K., Otto, J.C., Hori, T., DeWitt, D.L. y Smith, W.L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and-2. *J. Biol. Chem.* 270: 10902-10908, 1995.



Narumiya, S., Hirata, N., Namba, T. y Hayashi, Y. Structure and function of prostanoid receptors. *J. Lipid . Mediat.* 6: 155-161, 1993.

Negishi, M., Sugimoto, Y. y Ichikawa, A. Molecular mechanism of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1259: 109-119, 1995.

Neufeld, E.J. y Majereus, P.W. Arachidonate release and phosphatidic acid turnover in stimulated human platelets. *J.Biol. Chem.* 258: 2461-2467, 1963.

Neufeld, A.H., Jumblatt, M.M., Matkin, E.D. y Raymond, G.M. Maintenance of corneal endothelial cell shape by prostaglandin E₂: Effects of EGF and indomethacin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27: 1437-1442, 1986.

Nüsing, R. y Ullrich, V. Regulation of cyclooxygenase and thromboxane synthase in human monocytes. *FEBS* 206: 131-136, 1992.

O'Banion, M.K., Winn, V.D. y Young, D.A. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4888-4892, 1992.

Oluyomi, A.O., Nguyen, H., Towbin, H., Dawson, J. y Vosbeck, K. Differential effects of prednisolone and indomethacin on zymosan-induced inflammation in a modified murine tissue-chamber model. *Inflamm. Res.* 44: 350-356, 1995.

O'Neill, C. The biochemistry of prostaglandins: a primer. *Aust. NZ. J. Obstet. Gynaecol.* 34: 3: 332-337, 1994.

O'Neill, L.A.J. y Lewis, G.P. Inhibitory effect of diclofenac and indomethacin on interleukin-1 induced changes in PGE₂ release. *Biochem. Pharmacol.* 38: 3707-3711, 1989.

Oullet, M. y Percival, D. Effects of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem. J.* 306: 247-251, 1995.

Parks, D.J., Cheung, M.K., Chan, C.C. y Roberge, F.G. The role of nitric oxide in uveitis. *Arch. Ophthalmol.* 112: 544-546, 1994.

Piper, P.J. y Vane, J.R. The release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature*, 223:29-35, 1969.

Pressman, B. Biological applications of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 501-530, 1976

Rago, R., Mitchen, J. y Wilding, G. DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Anal. Biochem.* 191: 31-34, 1990.

Rang, H.P. y Dale, M.M. Sistema Endocrino. En: Rang-Dale (Eds.) Farmacología. Longman Group UK Limited pgs. 506-574, 1995.

Raynal, P. y Pollard, H.B. Annexins: the problem of assesing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1197: 63-69, 1994.

Revtyak, G.E., Buja, Johnson, A.R. y Campbell, W.B. Cultured bovine coronary arterial endothelial cells synthesize HETE's and prostacyclin. *Am. J. Physiol.* 254: C8-C19, 1988.

Ruiz-Moreno, J.M. y Alió, J.L. Antiinflamatorios no esteroideos. En: Alió, Ruiz-Moreno, Carreras (Eds.) *Inflamaciones oculares.* Edika Med- Barcelona, pgs. 3-44. 1995.

Salmon, J.A., Simmons, P.M. y Moncada, S. The effects of BW755C and other anti-inflammatory drugs on eicosanoids concentrations and leukocyte accumulation in experimentally-induced acute inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 35:808-813, 1983.

Samples, J.R., Boney, R.S. y Rosenbaum, J.T. Ocular inflammatory effects of intravitreally injected interleukin-2. *Curr. Eye Res.* 12: 649-654, 1993.

Schaeffers, H.J. y Goppelt-Struebe, M. Interference of corticoesteroids with prostaglandin E2 synthesis at the level of cyclooxygenase-2 mRNA expression in kidney cells. *Biochem. Pharmacol.* 52: 1415-1421, 1996.

Schalkwijk, C., Vervoordeldonk, M., Pfeilschifter, J., Marki, F. y Van den Bosch, H. Cytokine and forskolin induced synthesis of group II phospholipase A2 and prostaglandin E2 in rat mesangial cells is prevented by dexamethasone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 46-52, 1991.

Seibert, K., Mansferrer, J.L., Needleman, P. y Salvemi, D. Pharmacological manipulation of cyclo-oxygenase-2 in the inflamed hydronephrotic kidney. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1016-1020, 1997.

Shen, Y. y Birkle, D.L. Intracamerally injected platelet activating factor (PAF) induces marked intraocular inflammatory reactions. *Curr. Eye Res.* 11: 1067-1078, 1992.

Shibata, Y., McCaffrey, P.G., Minowada, J., Volkman, A. y Oghiso, Y. Regulation of phospholipase A2 activation and arachidonic acid metabolism in an interleukin-3-dependent macrophage-like cell line. *J. Leukoc. Biol.* 51: 32-38, 1992.

Simmons, D.L., Levy, D.B., Yannoni, Y. y Erikson R.L. Identification of phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 86: 1178-1182, 1989.

Sirko, S., Bishai, I. y Cocceani, F. Prostaglandin formation in the hypothalamus in vivo: effect of pyrogens. *Am. J. Physiol.* 256: R616-R624, 1989.

Skorpik C., Paroussis P., Grasl, M. y Gnad H.D. Effect of indomethacin on aqueous PGE₂ levels in rabbits following ocular trauma. *Graete's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 225: 447-451, 1987.

Smith, W.L. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu. Rev. Physiol.* 48: 251-262, 1986.

Smith, W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanism of action. *Biochem. J.* 259: 315- 324, 1989.

Smith, W.L. Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* 263: F181-F191, 1992.

Smith, W.L., Marnett, L.J. y De Witt, D.L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol. Ther.* 49: 153-179, 1991.

Solomon, L.M., Juhlin, L. y Kirchenbaum, M.B. Prostaglandins on cutaneous vasculature. *J. Invest. Derm.* 51: 280-282, 1968.

Stanifer, R.M., Robert K.S. y Kretzer, F.L. Cornea. En: Aderson (Eds.) *Biochemistry of the eye.* American Academy of Ophthalmology, pgs,23-47, 1983.

Stitt, J.T. Prostaglandin E as the mediator of the febrile response. *Yale J. Biol. Med.* 59: 137-149, 1986.

Stuehr, D.J. y Nathan, C.F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cell. *J. Exp.Med.* 169: 1543-1555, 1989.

Sundlow, A.W., Carey, F., Forder, R. y Rothwell, N.J. The role of lipocortin-1 in dexamethasone-induced suppression of PGE₂ and TNF- α release from human peripheral blood mononuclear cells. *J. Pharmacol.* 117: 1449-1456, 1996.

Taiwo, O.Y. y Levine, J.D. Characterization of the arachidonic acid metabolism mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. *Brain Research,* 458: 402-406, 1988.

Taiwo, O.Y. y Levine, J.D. Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Reseach,* 537: 372-374, 1990.

Todd, P.A. y Clissold, S.P. Naproxen. A reapraisal of its pharmacology, and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states. *Drug.* 40: 91-137, 1990.

Toris, C.B., Camras, C.B. y Yablonski, M.E. Effects of PhXA41 a new prostaglandin F₂ alpha analog, on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmology* 100: 1297-1304, 1993.

Bibliografía

Urdiain, G y Díaz Flores, I. Túnicas del globo ocular. En: Urdiain, Díaz Flores (Eds.) *Histología del ojo y sus anexos*. A.G. Cuscó-Barcelona, pgs. 24-38, 1977.

Vane, J.R. y Botting, R.M. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* 1; 89-96, 1987.

Vane, J.R. y Botting, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm. Res.* 44: 1-10, 1995.

Verbey, N.L., Van-Haeringen, N.J. y De Jong, P.T. Modulation of immunogenic keratitis in rabbits by topical administration of inhibitors of lipoxygenase and cyclooxygenase. *Curr. Eye Res.* 7:361-368, 1988.

Victorov, A.V. y Hoek, J.B. Secretion of prostaglandins elicited by lipopolysaccharide and ethanol in cultured rat kupffer cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 215: 691-697, 1995.

Waite, M. y VanDeenan, L.L.M. Hydrolysis of phospholipids and glycerides by rat liver preparations. *Biochimica et Biophysica Acta* 137:498-507, 1967.

Waltman, S.R. y Hart, W.M. La Córnea. En: Moses R.M. y Hart W.H. *Adler Fisiología del ojo. Aplicación clínica*. Ed. Médica Panamérica S.A. Buenos Aires, pgs. 51-74, 1988.

Wilborn, J., DeWitt, D.L. y Peters-Golden, M. Expression and role of cyclooxygenase isoforms in alveolar and peritoneal macrophages. *Am. J. Physiol.* 268: L294-L301, 1995.

Williams, R.N., Alvarez, H. y Patterson, C.A. Relative efficacy of anti-inflammatory corticosteroids in cornea. *Cornea* 2: 303-307, 1983.

Williams, T.J. y Peck, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilation in inflammation. *Nature*, 270: 530-532, 1977.

Willis, A.L. Release of histamine, kinin and prostaglandins during carrageenin-induced inflammation of the rat. In: *Prostaglandins, Peptides and Amines* (eds. P. Mantegazza and E.W. Horton), London, Academic Press, pgs. 33-38, 1969.

Wilson, S.E., Lloyd, S.A. y He, Y.G. Glucocorticoid receptor and interleukin-1 receptor messenger RNA in corneal cells. *Cornea* 13: 4-8, 1994.

Wu, K.K., Sanduja, R., Tsai, A.L., Ferhanoglu, B. y Loose-Mitchell, D.S. Aspirin inhibits interleukin-1-induced prostaglandin H synthase expression in cultured endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 2384-2387, 1991.

Yoshihara, Y. y Watanabe, Y. Translocation of phospholipase A2 from cytosol to membranes in rat brain induced by calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 484-490, 1990.



Bibliografía

Zhao, C. y Sichi, H. Immunocytochemical localization of prostaglandin E₂ receptor subtypes in porcine ocular tissues. II. Non uveal tissues. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 11: 437-445, 1995.

Zor, U., Her E., Harell, T., Fischer, G., Naor, Z., Barquet P., Ferber, E. y Reiss, N. Arachidonic acid release by basophilic leukemia cells and macrophages stimulated by Ca⁺² ionophores, antigen and diacylglycerol: Essential role for protein kinase C and prevention by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Acta* 1091: 385-392, 1990.