



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Sevilla

Fármacos de uso oftálmico, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo

Trabajo de Fin de Grado

Nombre: Pablo Serrano Giménez

Grado: Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría.

Fecha: Junio, 2018



**Doble Grado en
Farmacia, Óptica y
Optometría**
Pablo Serrano Giménez

**Fármacos de uso oftálmicos,
situación actual y nuevos
fármacos en desarrollo**
Trabajo de Fin de Grado



Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia
Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Título: Fármacos de uso oftálmico, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo

Autor: Pablo Serrano Giménez

Lugar y fecha de presentación: Facultad de Farmacia.
(15/06/2018)

Departamento: Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia

Tutor: Fernando Iglesias Guerra

Tipología del proyecto: Trabajo de Fin de Grado bibliográfico.



**Doble Grado en
Farmacia, Óptica y
Optometría**
Pablo Serrano Giménez

**Fármacos de uso oftálmicos,
situación actual y nuevos
fármacos en desarrollo**
Trabajo de Fin de Grado



RESUMEN:

En la actualidad la prescripción de medicamentos para uso oftálmico es de gran importancia, debido a las características únicas del medio ocular. En este trabajo de fin de grado se presenta una revisión bibliográfica de dos fármacos de uso oftálmico para dos patologías frecuentes, como son el glaucoma y el ojo seco. El primero es el latanoprost, explicándose como se concibió a partir de derivados de las prostaglandinas hasta llegar al fármaco actual según un proceso de cribado, probando diferentes derivados a partir de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ natural. También su mecanismo de acción, mediante la participación de unas enzimas llamadas metaloproteinasas que reducen la resistencia al paso del humor acuoso a través del cuerpo ciliar, y las diversas rutas de síntesis por las cuales se ha fabricado industrialmente a lo largo del tiempo, con el objetivo de mejorar los rendimientos de los procesos de síntesis. Sin olvidarnos de las perspectivas de futuro frente a esta patología. El segundo es el SkQ1, un antioxidante novedoso para el ojo seco, realizándose una revisión de la posible conexión de esta patología con el estrés oxidativo. Asimismo, se presenta la forma de actuación de la familia de antioxidantes a la que pertenece, mediante la actuación de la plastoquinona, prostanoide que se encuentra en cloroplastos y la posible eficacia que conlleva. También se describe la síntesis que ha llevado a la producción de dicho fármaco por sus creadores, y los diferentes ensayos clínicos que puedan justificar el lugar que puede ocupar este dentro de la patología que trata.

Palabras clave: Latanoprost, SkQ1, síntesis del latanoprost, síntesis del SkQ1, mecanismo de acción del Latanoprost, mecanismo de acción del SkQ1, antioxidante, prostaglandina, análogo de prostaglandina, ojo seco, glaucoma, tratamiento del ojo seco, tratamiento del glaucoma.



1. INTRODUCCIÓN:	1
1.1 Latanoprost y el glaucoma	1
1.2 SkQ1 y el ojo seco.....	3
2. OBJETIVOS	6
3. METODOLOGÍA	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4.1 Latanoprost.....	7
4.1.1 Desarrollo químico del latanoprost	7
4.1.2 Mecanismo de acción del latanoprost	9
4.1.3 Síntesis del latanoprost.....	12
4.1.4 Presente y futuro del tratamiento del glaucoma	15
4.2 SkQ1.....	16
4.2.1 El estrés oxidativo y el ojo seco	16
4.2.2 Desarrollo e investigaciones de los cationes transportadores.....	18
4.2.3 El papel de la plastoquinona como antioxidante	19
4.2.4 Mecanismo moleculares de acción de la plastoquinona.....	21
4.2.5 Síntesis del SkQ1 y derivados	24
4.2.6 Estudio de las propiedades fisicoquímicas de la familia de SkQs.....	26
4.2.7 Estudio de las capacidades antioxidantes de la familia de SkQs.....	27
4.2.8 Estudios <i>in vivo</i> y ensayos clínicos del SkQ1	30
5. CONCLUSIONES	32
6. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	33



1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Latanoprost y el glaucoma

El glaucoma ha sido una de las enfermedades más clásicas en relación con el sistema visual. En cuanto a su epidemiología, aunque es difícil trabajar con datos exactos, se le considera la segunda causa de ceguera en el mundo, siendo una enfermedad en la que la aproximadamente la mitad de los que la padecen lo desconocen, siendo el glaucoma de ángulo abierto el de más prevalencia (Cortés et al., 2007). En esencia, es una neuropatía óptica donde se ve afectado el nervio óptico, principalmente por un aumento de la presión intraocular (hipertensión intraocular) dentro del propio globo ocular (James B et al., 2012). Este daño al nervio genera pérdidas progresivas de campo y agudeza visual central, debido al daño en las células glangionares de la retina, manifestándose con el deterioro en la superficie de la retina y en la cabeza del nervio óptico (Cortés et al., 2007).

El más fundamental factor de riesgo es la hipertensión intraocular. La presión intraocular está muy influenciada por el equilibrio entre la producción y eliminación del humor acuoso. En situaciones normales, el humor acuoso se produce en el epitelio ciliar mediante una combinación de secreciones activas y pasivas (Bowling, 2016). Una vez producido, pasa desde la cámara posterior por medio de la pupila a la cámara anterior, y una vez allí, es drenado por 3 vías principales: la vía trabecular o convencional, que drena el 90 - 95 % del humor acuoso a través de la malla trabecular (un entramado compuesto principalmente de fibras celulares entrecruzadas) situado cerca del borde del iris, y el conducto de Schlemm, situado en la esclera prelímbica que dirige el humor hacia las venas episclerales y finalmente al torrente sanguíneo. La siguiente vía es la vía uveoescleral o no convencional, drenando entre un 4 – 10 %, en la que el humor acuoso pasa a la parte anterior del cuerpo ciliar, para introducirse al espacio supracoroideo y drenándose a la circulación venosa de la esclera y coroides. Y por último también el humor acuoso se puede drenar a través del iris, pero es minoritario (Bowling, 2016).

De modo que, para reducir esta hipertensión hay dos modos de actuación. Disminuyendo la producción de humor acuoso, como es el mecanismo de agonistas α -adrenérgicos como la apraclonidina, de los bloqueantes β -adrenérgicos como el timolol o de los inhibidores de la anhidrasa carbónica como la dorzolamida. O aumentando la eliminación de humor acuoso, como es el caso de los agonistas colinérgicos como la pilocarpina (aumentando la eliminación por la vía trabecular) o los análogos de las prostaglandinas (aumentando la eliminación por la vía uveoescleral).

Sobre estos últimos, que es de los que versa este TFG, la idea de su uso para la reducción de la presión intraocular (PIO) se remonta finales de los 70 del siglo pasado, cuando autores como Bito LZ o Stjerschantz J entre otros, encontraron que la prostaglandina $F_{2\alpha}$ y sus derivados reducían los niveles de presión ocular en animales de experimentación (Bito et al., 1977) (Camras et al., 1981) (Bito et al., 1989) (Stjerschantz et al., 1993). También intentaron esclarecer, de manera teórica, que el mecanismo de actuación de estos fármacos era incrementando el flujo uveoescleral del humor acuoso (Nilsson et al., 1989). Se encontró que, derivados de la $PGF_{2\alpha}$, como por ejemplo el derivado de isopropil ester (IE), reducían la PIO en animales, por lo que se investigó para su ensayo clínico en humanos, por parte de una compañía llamada Pharmacia, en Uppsala, Suecia.

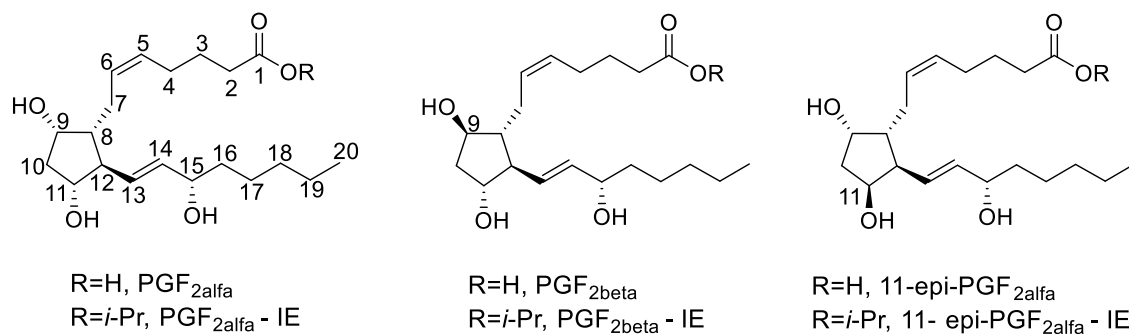




Figura 1. $PGF_{2\alpha}$, y sus epímeros, $PGF_{2\beta}$ y 11-*epi*- $PGF_{2\alpha}$.

En el primer ensayo clínico que hizo ese laboratorio no se observó, o se observó apenas efecto en la PIO en los pacientes, argumentando que probablemente fuese porque eran pacientes refractarios a todos los tratamientos disponibles. Sin embargo, después se publicaron otros ensayos donde se vio que sí disminuía la PIO, pero en menor cantidad que los fármacos para el glaucoma en ese momento y con un factor en contra, los efectos secundarios. Estos eran, sobre todo, irritación conjuntival e hiperemia conjuntival, y llegando con las dosis más altas (10 μ g) a producir dolor y fotofobia (Villumsen et al., 1989).

De esta manera, los investigadores pusieron todos sus esfuerzos en averiguar el mecanismo de acción y en si era posible separar la acción hipotensora de los efectos secundarios, ya que, en un principio, la $PGF_{2\alpha}$ -IE no parecía una alternativa ventajosa con respecto a otras medicaciones.

Investigadores como Crawford y Kaufman, 1987 y el mencionado arriba, Nilsson, 1989 confirmaron que las prostaglandinas reducían la PIO sin afectar a la producción del humor acuoso, ni tampoco afectando a la barrera hemato-acuosa, de manera que la explicación más razonable que se dio fue que era por un incremento del drenaje del humor acuoso, pero a través de la vía uveoescleral (Gabeh et al., 1989), ya que se demostró también que la vía trabecular sufría pocas

	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optimetría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

variaciones, de modo que la $PGF_{2\alpha}$ -IE actuaba de forma predominante sobre la primera vía de drenaje del humor acuoso mencionada (Gabeh et al., 1990).

Otro punto importante era saber si era posible separar los efectos terapéuticos de reducción de la PIO, de los efectos secundarios, como la hiperemia y la irritación. Estudios posteriores demostraron que, junto con derivados de la $PGF_{2\alpha}$, en concreto dos epímeros de este, como la $PGF_{2\beta}$ o el 11-*epi*- $PGF_{2\alpha}$ (Figura 1), los efectos mióticos, sobre la PIO y la irritación eran diferentes para cada uno de ellos, de manera que se podía separar dichas actividades en principio (Resul et al., 1997).

¿Entonces, como pasar de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ a un derivado realmente eficaz y cuál era su principal mecanismo de acción? Se hablará de ello en el apartado de resultados y discusión.

1.2 SkQ1 y el ojo seco

En las tres últimas décadas ha habido un creciente interés sobre la patología del ojo seco, la cual se le ha dado el estatus de enfermedad (Craig et al., 2017). Según los criterios diagnósticos, puede tener una prevalencia entre el 0,39 hasta el 30 % en personas de más de 50 años. Este informe mundial sobre el ojo seco de 2017 citado arriba lo define como:

“El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por una pérdida de la homeostasis de la película lagrimal, acompañada de síntomas oculares, en los cuales la inestabilidad de la película lagrimal, la hiperosmolaridad, el daño y la inflamación de la superficie ocular y las anormalidades neurosensoriales juegan papeles etiológicos.”

La clasificación del ojo seco (Craig et al., 2017) es bastante extensa, pero de manera resumida es:

- Ojo seco con deficiencia acuosa (ADDE en inglés): Relacionado con el Síndrome de Sjogren (primario o secundario a enfermedades inflamatorias) o no relacionado con el Síndrome de Sjogren (edad, obstrucción del conducto lagrimal...)
- Ojo seco evaporativo (EDE en inglés): Intrínseco (disfunciones en las glándulas de Meibomio, dermatitis...) o extrínseco (Déficit de vitamina A, porte de lentes de contacto, alergias...)

El primer estudio a nivel mundial del ojo seco en 2007 contribuyó al estudio de esta enfermedad comentando que, a pesar de los diferentes factores iniciadores de la enfermedad, llevan a un camino fisiopatológico común en el cual la hiperosmolaridad de la lágrima y la cadena de eventos inflamatorios crean un círculo vicioso que perpetúan el progreso de la enfermedad (Bron et al., 2017).

Todo empieza en la causa del ojo seco, ya sea por una menor producción de lágrima (ADDE) como por una lágrima que se evapora más rápidamente (EDE), por lo que el volumen de la película lagrimal disminuye, creándose una lágrima que sigue conteniendo componentes no acuosos, pero en menos volumen, de modo que se concentran dichos componentes, haciendo que la osmolaridad de la lágrima aumente, dañando las células directamente. Pero además ese aumento crearía una cascada de señalización en las células epiteliales de la superficie ocular que finalmente degenerarían en la producción de diferentes mediadores inflamatorios como la IL-1, el TNF- α , o las MMPs. Esto hace que, paralelamente, se produzca el reclutamiento y activación de linfocitos-T y demás células inflamatorias, que exacerban esa inflamación. En resumen, la hiperosmolaridad ejerce un daño directo, pero también indirecto a través de mediadores inflamatorios. Todo esto genera daños en células epiteliales, células caliciformes y al glicocáliz epitelial, que permite adherir la mucina a la superficie ocular. Junto con daños mecánicos (ausencia de lubricación en el parpadeo, por ejemplo), acaban por reducir la estabilidad de la película lagrimal que, junto con los factores etiológicos iniciales, hacen que la lágrima se hiperosmolarice aún más, cerrando el círculo vicioso que hace que la enfermedad se perpetúe y cronifique. Aunque si bien es cierto que algunas situaciones como la xeroftalmia, la alergia, conservantes tópicos o el uso de lentes de contacto, entre otros, pueden iniciar el ojo seco desde la inestabilidad de la lágrima, seguidamente se volvería a dar el círculo de nuevo (Bron et al., 2017).

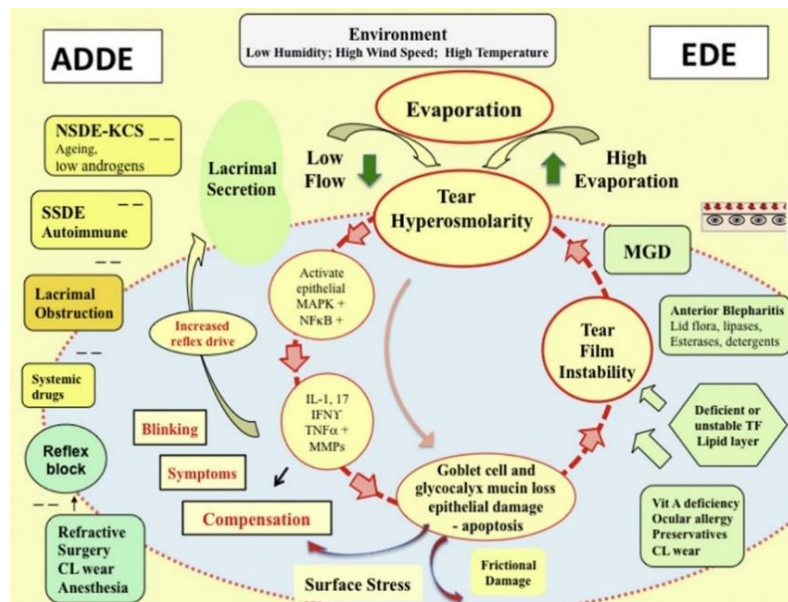




Figura 2. Ciclo vicioso fisiopatológico del ojo seco (Bron et al., 2017).

Sin embargo, en el apartado clínico, existen mecanismos compensatorios. La hiperosmolaridad y el enfriamiento de la superficie pueden desencadenar un aumento de la secreción lagrimal y al aumento de la frecuencia de parpadeo (Bron et al., 2017). Por otro lado, estos mecanismos hacen



	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optimetría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

que el inicio de la enfermedad pueda manifestarse bajo una forma asintomática, sin detectar signos ni síntomas de la enfermedad, pero es cuando estos mecanismos dejan de ser suficientes cuando empiezan a aparecer los síntomas de la enfermedad, tales como: disconfort, escozor o ardor en los ojos, sensación de rascado, mucosa fibrosa en los ojos o a su alrededor, irritación ocular excesiva debido al humo o al viento, exceso de lágrimas o molestias al usar lentes de contacto (Bron et al., 2017).

En cuanto al tratamiento del ojo seco, el tratamiento va a depender del tipo de ojo seco que sea, pero en general el primer tratamiento suelen ser lágrimas artificiales, de muchas diferentes composiciones, las cuales poseen una base acuosa. Para favorecer la lubricación y prolongar el tiempo de permanencia en la superficie ocular un gran número de agentes viscosizantes son incorporados como el ácido hialurónico o colágeno, entre muchos otros (Jones et al., 2017). Estas, pueden incrementar el grosor de la película lagrimal, proteger la superficie de la desecación, mantener el grosor fisiológico corneal, mejorar la densidad de células caliciformes y los síntomas del ojo seco (Wegener et al., 2015).

Sin embargo, estos sustitutos de las lágrimas fisiológicas no focalizan sobre la fisiopatología del ojo seco en cuestión, es decir, son tratamientos paliativos, ya que solo actúan sobre los síntomas y no sobre sus causas, por lo que, en los casos más graves o refractarios, se requieren soluciones de otra índole según el grado de severidad de la enfermedad. Como por ejemplo aparatos para favorecer la secreción de las glándulas de Meibomio (LipidFlow), antibióticos, corticoides (tópicos, u orales en casos más graves), secretagogos orales, inmunomoduladores tópicos (ciclosporina), sueros autólogos o alogénicos, lentes de contacto terapéuticas, cirugía, entre muchos otros (Jones et al., 2017).

Ahora bien, todos estos tratamientos tienen como objetivos diferentes partes del globo ocular en función del diagnóstico, por ejemplo: la inflamación de las células en la glándula lagrimal, la obstrucción o dilatación de las glándulas de Meibomio, la queratopatía epitelial o la queratitis filamentosa en la córnea... (Bron et al., 2017). Sin embargo, existe una manera de interrumpir el ciclo vicioso del ojo seco de una manera diferente y novedosa a las anteriores y es de la que se va a discutir en este TFG, que es el estrés oxidativo, mediante el uso de una molécula especialmente diseñada para combatir dicha causa, el SkQ1.

	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

2. OBJETIVOS

El objetivo primordial de este TFG es realizar una revisión bibliográfica actualizada de dos moléculas de aplicación oftálmica, el latanoprost y el SkQ1, analizando como se concibieron y los precedentes que justificaron su desarrollo, así como también investigar sobre su mecanismo de acción, las síntesis que se han utilizado o se utilizan para su fabricación y su posición dentro del espectro terapéutico de las enfermedades que les ocupa.

3. METODOLOGÍA

La realización de este TFG se ha hecho gracias a la búsqueda de información primero de manera general en los apartados de tratamientos de las patologías estudiadas en libros especializados en materia de oftalmología y farmacología como: Oftalmología, diagnóstico y tratamiento (James B, Bron A), Farmacología ocular (Cortés Valdés C, Encinas JL) o Oftalmología clínica (Brad B, Kanski J). Posteriormente se indagó más a fondo en bases de datos de artículos científicos como PubMed, Scifinder o Sciencedirect, utilizando términos de búsqueda como: latanoprost, prostaglandins analogue, SkQ1, antioxidant, dry eye... Una vez conocidos los conceptos generales, se concretó la búsqueda para explicar las peculiaridades de cada molécula: FP receptor, MMPs, structure-activity of latanoprost, synthesis of latanoprost, mitochondria-targeted antioxidant, ROS y dry eye, age-related eye disease, synthesis SkQ1, plastoquinone, ubiquinone... Llegando a revistas de contenido científico especializadas en síntesis química, oftalmología clínica, farmacología ocular, bioquímica, relacionadas con prostaglandinas, con el envejecimiento y especies reactivas de oxígeno...

También se ha utilizado programas de edición de imágenes para ciertas figuras, así como también el ChemDraw 16.0 para la confección de algunos esquemas de química y el Microsoft Word para la edición de este trabajo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Latanoprost

4.1.1 Desarrollo químico del latanoprost

¿Entonces, como pasar de una prostaglandina al latanoprost que tenemos actualmente?

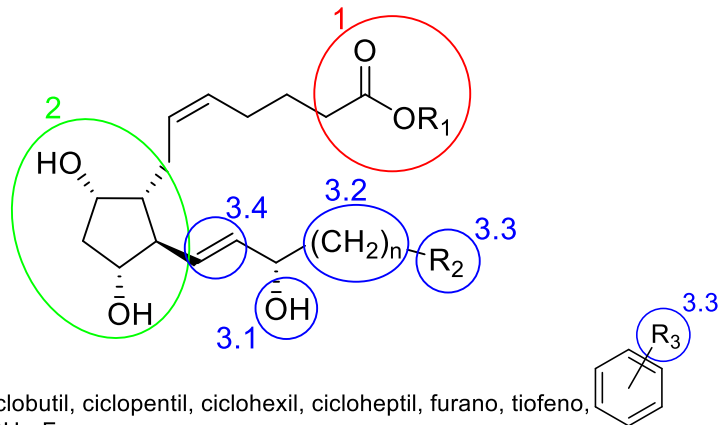




Figura 3. Puntos de desarrollo de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ para producir análogos (Stjerschantz, 2001).

El laboratorio de Pharmacia, liderado por Stjerschantz J y Resul B, estableció 3 puntos clave:

- 1) El primero fue modificar el ácido carboxílico situado en el final de la molécula, que llevaron a estudiar diferentes ésteres. Ninguno supuso una mejora muy notable en el mecanismo farmacológico, pero sí mejoró la potencia antihipertensiva, ya que, al convertirse en un profármaco, su tasa de absorción a través de la superficie epitelial y llegada al espacio intraocular, eran mayores, debido a su mayor hidrofobicidad. Una vez en el interior se hidroliza a su correspondiente ácido carboxílico. Se eligió el éster isopropílico (Resul B et al., 1997).
- 2) En segundo lugar, se probó a modificar el anillo de ciclopentano y su estereoquímica, que resultó en moléculas como la ya citada 11-*epi*- $\text{PGF}_{2\alpha}$, con una inversión de configuración en dicho carbono, que llevó a tener propiedades mióticas con agonismo por el receptor FP, pero no reducía la PIO. Asimismo, la inversión de configuración en el carbono 9, resultó en una molécula que no inducía miosis y era menos irritante que la $\text{PGF}_{2\alpha}$, pero 100 veces menos potente que esta para reducir la PIO, por lo que se dejó como estaba originalmente (Resul B et al., 1997).
- 3) En tercer lugar, se investigó la modificación de la cadena alquílica (la que no lleva el resto ácido) de la molécula. Aquí sí se vio que podía haber cierto potencial, ya que se modificaron varios elementos de esta cadena:

	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

3.1) El grupo hidroxilo del carbono 15 se vio que era fundamental para la actividad, ya que los derivados dehidrogenados correspondientes, sin ese grupo hidroxilo, perdían gran parte de su efecto biológico (Stjerschantz, 2001). Así como también modificar ese hidroxilo a un grupo ceto, venía con efectos no deseados como afectación de la barrera hemato-acuosa de los animales de experimentación (Stjerschantz, 2001).

3.2) La longitud de la propia cadena también se estudió. Los diferentes análogos, todos con un grupo fenilo al final de la cadena, fueron estudiados en gatos y en primates, prestando especial atención a los efectos mióticos y nociceptivos. Comprobaron que la longitud ideal era cuando el grupo fenilo se situaba en el carbono 17 (17-fenil-18,19,20-trinor-PGF_{2α}-IE), ya que la respuesta miótica no resultaba comprometida además de abolirse completamente el efecto irritante. En contraste a esto, la molécula 16-fenil-17,18,19,20-trinor-PGF_{2α}-IE con un carbono menos, resultó en irritación, aunque menos que PGF_{2α}-IE original. La elongación de la cadena por encima del carbono 17 resultó en una disminución de la actividad biológica, ya que no reducía la PIO de manera contundente como lo hacía el 17-fenil-PGF_{2α}-IE (Stjerschantz, 2001). De alguna manera, a base de prueba y error, se llegó a la longitud ideal para que la interacción fármaco receptor fuese mayor que la prostaglandina natural y sin irritación, sin saber de manera exacta como interaccionaban ambos componentes.

3.3) A continuación se investigó la posibilidad de cambiar ese anillo en la posición ω (en el extremo) de la cadena, probando diferentes análogos con anillos desde el ciclopropil hasta compuestos aromáticos como el tiofeno o el furano. Se observó que colocando un fragmento cíclico (cualquiera de los estudiados) en esa posición reducía los efectos secundarios, pero que en algunos casos cambiaba sus efectos biológicos, de modo que se mantuvo el fenilo (Resul B et al., 1997).

Siguiendo en esta línea, se produjeron diversos análogos, pero esta vez introduciendo grupos funcionales en este anillo final. Introducir un grupo metilo (CH₃) en posiciones *orto* y *meta* no cambiaron los efectos mióticos del 17-fenil-18,19,20-trinor-PGF_{2α}-IE. Sin embargo, introducirlo en la posición *para*, redujo significativamente la actividad, casi con total certeza por motivos estéricos. Un grupo atractor de electrones como el grupo trifluorometilo (CF₃) en las posiciones *orto* y *para* redujeron la actividad, mientras que en la posición *meta* lo hizo en menor proporción. Lo mismo sucedió con un grupo donador de electrones, como un grupo metoxi (OCH₃). De este modo sacaron la conclusión de que las posiciones *orto* y *para* estaban muy afectadas estéricamente a la hora de la interacción fármaco-receptor, mientras que la posición *meta* no tanto. De modo que dejaron el fenilo sin añadir ningún sustituyente, aunque dejaron claro que posibles

modificaciones en el anillo no estudiadas podrían ser de utilidad para desarrollar nuevos fármacos (Resul B et al., 1997).

3.4) Y por último el doble enlace en el carbono 13. Se investigó que la saturación de ese doble enlace daba lugar a un compuesto que mejoraba la interacción con el receptor de alguna manera, pero no supieron darle una explicación razonable, además de mejorar su estabilidad química (Resul B et al., 1997).

Con todo esto, el 13,14-dihidro-15*R,S*-17-fenil-18,19,20-trinor-PGF_{2α}-IE se convirtió en el candidato a ser el nuevo fármaco, y a la mezcla de diastereoisómeros se le llamó PhXA34. Más tarde se comprobó que el isómero 15*R* era el más potente, de modo que pasó a ser el candidato a fármaco final, llamándose PhX41, más conocido más tarde como latanoprost. En resumen, el desarrollo de este fármaco fue debido a un proceso de cribado, es decir, modificar una estructura con cierta actividad y probar diferentes derivados, ya que no se sabía perfectamente la interacción entre el principio activo y el receptor en cuestión, es decir, no se sabía que aminoácidos del receptor interaccionaban con que parte de la molécula. Modificando y probando diferentes análogos como se describe arriba, se llegó al primero que producía una reducción de la PIO clínicamente considerable y sin tantos efectos adversos, de manera que fuese una alternativa frente a los tratamientos en aquel tiempo. Este principio activo sería el componente fundamental del Xalatan[®], medicamento de venta en farmacia para el tratamiento del glaucoma.

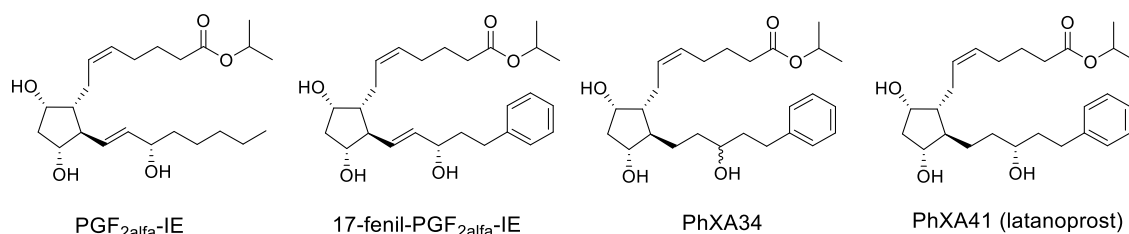


Figura 4. Principales moléculas en el desarrollo del latanoprost (Stjerschantz, 2001).

4.1.2 Mecanismo de acción del latanoprost

El latanoprost es un fármaco análogo a la PGF_{2α} humana, de modo que es un agonista de los receptores de prostaglandinas, pero difiere de la prostaglandina natural en que tiene diferentes perfiles de unión a los diferentes receptores. Stjerschantz J en 2001 observa como la concentración efectiva media (CE₅₀) de la PGF_{2α}, 17-fenil-18,19,20-trinor-PGF_{2α}, y el latanoprost difieren, como se ve en la tabla 1.

Existen multitud de receptores de prostanoïdes entre los que se encuentran: el receptor FP, los receptores EP₁, EP₂ y EP₃, el receptor IP de prostaciclina, los múltiples receptores DP o el receptor TP de tromboxanos.



Se observa en la tabla 1 que el ácido del latanoprost (forma libre una vez que se metaboliza) es un agonista total del receptor FP y de los receptores EP₁ y EP₃, no teniendo o teniendo muy poco agonismo sobre los receptores EP₂, IP, DP y TP. Comparándolo con la PGF_{2α}, el latanoprost es mucho más selectivo por el receptor FP, ya que la PGF_{2α} es agonista de prácticamente todos los receptores (posiblemente causando los efectos secundarios), mientras que si se compara con el 17-fenil-18,19,20-trinor-PGF_{2α}, este último tiene cierto agonismo sobre el receptor TP, lo que les llevó a pensar que la saturación del doble enlace en la posición 13 del latanoprost incrementaba la flexibilidad de la cadena alquílica, no teniendo ningún beneficio sobre la interacción con el receptor FP, pero que reducía la potencia sobre los receptores EP₁ y TP (Stjerschantz, 2001).

	FP		EP ₁		EP ₂		EP ₃		IP/DP		TP	
	Potencia	Eficacia	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E
1	1,2 x 10 ⁻⁸	100	3,2 x 10 ⁻⁷	100	6,4 x 10 ⁻⁶	100	1,6 x 10 ⁻⁷	100	> 10 ⁻⁴	0	> 10 ⁻⁴	~20
2	4,5 x 10 ⁻⁹	100	6,5 x 10 ⁻⁷	100	> 10 ⁻⁴	0	> 10 ⁻⁴	0	> 10 ⁻⁴	0	3,4 x 10 ⁻⁵	~50
3	1,0 x 10 ⁻⁸	100	5 x 10 ⁻⁶	100	2,8 x 10 ⁻⁵	0	2,8 x 10 ⁻⁵	~80	> 10 ⁻⁴	0	> 10 ⁻⁴	0

Tabla 1. Potencia basada en los valores de CE₅₀ medidos mediante ensayo de unión a receptores de 1: PGF_{2α}; 2: 17-fenil-18,19,20-trinor-PGF_{2α}; y 3: Latanoprost (Stjerschantz, 2001).

En concreto, el que más interesa es el receptor FP, ya que es la diana terapéutica del latanoprost. Se trata de un receptor transmembrana acoplado a proteína G que posee 7 subunidades y que se encuentra en distintos tejidos del cuerpo humano, como por ejemplo en los ovarios, fibroblastos cardíacos, células vasculares musculares, y en el sistema ocular como los procesos ciliares oculares (Zhang et al., 2010). Es precisamente en estos últimos tejidos donde el latanoprost actúa en su totalidad. Se demostró que es fundamental para la actuación del latanoprost que existiese ese receptor, ya que en ratones modificados genéticamente sin el receptor FP, los análogos a prostaglandinas como el latanoprost o el bimatoprost no tuvieron ningún efecto sobre disminuir la PIO (Ota et al., 2005).

Diversos estudios han hipotetizado sobre la cadena de eventos que suceden en el transcurso de la aplicación de los análogos a prostaglandinas. El posible mecanismo de acción más plausible es una remodelación de la matriz extracelular (MEC) del cuerpo ciliar, ya que se ha visto como, tras la acción del fármaco, se produce un aumento de los espacios entre los haces del músculo ciliar,

	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

facilitando el drenaje por la vía uveoescleral debido a una menor resistencia al paso del flujo por el músculo, por lo que la PIO disminuiría (Cortés et al., 2007). Normalmente el recambio o metabolismo del MEC viene determinado por unas proteínas llamadas metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Las MMPs son una gran familia de endopeptidasas que dependen de zinc y calcio para su funcionamiento, las cuales hidrolizan secuencias peptídicas de proteínas extracelulares. Se han establecido 4 familias: las gelatinasas, degradan el colágeno de la membrana basal y proteoglicanos; Las colagenasas, que degradan el colágeno del tejido conectivo; Las estromelinas, que degradan laminina, fibronectina, elastina, o proteoglicanos; Y una MMP de membrana implicada en la activación de la gelatinasa A (Cortés C et al., 2007). Hipotetizaron que el tratamiento con latanoprost parece que induce: una reducción de la síntesis biológica de nuevos componentes de la MEC, un aumento de la destrucción de estos o cambios en sendos puntos anteriores a modo de “limpieza” de la MEC (Lindsey et al., 1997).

Ahora bien, cuando el fármaco se une al receptor FP, se induce una cascada de segundos mensajeros. 1) Este receptor activa al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, a través de la proteína G_{aq} , con la formación de inositol trifosfato y consiguiente movilización del calcio intracelular, y la activación de la protein quinasa C (Winkler y Fautsch, 2014). Esto finalmente activa a la proteína quinasa activada por mitógenos MAPK, que será la encargada de activar la transcripción de proteínas a través de factores nucleares de transcripción; 2) Por otro lado, este receptor activa también a la proteína G_{oi} , que activa diversas especies de la familia de proteínas Rho, que controlan el reordenamiento citoesquelético y la formación de fibrillas de actina (Winkler y Fautsch, 2014); 3) Adicionalmente a estas dos vías, también se ha relacionado a la $PGF_{2\alpha}$ y sus análogos con la activación de la vía de señalización WNT (wingless/integrase 1). Empieza con la activación del receptor de factores de crecimiento asociado a la fosfolipasa C, que finalmente activa a una proteína llamada β -catenina, que puede translocarse al núcleo y funcionar como un activador transcripcional de diversas enzimas (Winkler y Fautsch, 2014).

A modo general, se observó que la $PGF_{2\alpha}$ y sus análogos (latanoprost, bimatoprost...) inducían la producción de proteínas como el factor de crecimiento precoz-1 (EGR-1), el factor de crecimiento de tejido (CTGF), factor-1a hipoxia-inducible (Hif-1a), c-fos o Cyr61 entre otros. Todos estos regulan el remodelamiento de la MEC, a través de activación de las MMPs. Por lo tanto, lo que evidencia esto es que, una activación de los receptores FP consiguen activar factores de transcripción para la producción de MMPs, y que son estas las que remodelan en gran medida la MEC de los procesos ciliares (Winkler y Fautsch, 2014).

En concreto, el tratamiento con latanoprost y bimatoprost llevó a la inducción de la producción de las MMP-1 (colagenasa-1), -3 (estromelina-1) y -9 (gelatinasa B) en las células musculares



ciliares. La MMP-1 degrada el colágeno tipo I, II y III, mientras que la MMP-9 lo hace con los tipos IV y V. La MMP-3 abarca la degradación de bastantes proteínas (fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanos...), además de tener cierta influencia en la activación de las MMP-1 y -9, siendo por tanto decisiva en todo el proceso de remodelamiento de la MEC (Winkler y Fautsch, 2014) (Lindsey et al., 1997).

Todo esto implica la degradación de gran parte del colágeno y demás proteínas formadoras de la MEC de los procesos ciliares, sin que haya un aumento de la TIMP (proteínas que inhiben a las MMPs), por lo que las fibras ciliares quedan más retraídas, hay más espacio entre ellas, ofreciéndose por tanto una menor resistencia mecánica al paso del flujo del humor acuoso (Winkler y Fautsch, 2014), por lo que el drenaje uveoescleral se vería aumentado casi un 60 % (Stjernschantz, 2001).

Ahora bien, todo lo expuesto anteriormente es un proceso normalmente lento, que requiere bastantes horas, incluso días, de modo que no se podía explicar la disminución de la PIO en 2 h que producía típicamente el latanoprost. Autores como Winkler y Fautsch, 2014, teorizaron que las tres vías intracelulares de señalización eran también responsables de la relajación inicial del músculo ciliar, que junto con la liberación de calcio, la reducción de la PIO se mantenía primero, por la relajación del músculo ciliar, y después por la remodelación de la MEC efectuada por el latanoprost (Cortés C et al., 2007) (Winkler y Fautsch, 2014).

4.1.3 Síntesis del Latanoprost

A continuación, se discutirá sobre las síntesis que ha tenido esta molécula y derivados relacionados con el paso del tiempo. Hay multitud de síntesis y puntos de aproximación, por lo que solo se mencionarán las más importantes para el desarrollo de este TFG. Haciendo un relato cronológico:

1969: Fue en los años 1969-1971 cuando Corey EJ y su equipo de la Universidad de Harvard desarrollaron un método para la síntesis de prostaglandinas de manera sintética, eficaz y con un rendimiento aceptable, aunque en 17 pasos. En concreto, desarrollaron un método para obtener un intermediario clave que se utilizaría en todas las síntesis de prostaglandinas siguientes, la lactona de Corey. Con esta lactona, se puede obtener prostaglandinas de forma controlada estéricamente, ya que en su estructura sus sustituyentes tienen la misma orientación espacial que en las prostaglandinas observadas en la naturaleza. La síntesis completa está descrita en la referencia (Corey et al., 1969) o de forma esquemática en siguiente enlace web:

<https://www.synarchive.com/syn/8>

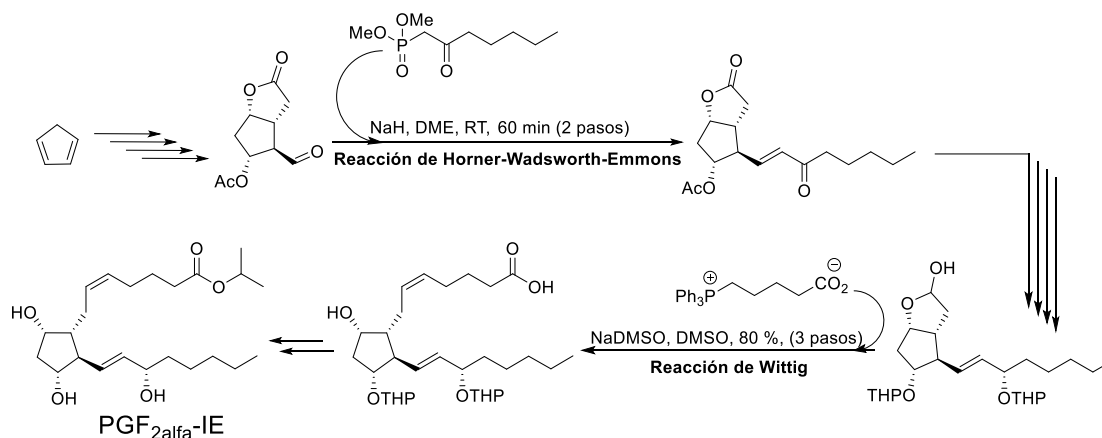


Figura 5. Síntesis resumida de la síntesis de Corey en 1969.

1993: En este año, el grupo de trabajo de Pharmacia en Suecia liderados por Stjernschantz JW publica la síntesis del latanoprost, aunque aún no había recibido dicho nombre común, entre otros derivados sin el doble enlace entre el C13 y C14, siguiendo la síntesis clásica de Corey con algunas modificaciones. (Resul et al., 1993).

2007: Martynow y sus colaboradores publican un nuevo punto de vista sintético. Utilizan una síntesis no lineal, donde sintetizan 3 bloques: el derivado hemiacetálico de la lactona de Corey con un grupo sulfona, la cadena superior de la molécula protegida y la cadena alquílica a partir de D-manitol como fuente de quiralidad, consiguiendo un gran rendimiento. En la síntesis completa se consigue un 16,9 % de rendimiento (Martynow et al., 2007).

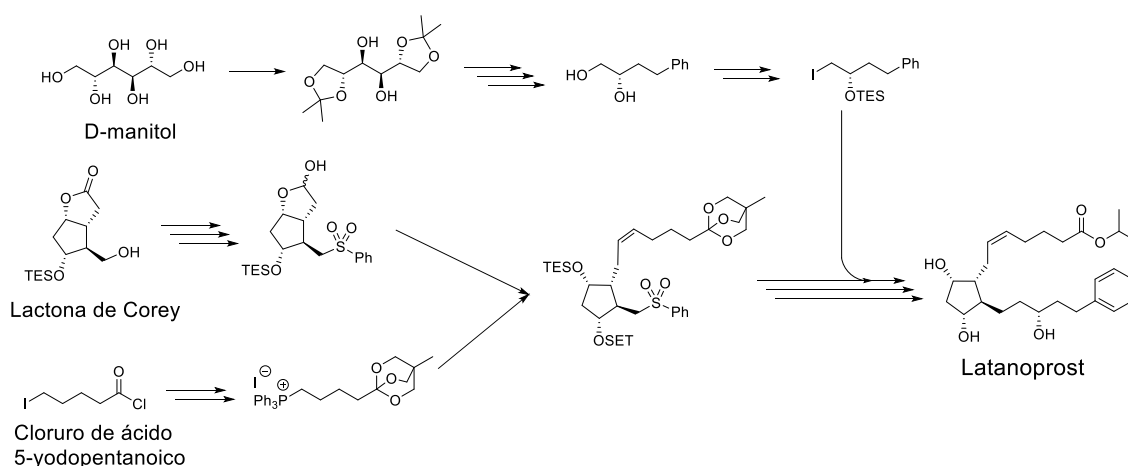


Figura 6. Puntos clave de la síntesis de Martynow en 2007.

2010: Zanoni et al. investigaron la posibilidad de realizar una de las etapas clave de la síntesis, la introducción de la cadena alquílica de forma distinta a la propuesta tradicional, llamada reacción de Horner-Wadsworth-Emmons. La epimerización de los centros estereogénicos de la molécula,

que son bastante lábiles o la formación de productos secundarios en función de los reactivos básicos empleados para la desprotonación en este proceso eran sus inconvenientes (Zanoni et al., 2010). En su lugar, utilizan una reacción que se llama reordenamiento de Meyer-Schuster, una reacción que requiere condiciones de reacción más favorables, menos agresivas, menor carga de catalizador y estereoselectividad absoluta (Zanoni et al., 2010).

2014: Contente et al. propusieron una nueva alternativa a la síntesis clásica. En este estudio se propuso cambiar diversas etapas de la síntesis que se hacían de forma puramente química: Empezando por la reducción estereoselectiva de **2**, la hidrogenación de la insaturación de **3** con Pd/C y la hidrólisis del éster para dar el compuesto **4**. Sin embargo, estas reacciones podrían ser llevadas a cabo enzimáticamente mediante enoato reductasas (reducen dobles enlace C=C), dehidrogenasas (reducen grupos carbonilos C=O) y esterasas (hidrolizan los ésteres). Se realizó un screening para ver que cepas de levaduras podrían dar las reacciones deseadas, y una vez seleccionadas se optimizó la síntesis variando las condiciones de incubación y los sustratos. Finalmente, se propuso que una cepa no convencional de *Pichia anomala* era la que realizaba un mejor trabajo de síntesis con las condiciones y sustratos indicados en la referencia, para después continuar con la síntesis tradicional hasta llegar al Latanoprost (Contente et al., 2015).

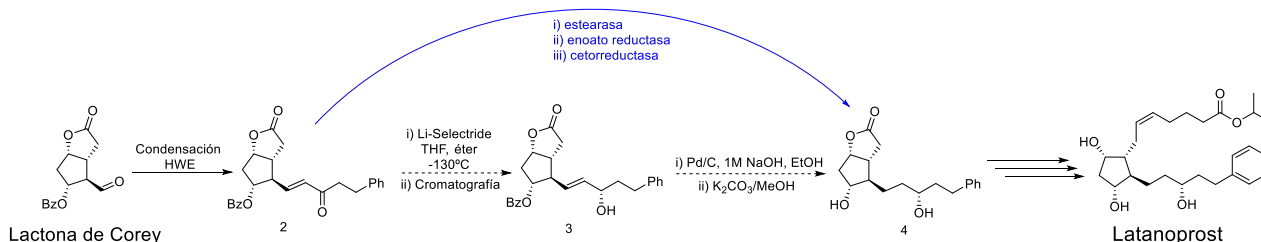


Figura 7. Nueva aproximación de los pasos claves posibles para realizar enzimáticamente (Contente et al., 2015).

2015: Y lo último publicado, aun con todas las síntesis anteriores, Prévost et al. introdujeron un camino alternativo (fig. 8). Las variantes de la lactona de Corey son reactivos bastante caros, pero en esta síntesis se llega a un enol bicíclico intermedio, que no es la lactona de Corey, a partir de succinaldehído, un reactivo más asequible, además de completar la síntesis completa en 7 pasos y con un equilibrio enantiomérico del 99 % (el enantiómero más potente se encuentra en un 99 % en la mezcla). Esto implica una síntesis en menos pasos (menos manipulación) y con unos intermedios con una pureza enantiomérica alta, por lo que se dan menos subproductos no deseados. Se obtuvo un rendimiento aproximado del 18,8 % (Prévost et al., 2015), lo cual puede no parecer mucha mejora, pero desde el punto de vista químico sí la es. Estas últimas síntesis nos indican que la síntesis de estos derivados sigue en constante estudio, buscando maneras de

abaratar la síntesis para producir más cantidad, con más rendimiento y con menos subproductos intermedios no deseados.

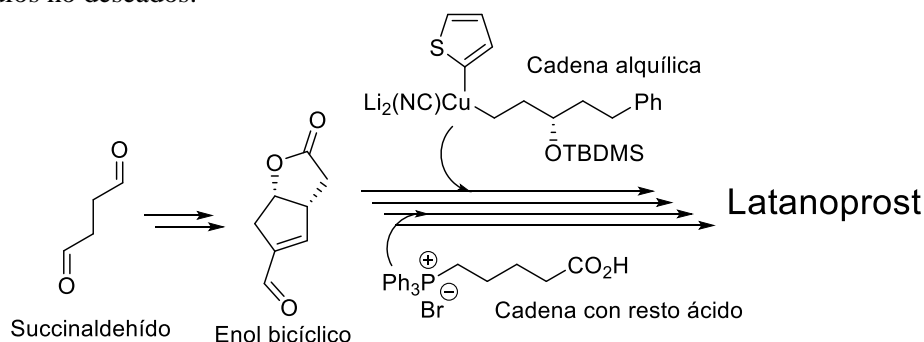


Figura 8. Puntos clave de la síntesis de Prévost en 2015 utilizando un enol bicíclico.

4.1.4 Presente y futuro del tratamiento del glaucoma

Actualmente, el latanoprost se considera de primera línea contra el glaucoma. Pero el desarrollo de los prostanoideos no terminó ni ha terminado todavía, otros análogos como el bimatoprost, tafluprost o el travoprost también han sido desarrollados y comercializados siendo también utilizados en la terapéutica actual, con diferentes perfiles de reducción de la PIO, por lo que el latanoprost no es el único utilizado. También combinaciones con otro tipo de fármacos antiglaucomatosos como el timolol o dorzolamida se han comercializado y son de gran utilidad.

Se siguen descubriendo y desarrollando nuevas propiedades del latanoprost, como que por ejemplo pueda tener un efecto neuroprotector (Yamamoto et al., 2017) o que puede asociarse a un donador de óxido nítrico (latanoprostene bunod) para producir un descenso de la PIO por las dos vías, la convencional (por el nítrico) y la no convencional (por el latanoprost), presentando una mayor reducción de la PIO que la monoterapia de latanoprost y timolol (Weinreb et al., 2015) (Medeiros et al., 2016). Se comercializó en diciembre del 2017 con el nombre de Vyzulta®.

Se han descubierto nuevos análogos de prostanoideos, en concreto prostaciclina, agonistas de los receptores EP₃ y FP, que han empezado a investigarse. En 2006 se vio que los receptores EP podían tener cierta regulación en la PIO (Yamane et al., 2015) y en el 2015 empiezan a aparecer artículos de científicos japoneses sobre una nueva molécula ONO-9054 en forma de profármaco, que libera la forma activa ONO-AG-367, capaz de agonizar sobre los dos receptores, consiguiendo una reducción de la PIO más acusada que con el latanoprost. Son prostaciclina modificadas, con un ciclo de 7 miembros, un heterociclo en la posición ω con grupos electrón-atrayentes, y una cadena con el resto ácido más corta. Características que harán posible su mecanismo dual, que no está del todo dilucidado (Yamane et al., 2015). Aunque todavía esté en investigación, consigue, en principio, mejores reducciones de la PIO que el latanoprost (Miller et al., 2017). En los próximos años veremos cuál es en profundidad este mecanismo dual y si

realmente sale al mercado como medicamento, ya que su síntesis también se ha empezado a estudiar (Miller et al., 2017) (Yamane et al., 2015) (Sugimoto et al., 2017) (Suto et al., 2015).

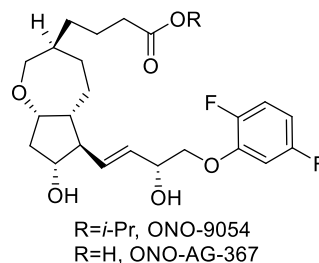


Figura 9. Nuevos derivados de prostaciclina en estudio para el glaucoma (Yamane et al., 2015).

Por último, destacar que otros fármacos con otros mecanismos de acción están siendo también desarrollados, como los inhibidores ROCK (inhibidores de Rho kinasa), como el Rhopressa[®], que producen una relajación de las fibras que forman la malla trabecular y el conducto de Schlem, o los agonistas de los receptores A₁ de adenosina como el Trabodensos[®], también actuando sobre la vía convencional de drenaje (Prassana et al., 2016) o por último los donadores individuales de óxido nítrico, en forma de dinitroalquilbencenos, también pueden ser un campo interesante de desarrollo (Blangetti et al., 2017).

4.2 SkQ1

4.2.1 El estrés oxidativo y el ojo seco

El estrés oxidativo. De manera natural, el ojo está expuesto a reacciones fotooxidativas debido a la luz, actividades antiinfecciosas... Lo que hace que la superficie ocular esté expuesta a un mayor estrés oxidativo (Augustin et al., 1995). También de manera natural, la lágrima y la superficie ocular contienen suficiente cantidad de antioxidantes, como la superóxido dismutasa, glutatión reductasa y peroxidasa, ácido úrico y ascórbico, glutatión, tirosina, cisteína, tocoferol, retinol... Pero existen diversos trabajos que exponen una clara relación entre el estrés oxidativo producido por la desecación y por la hiperosmolaridad y la fisiopatología consiguiente del ojo seco.

Como por ejemplo en Seen y Tong, 2017 se expone una figura (Fig. 10) donde los radicales

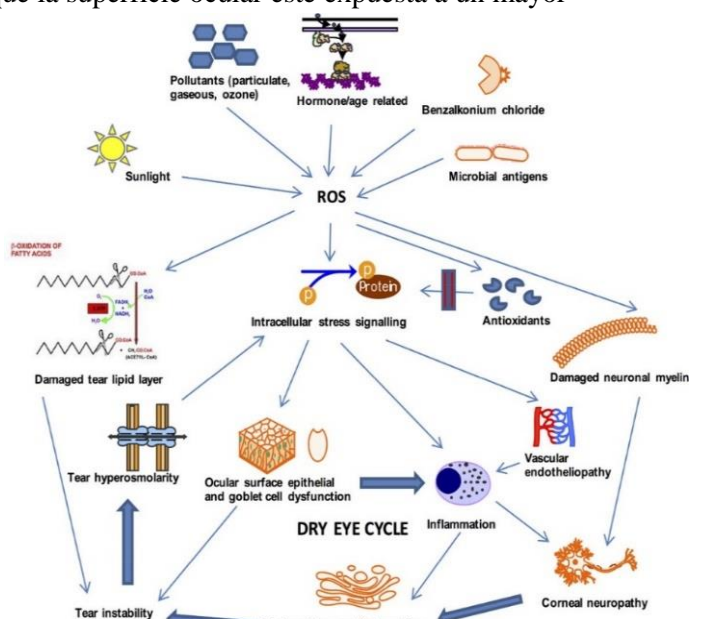


Figura 10. Ciclo vicioso del ojo seco en relación con la producción de radicales libres (Seen y Tong, 2017).

libres de oxígeno (ROS) forman parte fundamental del círculo vicioso patológico del ojo seco. De hecho, en esa revisión comentan que, si se focalizase la atención sobre la formación de ROS, no sería tan necesario el tratamiento o corrección de problemas individuales como por ejemplo la inestabilidad o la pérdida de células superficiales (Seen y Tong, 2017). Continúan comentando que la evidencia de la relación entre estrés oxidativo y el ojo seco se ha demostrado tanto in vitro como en animales. Como se ha comentado antes, la hiperosmolaridad causa un daño a la superficie ocular por la activación de cascadas de eventos inflamatorios, en los que los ROS están muy relacionados, debido a que hay un aumento de la producción de estos, y una disrupción de los niveles de oxigenasa y enzimas antioxidantes, resultando en un daño tanto a nivel del ADN mitocondrial como a nivel de la membrana, por la detección de marcadores de peroxidación lipídica (Deng et al., 2015).

En estudios realizados con ratones sin la superóxido dismutasa-1 (ratones *Sod1*^{-/-}) (Kojima et al., 2012) demostraron también que la oxidación lipídica se encontraba acelerada, al no tener un sistema de frenar esa cadena oxidativa eficazmente, estudiando metabolitos de esa oxidación, como el 4-hidroxinonal o 4-HNE, el cual se encontraba en bastante más abundancia que los ratones control, o la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), biomarcador de estrés oxidativo en el ADN, el cual también se encontró aumentado (Kojima et al., 2012). También estudiaron como afectaba la acumulación de ROS en la mitocondria, la cual sufría cambios a nivel celular de hinchazón, rotura de membranas y disrupción de las crestas mitocondriales. Estas alteraciones citoesqueléticas de las mitocondrias podrían iniciar una cascada de señales apoptóticas a través de las caspasas, especialmente la caspasa 3, la cual podría inducir también estadios de inflamación, a través de la proliferación de linfocitos. De hecho, en este estudio se observó un aumento de linfocitos T CD4⁺, monocitos y neutrófilos en la glándula lagrimal, todo ello generando atrofia de los acinos glandulares, con la consiguiente menor producción de lágrima, tanto la estimulada como la basal (Kojima et al., 2012).

Siguiendo en este mismo artículo de revisión (Seen y Tong, 2017) también se habla de otro estudio con ratones transgénicos modificados (*Tet-mev-1*). El gen *mev-1* codifica un citocromo (Cyt-1) que forma parte de la succinato-ubiquinona oxidorreductasa que se encuentra en el complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, siendo análoga de la subunidad succinato deshidrogenasa C, imprescindible en las mitocondrias humanas. Esta subunidad mutada lo que hace es producir en exceso aniones O₂⁻, por lo que las defensas antioxidantes se saturan y comienza a producirse el daño oxidativo, encontrándose los mismos marcadores anteriores (4-HNE y 8-OHdG) aumentados (Uchino et al., 2012). Mencionan también que hay una clara conexión entre los ROS creados en la mitocondria (mtROS) y la inflamación, ya que inducen la

producción de citoquinas proinflamatorias. Todo esto indujo inflamación leucocítica y fibrosis en la glándula lagrimal, lo que llevo a una pérdida de la función de esta, resultando finalmente en ojo seco (Uchino et al., 2012).

Existen multitud de artículos que prueban que la relación entre la producción de ROS y la patología del ojo seco no es casual. Tanto es así, que en muchos artículos revisados puntualizan al final de sus publicaciones que un punto de posible alternativa para el tratamiento del ojo seco podría ser frenar la producción de mtROS.

4.2.2 Desarrollo e investigaciones de los cationes transportadores

En otro orden de cosas, en Rusia un grupo de científicos empezaba a investigar y a diseñar moléculas que pudiesen servir para reducir la producción de ROS, pero desde dentro de la mitocondria, no como los antioxidantes convencionales.

Este grupo, liderado entre otros científicos por Skulachev VP, empezaron en 1969 a hacer experimentos en los que intentaban atravesar moléculas en forma de cationes a través de membranas (Lieberman et al., 1969). El catión cargado de acilcarnitina empezó como una de las primeras "locomotoras electrónicas" como se les denomina, para transportar ácidos grasos al interior de la mitocondria (Severin et al., 1970).

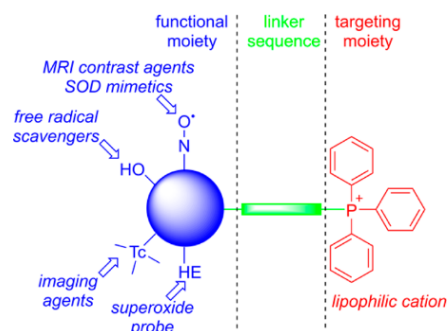


Figura 11. Ejemplo de las posibles aplicaciones de los cationes transportadores (Zielonka et al., 2017).

Este tipo de molécula se ideó como un catión debido a que la matriz mitocondrial es de los únicos compartimentos intracelulares cargados negativamente, de modo que el objetivo de los cationes fuese en gran parte las mitocondrias, y que, anexionado a un antioxidante, se acumularan y "limpiaran" una de las zonas donde se producen más radicales de oxígeno (Antonenko et al., 2008). En 2017, Zielonka et al. publicaron una extensa revisión sobre estas moléculas, explicando el mecanismo de dichos cationes hidrofóbicos. Al aproximarse a la membranas mitocondriales, la carga positiva se asocia electrostáticamente con los fosfatos de los fosfolípidos, mientras que la cadena hidrofóbica y la molécula transportada se orientan al interior. Una vez producido esto, la carga del compuesto es atraída por el espacio negativamente cargado, mientras que la cadena les permite viajar por la membrana. Aunque la fuerza principal que promueve la acumulación del catión sea la carga, los procesos de equilibrio en las membranas vienen dados también por la hidrofobicidad, de modo que cationes con cadenas más largas (mayor coeficiente octanol/agua) eran más acumulados (Zielonka et al., 2017).

Este concepto ya se puso en práctica gracias a científicos como Burns y Smith, los cuales probaron con diferentes moléculas como un catión tiobutiltrifenilfosfonio (Burns et al., 1995) y añadieron α -tocoferol y también ubiquinol, el último recibiendo el nombre de MitoQ. Se observó que este era un antioxidante recargable, es decir, las diferentes formas oxidadas del ubiquinol pueden ser reconvertidas en la forma reducida original por la propia cadena respiratoria mitocondrial (Kelso et al., 2001). Sin embargo, dependiendo de la dosis administrada, MitoQ podía operar también como prooxidante, debido a un estrecho margen entre las actividades anti y prooxidantes, por lo que sus aplicaciones para su uso práctico quedaban limitadas (Antonenko et al., 2008).

Sin embargo, el grupo de trabajo multidisciplinar (entre los que se encuentra Skulachev VP) de la Universidad Estatal Lomonosov de Moscú, sintetizó diversos antioxidantes, pero en vez de utilizar ubiquinol, utilizaron plastoquinona, un isoprenoide situado en los tilacoides de los cloroplastos. Revisaron trabajos en los que se mencionaba que era mejor antioxidante que la ubiquinona, ya que los cloroplastos están expuestos a un estrés oxidativo mucho mayor que las mitocondrias, entre otros factores como la luz y el medio ácido de los cloroplastos (Antonenko et al., 2008).

4.2.3 El papel de la plastoquinona como antioxidante

En la cadena fotosintética, al igual que la cadena electrónica en los animales, la eficiencia de transporte de electrones puede fallar, de modo que a veces puede haber fugas de electrones que lleven a la formación de radicales libres que empiezan la cascada oxidativa de los lípidos y proteínas mitocondriales, siendo el singlete $^1\text{O}_2$ formado por la excitación de la clorofila, el responsable de más del 80 % de la peroxidación lipídica no enzimática (Nowicka et al., 2013). Ante esto, el cloroplasto posee diversas moléculas antioxidantes, como el ascorbato, los tocoferoles y sus formas oxidadas y reducidas, la plastoquinona y el plastocromanol, enzimas antioxidantes...

En concreto, la plastoquinona (PQ) forma parte de dicha fotofosforilación vegetal siendo un agente redox móvil, ya que es liposoluble, permitiendo el transporte de electrones entre el fotosistema II y el complejo citocromático b_6/f del ciclo de transporte electrónico (Millner y Barber, 1984). Al tener la función de “lanzadera” de electrones, tiene una gran movilidad tanto transversal como lateral. Teniendo en cuenta que la longitud de la PQ en su conformación lineal es aproximadamente el espesor de la membrana, la difusión es bastante eficiente, con la cola hidrofóbica en paralelo a los fosfolípidos de la membrana (Nowicka y Kruk, 2010). Sin embargo,

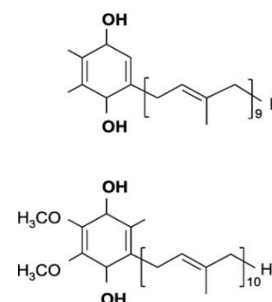




Figura 12. Plastoquinona (arriba) y ubiquinona (abajo) (Gruszka et al., 2008).

	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

la cabeza de la PQ debe tener tendencia a introducirse en la membrana para unirse al sitio de unión Q_A del fotosistema II, donde se reduce y pasa a ser PQH_2 . La cabeza pasa a ser más polar de modo que tiende a orientarse más a la superficie, donde hay un medio más polar. No obstante, debe introducirse otra vez en la membrana para donar esos electrones al citocromo b_6/f por su sitio de unión. Lo hace mediante las formas oxidadas y reducidas de la PQ, que forman un complejo de transferencia de carga que facilita la penetración y la estancia de la cabeza apolar de la PQH_2 en el interior de la membrana (Nowicka y Kruk, 2010).

Aparte de la función en la fotosíntesis, la PQ tiene una función antioxidante importante, similar a la de los tocoferoles y el ubiquinol, demostrando ser un secuestrador de superóxido y del singlete de oxígeno eficaz. ¿Por qué? Tanto el sitio (agua o fase lipídica) como el mecanismo de iniciación de la peroxidación lipídica en la membrana, influyen en la aparente actividad de los mecanismos de defensa antioxidante. En adición a esto, algunas de las defensas antioxidantes de los cloroplastos son hidrosolubles, como el ácido ascórbico, por lo que su acceso al interior de la membrana del tilacoide es limitado. Aparte, los antioxidantes hidrofóbicos como el α -tocoferol o el β -caroteno, aun siendo hidrofóbicos, tienen una movilidad reducida en la membrana ya que se encuentran frecuentemente asociados a complejos proteicos, de modo que la abundancia de la plastoquinona, junto con su gran movilidad por la membrana, le hacen ser un antioxidante móvil muy útil para el cloroplasto, pudiendo actuar sobre radicales más polares (cerca de la interfase agua/membrana) como sobre radicales más apolares (en el interior de la membrana del tilacoide) (Hundal et al., 1995).

En estudios realizados en el año 1995 se demostró que, en cloroplastos aislados de espinaca, ante una intensa iluminación, que produciría un gran estrés oxidativo, la presencia de PQH_2 (la forma reducida de la plastoquinona) evitaba la peroxidación lipídica y la reducción de los niveles de clorofila y carotenoides. Sin embargo, cuando la plastoquinona se encontraba en su forma oxidada, no era capaz de impedir tanto daño como la forma reducida (Hundal et al., 1995). Otros estudios observaron que cuando hay un gran estrés en el tilacoide, al producirse muchas especies reactivas de oxígeno, una de sus consecuencias es la alteración de la proteína D_1 del fotosistema II, inhibiéndose el transporte electrónico. Se le denomina fotoinactivación, y es debido a la formación del singlete de 1O_2 . Se ha comprobado que la PQ, junto con los tocoferoles y demás antioxidantes, impiden la alteración de la proteína D_1 por el efecto antioxidante evitando el daño producido por dicho singlete (Trebst et al., 2002) (Kruk y Trebst, 2008).

Pero ¿qué sucede molecularmente? La generación de radicales libres en el cloroplasto es un proceso complejo que comienza con la producción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), al darse una semirreducción de la molécula de oxígeno, tras una fuga de electrones en la cadena de transporte

electrónico, como una de las posibles causas. Tras esto, la dismutación del anión da como resultado el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y después la formación del radical hidroxilo (OH^\bullet) siguiendo una reacción llamada reacción de Fenton. Es este radical el que es muy reactivo, teniendo la capacidad de arrancar electrones de moléculas de hidrógeno de proteínas y lípidos, formándose el radical R^\bullet . Este reacciona de nuevo con el oxígeno para formar una larga lista de más radicales que son los que generan el daño en las moléculas biológicas (Pospíšil y Prasad, 2014).

4.2.4 Mecanismo moleculares de acción de la plastoquinona

¿Cómo actúa pues la PQ? Recibe primero un electrón, convirtiéndose en la semi-plastoquinona, para después aceptar el segundo electrón y convertirse en plastoquinol (PQH_2), totalmente reducido. También en sentido contrario, donde dona esos electrones a los ROS para reducirlos y así oxidarse y pasar de nuevo a la plastoquinona (Figura 13).

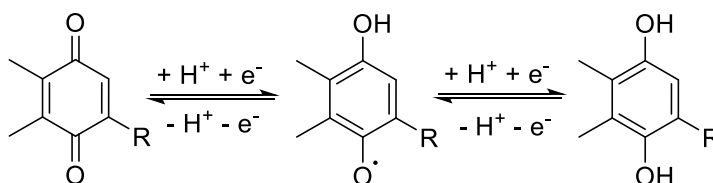


Figura 13. Distintos estados de oxidación-reducción de la plastoquinona.

Los siguientes artículos son citados debido a que contienen evidencias de que la PQ es capaz de frenar la cadena oxidativa en tres sucesos que pueden ocurrir con bastante frecuencia en los cloroplastos y mitocondrias: la producción del singlete $^1\text{O}_2$, la producción del anión superóxido y la peroxidación lipídica.

Gruszka et. al investigaron la capacidad antioxidante de diversas moléculas del interior del cloroplasto contra el **singlete $^1\text{O}_2$** . Encontraron que la PQ, aun teniendo de 3 a 6 veces menos ratio de disminución del singlete que el α -tocoferol, resultaba un antioxidante eficaz. Diferenciaron entre el PQ-9 (la forma oxidada de la plastoquinona) y la PQH_2 -9 (la forma reducida), encontrando que la PQ-9 era de 3,5 a 5 veces menos potente que la PQH_2 -9, aunque teóricamente al principio se creía que la forma oxidada no tenía mucha potencia (Gruska et al., 2008). Esa relativa potencia es debida en gran medida a la cadena insaturada de la propia molécula, más que al anillo de quinona, según la reacción descrita en dicho artículo, en la cual el singlete de oxígeno se une

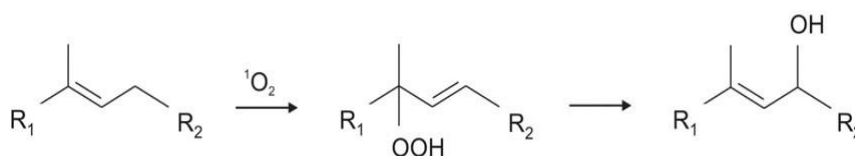


Figura 14. Reacción del singlete $^1\text{O}_2$ con la cadena insaturada del PQ-9 (Gruska et al. 2008).

preferentemente al carbono terciario del doble enlace de la insaturación, y tras un reordenamiento molecular, se forma el subproducto final (Fig. 14).

De nuevo, se repite que la PQ, tanto su forma oxidada como la reducida, son secuestradores eficaces de radicales libres, por su alta movilidad y difusión a través de la membrana (Gruska et al., 2008).

También Pospíšil y Prasad estudiaron la formación del singlete de oxígeno ante diferentes situaciones como gran intensidad lumínica, calor... proponiendo los subproductos de oxidación de las moléculas antioxidantes más habituales, ante el singlete 1O_2 (Figura 15).

Por otro lado, se investigó la capacidad de antioxidante frente al **anión superóxido** (Kruk et al., 2003) mediante la siguiente reacción: $PQ + O_2^- \rightarrow PQ^{\cdot-} + O_2$ donde la semi-plastoquinona formada puede volver a convertirse en hidroquinona original,

debido a la regeneración que se produce en la cadena mitocondrial. De esta manera, puede volver a entrar dentro del conjunto de moléculas de PQ, siendo por tanto un antioxidante recargable, al contrario que el α -tocoferol, que genera un subproducto que ya no es activo como propuso Pospíšil y Prasad. Según el experimento, la PQH_2-9 , fue la que mostró mayor capacidad antioxidante frente al anión superóxido, especialmente su forma reducida, (Fig. 16) ya que la cabeza de la PQH_2-9 tiene facilidad para acceder al interior de la membrana del tilacoide (más que el α -tocoferol) donde se produciría mayor cantidad del anión superóxido (Kruk et al., 2003).

En cuanto a la **peroxidación lipídica**, es un proceso no deseado que conlleva la destrucción de las membranas que contienen cadenas poliinsaturadas, con la desestructuración consiguiente de la mitocondria o cloroplasto, entre otras consecuencias (Nowicka et al., 2013). Puede ser iniciada por radicales como el radical hidroxilo OH^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , radicales peroxilos, o el singlete de oxígeno 1O_2 . Observaron que los tocoferoles y vitamina K, podían detener la peroxidación solo en la fase inicial del proceso por la desactivación del singlete de oxígeno. Sin embargo, no eran capaces de detener de manera efectiva la reacción radicalaria una vez iniciada, incluso exhibían cierta actividad prooxidante que era prevenida por el plastoquinol (Nowicka et al., 2013). Se demostró

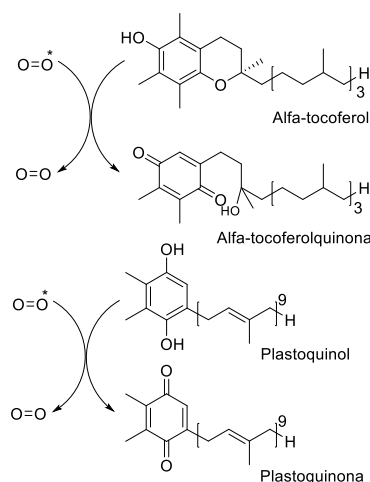


Figura 15. Productos de la oxidación del α -tocoferol y la PQ (Pospíšil y Prasad, 2014).

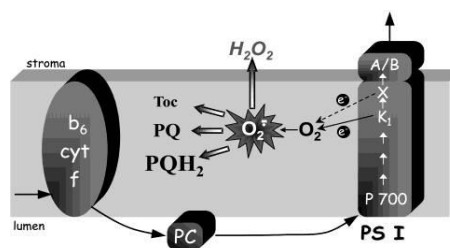


Figura 16. Generación del anión superóxido en el cloroplasto y las moléculas antioxidantes (la PQH_2 , la más efectiva) (Kruk et al., 2013).

que la PQ, junto con el plastocromanol (otra molécula relacionada implicada en la fotofosforilación) eran más eficaces cuando la peroxidación empezaba en el interior de la membrana ya que poseen unas largas cadenas, que, como se ha venido repitiendo, les permite moverse y localizarse más profundamente en la membrana, desactivando de manera más efectiva al singlete de oxígeno y las consiguientes etapas peroxidativas lipídicas (Nowicka et al., 2013).

Para definir cuál es la función exacta de la PQ en este proceso se utilizarán precedentes de la defensa frente a la peroxidación lipídica por parte de la ubiquinona (coenzima Q10). Análogamente a la plastoquinona, es una molécula encargada del transporte electrónico en la mitocondria, tienen cierta similitud en su biosíntesis y en su estructura, por lo que su funcionalidad es en cierto modo parecida. La PQ posee mecanismos de acción similares en cuanto a detener la peroxidación lipídica que el ubiquinol, de modo que los artículos citados a continuación en relación con el ubiquinol también son aplicables por extensión a la PQ.

Ernster y Dallner definieron en su revisión al ubiquinol como un eficaz antioxidante, protegiendo a los fosfolípidos de membrana y lipoproteínas de baja densidad de la peroxidación, pero también a las proteínas membranales mitocondriales y el ADN del daño de los radicales libres. También señalan que estos efectos son independientes de otros antioxidantes, y que pueden potenciar la acción de estos, por ejemplo, mediante la regeneración de la vitamina E (α -tocoferol) (Ernster y Dallner, 1995).

Más tarde, Bentinger et al. realizaron otra revisión en 2007 sobre el papel antioxidante de la CoQ10. La efectividad como inhibidor de la peroxidación lipídica (Fig. 17) se debe a la interacción en varios puntos del proceso. En primer lugar, es capaz de reducir la creación de los radicales peróxidos lipídicos LOO^\bullet en la etapa de iniciación, para dar la ubisemiquinona CoQH^\bullet y H_2O_2 , que más tarde se puede regenerar cuando reacciona con otro radical. También actúa regenerando la vitamina E en la etapa de propagación, potenciando la acción de esta, junto con la acción del ácido ascórbico (Bentinger et al., 2007).

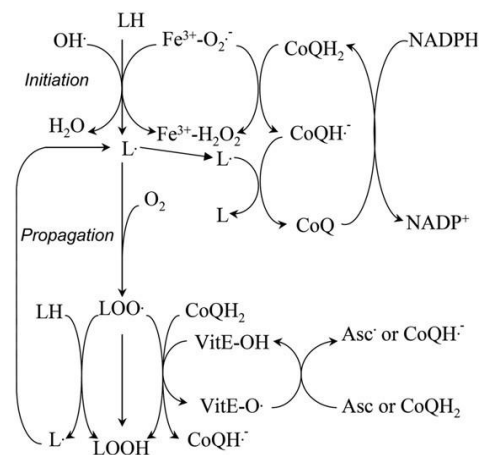


Figura 17. Sitios de acción del ubiquinol en la peroxidación lipídica (Bentinger et al., 2007).

Con esto queda demostrado que la plastoquinona natural es un antioxidante eficaz en diversas situaciones oxidativas en el cloroplasto, y que aunque no tenga el mayor potencial antioxidante, su movilidad y su abundancia le hace poseer un característico modo de acción, pudiendo actuar tanto frente a ROS más hidrófilos como ROS más hidrofóbicos.

4.2.5 Síntesis del SkQ1 y derivados

Una vez propuestos los posibles efectos antioxidantes de la plastoquinona y sus posibles mecanismos, hay que discutir cómo se llegó al diseño del SkQ1, y que otros diseños de moléculas derivadas de la plastoquinona se obtuvieron.

Los pioneros en la síntesis de dicho grupo (los SkQs) fueron los citados en la introducción, un grupo de científicos rusos liderados por Antonenko YN y Skulachev VP siendo este último el “creador” de la familia de moléculas. De hecho, queda patente su nombre en todas las moléculas por el prefijo Sk.

Sintetizaron diversos derivados de la plastoquinona, combinándola con los iones “penetrantes” citados anteriormente, probándolos en diferentes modelos, para después comprobar su función antioxidante en los experimentos posteriores (Antonenko et al., 2008).

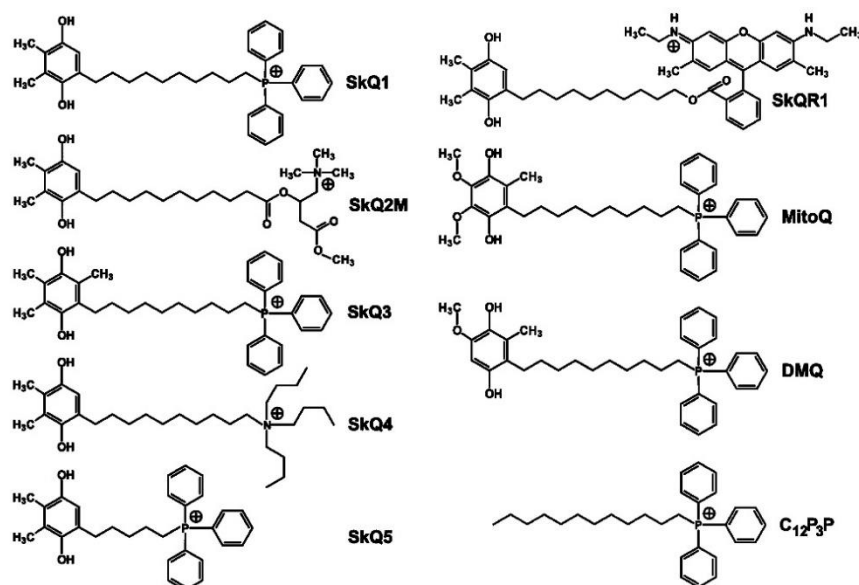


Figura 18. Diferentes derivados sintetizados en el estudio de Antonenko et al. 2008

Los derivados sintetizados fueron los siguientes:

SkQ1: Posee un residuo de plastoquinona, una cadena de carbono o “linker” de 10 carbonos y un ión penetrante trifenílfosfonio; SkQ2M: Posee un residuo de plastoquinona, un linker de 10 carbonos y un ión penetrante de metil-carnitina; SkQ3: Posee un residuo similar a la plastoquinona, pero con un grupo metilo adicional en el carbono 5, siendo un híbrido entre la ubiquinona y la plastoquinona. El resto es igual que el SkQ1; SkQ4: Igual que el SkQ1 salvo que el ión es tributilamonio; SkQ5: Igual que el SkQ1 salvo que el linker es de solo 5 carbonos.; SkQR1: Igual que el SkQ1 pero con un residuo de rodamina 19, el único SkQ con propiedades fluorescentes, por lo que su paso por las membranas, las mitocondrias y células es fácilmente

detectable.; MitoQ y DMQ: MitoQ posee un residuo de ubiquinona con dos grupos metoxi, mientras que el DMQ solo posee uno; C₁₂P₃P: es el linker y catión aislados.

Para la síntesis de los compuestos que contenían trifenilfosfonio se utilizó el siguiente esquema general (Figura 19):

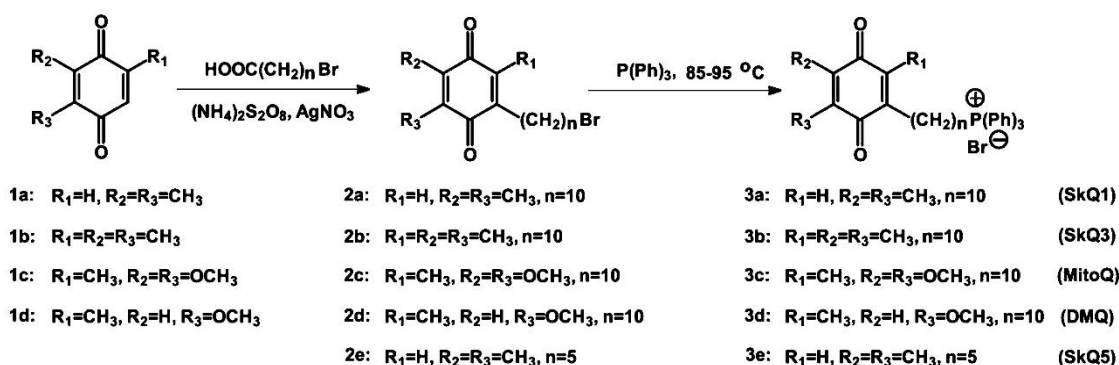


Figura 19. Esquema general de síntesis de los derivados SkQ con grupo trifenilfosfonio como ión (Antonenko et al. Supl, 2008).

Cada síntesis de los compuestos 1 se lleva a cabo a partir de una hidroquinona o 1,4-dihidroxibenceno, al cual se le realiza la alquilación de los radicales correspondientes a cada compuesto. Después se realiza la oxidación de las correspondientes alquilhidroquinonas con KBrO₃, un oxidante, para dar la forma oxidada de alquilquinonas (1a, 1b, 1c...). Ya tendríamos los núcleos de los diferentes derivados con sus correspondientes radicales.

Para la primera etapa del esquema para producir los compuestos 2 se utiliza el ácido 11-bromoundecanoico para los compuestos 1a-1d, mientras que para el compuesto 1e se utiliza el ácido 6-bromohexanoico. Con este paso lo que se consigue es introducir el “linker” en la molécula, en todos los casos de 10 carbonos menos en el 2e, que contiene un “linker” de 5 carbonos.

Para la segunda etapa se utilizó trifenilfosfina en benceno o alcohol (disolventes) y se mantuvo sellado con argón en tubo de cristal a 85-95°C durante 72 h. Tras la separación del disolvente, el residuo se precipita y se purifica con una cromatografía de columna silica gel. Ya se obtendría el derivado completo con el catión hidrofóbico ya en la molécula. (Antonenko et al. Supl, 2008).

Para la síntesis de SkQ4, Sk2M y SkQrR1 se utilizaron esquemas de síntesis diferentes debido a sus características estructurales. Los esquemas de síntesis se encuentran en las referencias (Antonenko et al. Supl, 2008).

4.2.6 Estudio de las propiedades fisicoquímicas de la familia de SkQs

Una vez sintetizados se comprobó su estabilidad en agua a un pH de 6,5 y 37°C. De mayor a menor fue MitoQ > SkQ3 > SkQ1 > SkQR1, descomponiéndose el 50 % de este último en 3,5 h mientras que para el SkQ1 fueron 54 h (Antonenko et al. Supl, 2008). Al ser compuestos hidrofóbicos se veía muy afectada su concentración por la adsorción a la superficie de los envases y localizándose en la interfaz aire/agua por lo que se recomienda una agitación energética antes del uso (Antonenko et al. Supl, 2008).

Para comprobar su difusión por las membranas se utilizaron membranas de fosfolípidos gruesas ya que los SkQ desestabilizaban las bicapas lipídicas planas que habitualmente se utilizan. Los resultados se muestran en la figura 20. Esta figura implica que los antioxidantes mostrados pasaban a través de las membranas, pero no se observó difusión de los compuestos SkQ2M y SkQ4, por lo que su estudio posterior quedó en segundo plano (Antonenko et al. Supl, 2008).

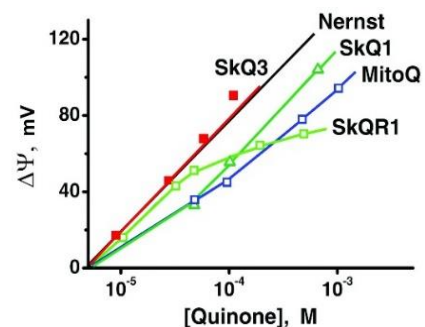


Figura 20. Potenciales de difusión de los derivados SkQ (Antonenko et al. Supl, 2008).

Seguendo con los experimentos se investigó la capacidad del SkQ1 de acumularse en las mitocondrias. Según la figura 21, el SkQ1 tarda unos 15-20 min en introducirse en la mitocondria. El coeficiente octanol/agua de este compuesto es bastante elevado, de modo que un gran porcentaje de la captación es

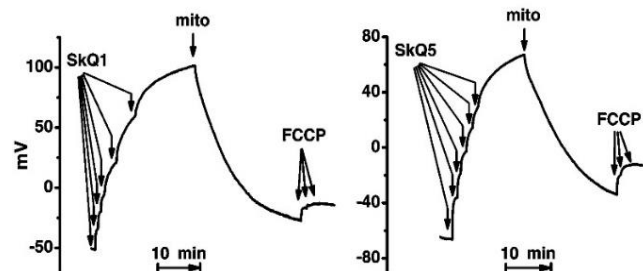


Figura 21. Captación de SkQ1 (izquierda) y SkQ5 (derecha) (Antonenko et al. Supl, 2008).

independiente del potencial de membrana mitocondrial, y de desacopladores (que impidan la entrada de la molécula), dándose de forma pasiva por las propias membranas mitocondriales, mientras que el resto es dependiente del potencial y de los desacopladores, como el FCCP, que induce una pequeña pero medible salida del SkQ1 (Antonenko et al. Supl, 2008). Del SkQ5 decir que, al ser menos hidrofóbico por tener una cadena más corta, la fracción potencial-independiente es menor y la dependiente es mayor, por lo que su acumulación es menor.

A continuación, se investigó su capacidad para oxidarse y reducirse dentro de la mitocondria. Tanto el NADH como el succinato resultaron ser donadores para la reducción del SkQ1, al igual que también podría ser reducido por el ubiquinol CoQH₂ (Antonenko et al., 2008). La oxidación se encontró que podía ser enzimática o no enzimática (por los radicales lipídicos, malonato o el O₂). La ratio global es que la oxidación es más lenta que la reducción (Fig. 23), por lo que el SkQ1

permanece en un estado mayoritario reducido, donde mejor actúa como antioxidante. Esto también significa que se le puede denominar un antioxidante recargable, ya que una vez que se oxida, se reduce rápidamente (Antonenko et al., 2008).

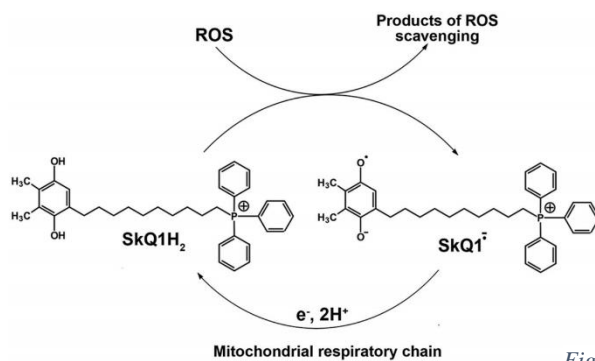


Figura 22. Estados de oxidación-reducción de la SkQ. (Iomdina et al., 2015).

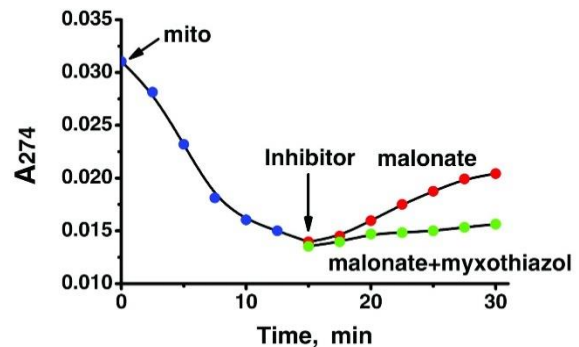


Figura 23. Absorbancia del compuesto a 274 nm, donde la curva en azul representa la reducción y la curva en rojo y verde representan la oxidación, más lenta que la reducción (Antonenko et al. Supl., 2008).

4.2.7 Estudio de las capacidades antioxidantes de la familia de SkQs

Entonces, ¿cómo relacionar el estrés oxidativo, los cationes transportadores y la eficacia de la plastoquinona? Para ello el grupo ruso realizó diversos modelos de experimentos para comprobar su efecto antioxidante, primero en solución para ver de manera más directa como disminuía la formación de los ROS; en lípidos, para observar cómo eran protegidos frente al daño; y también en mitocondrias aisladas y células humanas, HeLa, para comprobar los efectos antioxidantes a un nivel más general.

En solución se midió la habilidad para disminuir los niveles de OH^\cdot . Para ello se utilizó un radical iniciador llamado 2,2'-azobis(2-amidino-propano) dicloruro (AAPH en sus siglas en inglés) que es capaz de producir dichos radicales de oxígeno. Si el compuesto es antioxidante, se observaría una disminución de la quimioluminiscencia propia de este método, como se observa en la figura 24. Se observa que el SkQ1H₂ reduce la quimioluminiscencia de forma más acusada que la SkQ1, mientras que el MitoQH₂ lo hace con menor potencia y el MitoQ no tiene prácticamente ningún efecto (Antonenko et al., 2008).

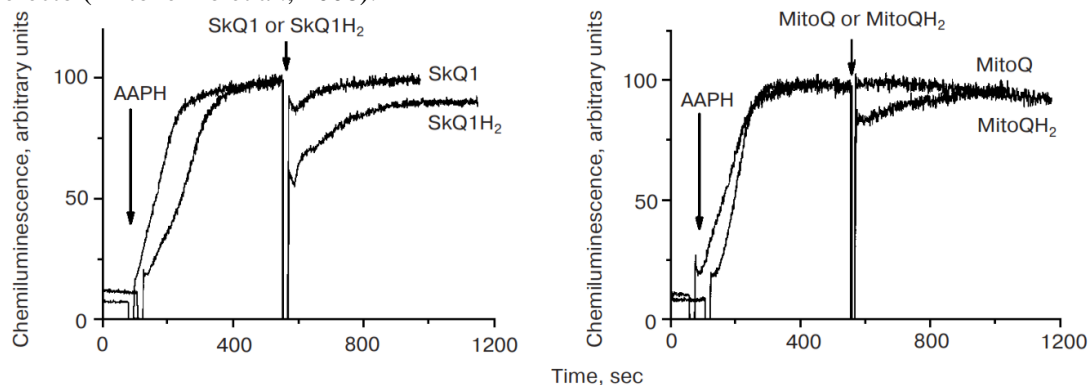


Figura 24. Efecto antioxidante de SkQ1 y MitoQ y sus formas reducidas en solución acuosa. (Antonenko et al., 2008)

En **lípidos** se estudió la desactivación de la peroxidación de micelas lipídicas. La actividad de SkQ1H₂ y MitoQH₂ está caracterizada por la reacción entre el radical y el quinol correspondiente: LO₂· + QH₂ → LOOH + QH·. Reacción que compite con la reacción de propagación de la peroxidación: LO₂· + LH → LOOH + L·. Se vio que dichos antioxidantes producían la primera reacción de manera más rápida, en concreto, el SkQ1H₂ era 4 veces más potente que el MitoQH₂, de manera que se daba antes que la reacción de propagación, impidiendo el daño. Tanto el SkQ1 como el MitoQ fueron inactivos en este sistema (Antonenko et al., 2008).

En **mitocondrias cultivadas aisladas** de corazón de rata se investigó también su capacidad antioxidante mediante la formación de malondialdehído (MDA), marcador de estrés oxidativo, iniciado por Fe⁺² y ascorbato. En la figura 25 se ve como el efecto antioxidante del SkQ1 se ve a mucha menos concentración que el SkQ3 y el MitoQ, además de que hay más margen entre los efectos anti y prooxidantes (representado como una línea horizontal más o menos larga) (Antonenko et al., 2008). Adicionalmente se estudió que el contenido en cardiolipina se mantenía con un pretratamiento de 100 nM de SkQ1. La cardiolipina es prácticamente el primer fosfolípido afectado por la cadena oxidativa del radical OH· y se encuentra de forma abundante en las mitocondrias (Antonenko et al., 2008).

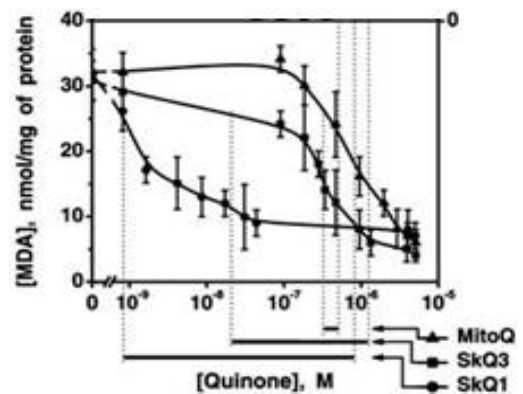


Figura 25. Producción de MDA de SkQ1, SkQ3, y MitoQ. (Antonenko et al., 2008)

En **células humanas, HeLa**, el SkQR1, el SkQ con capacidad fluorescente, fue encontrado especialmente localizado en las mitocondrias, tras aproximadamente 1 h. Más tarde se incubó en un medio sin SkQR1, donde se produjo una liberación lenta del SkQR1 (*t*_{1/2}: 2,5 h), demostrando que se acumulan en estos orgánulos gracias a los cationes transportadores. Estudiaron en dichas células si los SkQ poseían propiedades antiapoptóticas y antinecróticas, si la muerte de la célula era debida a los ROS. Se vio que a concentraciones de tan solo 0,2 nM de SkQ1 en pretratamiento, abolían casi completamente la apoptosis inducida por 400 μM H₂O₂, siendo el SkQR1 más efectivo en este caso (Fig. 26).

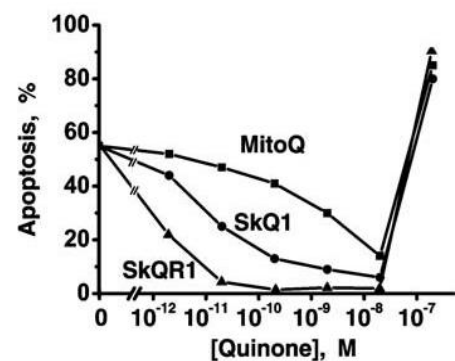


Figura 26. Disminución de la apoptosis por SkQ1, SkQR1 y MitoQ. (Antonenko et al., 2008)

También se puede observar ese mismo efecto en la figura 27, en la que se produce un pretratamiento previo de 20 nM de diversos SkQs, tras el cual se aplicaron 400 μM de H₂O₂ para

observar la posible apoptosis inducida por los radicales libres generados. Anteriormente se descubrió que la adición de H_2O_2 resultaba en la fosforilación de ciertas proteínas, que incrementaban la generación de radicales libres. Se vio que este fenómeno era abolido cuando había un pretratamiento con SkQ1 (Fig. 27), sin embargo, cuando la concentración de H_2O_2 era superior a $500 \mu M$, los efectos protectores del SkQ1 empezaban a disminuir, ya que posiblemente sobrepasa su capacidad terapéutica (Antonenko et al., 2008).

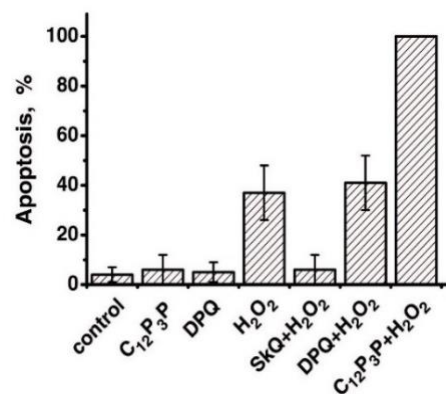


Figura 27. Porcentaje de apoptosis en pretatamiento con 20 nM de diversos SkQs y adición de $400 \mu M$ de H_2O_2 cuando se indica. (Antonenko et al., 2008)

Impedían también sucesos proapoptóticos inducidos por H_2O_2 , como la migración de la proteína proapoptótica BAX a la mitocondria o la salida del citocromo *c* al citosol, mediante observación al microscopio. También se observó que prevenía de la descomposición de los filamentos mitocondriales que lleva a una disminución del tamaño del orgánulo (fenómeno preapoptótico) (Antonenko et al., 2008).

Sin embargo existen también efectos prooxidantes, cuando un antioxidante sobrepasa cierta dosis. La actividad prooxidante **en solución** acuosa del SkQ1 y el MitoQ fue estudiada mediante la velocidad de reacción de O_2 a $O_2^{\cdot-}$. Para ello se utilizó un espectrofotómetro y un espectrómetro de resonancia electrónica (ESR) (Fig. 28). Ambos métodos mostraron que la capacidad prooxidante del MitoQ era mucho mayor que la del SkQ1, pero la de esta tampoco era despreciable (Antonenko et al., 2008).

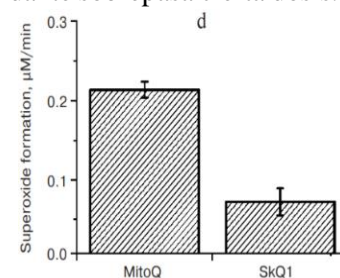




Figura 28. Formación del anión superóxido medida con un espectrómetro ESR. (Antonenko et al., 2008)

También se midió la capacidad prooxidante en la **mitocondria** para producir H_2O_2 , en ausencia de ADP. De forma resumida, se vio que la “ventana” en la que la cual el efecto antioxidante no se acompañaba de un efecto prooxidante, era mayor en el SkQ1 (0,9 a 850 nM) que el MitoQ (de 350 a 550 nM) y el SkQ3 en un punto intermedio (de 25 a 1600 nM) (Antonenko et al., 2008).

¿Qué se puede deducir de todos estos estudios del SkQ1? En primer lugar, la capacidad antioxidante es satisfactoria tanto en solución (en un medio hidrofílico) como en lípidos (medio hidrofóbico) ya que reduce la producción de los ROS y la propagación de la peroxidación lipídica. En segundo lugar, que se acumulan de manera efectiva en las mitocondrias ya que impide la formación de marcadores de oxidación, siendo mucho más activo que la MitoQ. En tercer lugar, a consecuencia de su pretratamiento, se produce una menor apoptosis (cuando es debida a los

	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

ROS) ya que al impedir la propagación de la cadena oxidativa, bloquean los sucesos preapoptóticos. Y en cuarto y último lugar, la capacidad prooxidante es mucho menor que la MitoQ y con un intervalo entre los efectos anti y prooxidantes mucho mayor que la MitoQ.

En resumen se explicará las razones por las que se escogió el SkQ1 frente a los otros SkQs.

El primer punto de cribado fue la capacidad para atravesar membranas. El SkQ2M, SkQ4 y el SkQ5 no tuvieron una difusión buena a través de las membranas, este último debido a su menor hidrofobicidad por su linker más corto, pero los otros dos debido a que su catión transportador no era tan efectivo como el trifenilfosfonio. Asimismo solo se comparó la capacidad de acumulación en la mitocondria del SkQ1, con el SkQ5, resultando este último también menos acumulado. Debido a estos dos experimentos, la investigación del SkQ2M, SkQ4 y el SkQ5 quedó en segundo plano.

En los estudios posteriores se discutió sobre los efectos del SkQ1, SkQ3 y el SkQR1. El SkQ3 resultó que tenía una eficacia intermedia, por lo que se deduce que el radical metilo que contiene de más comparado con el SkQ1, puede influir en una pequeña disminución de la actividad antioxidante. En el caso del SkQR1, se observó que incluso era más efectivo que el SkQ1, en células HeLa, aunque el propio autor comenta que no está claro porque la sustitución del catión transportador conlleva un aumento de la eficiencia (Antonenko et al., 2008), teniendo unos valores antioxidantes similares entre los dos en mitocondrias aisladas, aunque se comenta que este aumento puede ser debido a que el SkQ1 es un mejor sustrato de la ABC ATPasa, transportador inespecífico de la célula, que expulsa moléculas exógenas. Sin embargo, el SkQR1 no resulta el fármaco final debido a que se desconocen los efectos a largo plazo de un catión fluorescente, aparte de que su estabilidad en solución era baja.

Finalmente llegamos al SkQ1, análogo a la plastoquinona, ya que contiene el mismo resto de quinona pero con una cadena lateral diferente, con un catión transportador que le permite entrar de forma fácil a la mitocondria y acumularse para hacer frente a las reacciones oxidativas de manera eficaz como se ha citado anteriormente, incluso siendo recargable, gracias a la propia cadena de respiración mitocondrial, además de tener una estabilidad en solución aceptable. Su eficacia es mayor que su precedente más directo, el MitoQ (igual que el SkQ1 pero con un resto de ubiquinona), consiguiendo a fin de cuentas, menores tasas de apoptosis, al mismo tiempo que su ventana en la que ejerce como antioxidante vuelve a ser mayor que el MitoQ, por lo que resulta ser la mejor opción de las sintetizadas por el grupo de investigación ruso.

4.2.8 Estudios *in vivo* y ensayos clínicos del SkQ1



Los efectos antioxidantes han sido puestos a prueba en ensayos con animales y clínicos. El mismo grupo ruso de investigación, en adición a la síntesis y pruebas *in vitro*, también ejecutó diversos experimentos para frenar enfermedades relacionadas con los ROS y con la edad (arritmias de corazón, infartos, isquemia de riñón...) donde obtuvieron resultados prometedores (Bakeeva et al., 2008). Así como también en el estudio de Anisimov et al. donde comenzaron a hacer pruebas en organismos vivos, tanto hongos e insectos, como en ratones (Anisimov et al., 2008). En el caso de Shabalina et al., en su investigación se utilizaron ratones mutados para tener un envejecimiento acelerado, que fue frenado aparentemente con el tratamiento con el SkQ1 (Shabalina et al., 2017). También en estudios de Tsybul'ko et al. se demostró que aumentaba la longevidad del insecto *Drosophila melanogaster* (Tsybul'ko et al., 2017) entre otros artículos. En la actualidad se están obteniendo resultados esperanzadores en investigaciones sobre modelos de infarto, artritis y demás enfermedades neurodegenerativas (Zielonka et al., 2017).

En cuanto al sistema visual, ya en 2008 empezaron a realizar investigaciones en enfermedades oculares relacionadas con la edad en animales, como retinopatías, cataratas, uveítis... (Neroev et al., 2008).

Y en cuanto al ojo seco, Zernii et al., investigaron un modelo de ojo seco generado tras la aplicación de anestesia en conejos, en el cual investigaron los posibles efectos beneficiosos del SkQ1 a unas dosis de 0,25, 2,5 y 7,5 μM , siendo esta última la más efectiva. Observaron que la premedicación con este medicamento: 1) Prevenía cambios preneкрóticos, necróticos y apoptóticos en la superficie epitelial corneal, provocados por el ojo seco generado por la anestesia; 2) Producía una potenciación en la generación de las defensas antioxidantes enzimáticas, como enzimas glutatión peroxidasas o reductasas; 3) Detenían el desarrollo de reacciones proinflamatorias llevadas a cabo por la TNF- α o la IL-6, así como también promover la presencia de compuestos antiinflamatorios, como la IL-4 y IL-10 (Zernii et al., 2017).

Fue en 2012 cuando se empezó a utilizar el SkQ1 para el ojo seco bajo el nombre de Vizomitin[®] y se comenzaron a ver sus posibles efectos beneficiosos, frente al tratamiento con lágrimas artificiales, como primer ensayo clínico realizado en Rusia (Yani et al., 2012). Más tarde se comercializaría en Rusia como fármaco para su posible prescripción.

En un segundo ensayo ruso, Brzheskiy et al., aseguraron la seguridad, tolerabilidad y eficacia del Vizomitin[®] frente al placebo, ilustrando que con el tratamiento de dicho fármaco se producía menor tinción corneal, a la vez que restauraba la función celular y la estabilidad de la película lagrimal (Brzheskiy et al., 2015).

	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optometría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

Se han realizado estudios en fase 2 en los Estados Unidos de seguridad y eficacia (Petrov et al., 2016) donde se mejoraron tanto los signos (por las tinciones de fluoresceína y verde de lisamina) como los síntomas del ojo seco (menos disconfort oculares, sequedad...) en los 87 sujetos que participaban en el ensayo, en comparación con el placebo. Se puso de manifiesto la posible utilidad del SkQ1 dentro de esta enfermedad, una vez más.

Actualmente no se considera de primera línea este tratamiento, ya que la relación entre la producción de radicales libres y el ojo seco aún está en continuo estudio, de modo que habrá que esperar nuevos estudios que confirmen la mejoría a largo plazo de este fármaco, así como también los posibles efectos adversos que aún no se hayan descubierto. Se espera que esta dirección de tratamiento sea una alternativa esperanzadora en cuanto al tratamiento de la patología del ojo seco y otras diversas patologías oculares. Aparte de las posibles aplicaciones en la medicina general, en los próximos años veremos si este tratamiento se consolida como una alternativa fundamentada y viable, y que presente ventajas en la patología del ojo seco frente a los tratamientos que se prescriben actualmente.



5. CONCLUSIONES

Del latanoprost se concluye que:

- 1) Su desarrollo fue a través de la búsqueda de análogos en forma de cribado, identificando los puntos clave de su estructura comparando la afinidad frente al receptor FP de los diferentes derivados de prostaglandinas, llegando al que tenía más afinidad y mejor reducción de la PIO sin tener efectos secundarios.
- 2) Su mecanismo de acción implica un aumento del flujo uveoescleral, al reducir la resistencia del cuerpo ciliar, por una remodelación de su matriz extracelular por parte de la MMPs y la relajación del músculo ciliar.
- 3) Su síntesis inicial se basa en la síntesis de Corey de prostaglandinas de los 70, pero que se han publicado alternativas con puntos de vista distintos y rendimientos mayores.
- 4) El papel de los prostanoides en el glaucoma sigue en estudio, con nuevos análogos y la investigación de nuevos fármacos contra esta enfermedad sigue en activo.

Del SkQ1 se concluye que:

- 1) La relación entre el ojo seco y el estrés oxidativo es clara tras encontrarse marcadores de oxidación en dicha enfermedad, basándose en los diferentes modelos experimentales.
- 2) Gracias al desarrollo de los cationes transportadores, es posible acumular moléculas en la mitocondria.
- 3) La plastoquinona es un antioxidante eficaz frente a los diferentes radicales libres y la peroxidación lipídica.
- 4) El grupo ruso liderado por Skulachev VP desarrolló un método de síntesis del SkQ1, mediante la unión de las moléculas comentadas en los puntos 2) y 3), comprobando mediante diferentes modelos de experimentación su capacidad antioxidante.
- 5) Existen ya ensayos clínicos avalando el efecto del SkQ1, con el objetivo de que pueda convertirse en alternativa fiable y viable frente a la patología del ojo seco.



6. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA

Anisimov VN, Bakeeva LE, Egorov PA, Skulachev VP. «Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 5. SkQ1 prolongs lifespan and prevents development of traits of senescence.» *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73 (12): 1329-42.

Antonenko YN, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Chernyak BV, Skulachev VP. «Supplementary information for the article of Antonenko YN et al.» *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73 (12).

Antonenko YN, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Chernyak BV, Skulachev VP. «Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies.» *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73 (12): 1273-87.

Augustin AJ, Spitznas M, Kaviani M. «Oxidative reactions in the tear fluid of patients suffering from dry eyes.» *Graefes Arch Exp Ophthalmol*. 1995; 233 (11): 649-8.

Bakeeva LE, Barskov IV, Egorov MV, Skulachev VP. «Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 2. Treatment of some ROS- and age-related diseases (heart arrhythmia, heart infarctions, kidney ischemia, and stroke).» *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73 (12): 1288-99.

Bentinger M, Brismar K, Dallner G. «The antioxidant role of coenzyme Q.» *Mitochondrion*. 2007; 7 (Supl): S41-50.

Bitto LZ, Camras CB, Eakins KE. «Reduction of intraocular pressure by prostaglandins applied topically to the eyes of conscious rabbits.» *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977; 16: 1125-34.

Bitto LZ, Camras CB, Gum GG. «The ocular hypotensive effects and side effects of prostaglandins on the eyes of experimental animals.» *Prog Clin Biol Res*. 1989; 312: 349-68.

Blangetti M, Rolando B, Marini E, Chegaev K, Guglielmo S. «gem-Dinitroalkyl Benzenes: A Novel Class of IOP-Lowering Agents for the Treatment of Ocular Hypertension.» *ACS Med Chem Lett*. 2017; 8 (10): 1054-59.

Bowling, Brad. *Oftalmología clínica. Un enfoque sistemático*. 8ª ed. Elsevier; 2015.

Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan Sk, Bonini S. «TFOS DEWS II pathophysiology report.» *The Ocular Surface*. 2017; 15: 438-510.

Brzheskiy VV, Efimova EL, Vorontsova TN, Alekseev VN, Skulachev VP. «Results of a Multicenter, Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Clinical Study of the Efficacy and



Safety of Visomitin Eye Drops in Patients with Dry Eye Syndrome.» *Adv Ther.* 2015; 32 (12): 1263-79.

Burns RJ, Smith RA, Murphy MP. «Synthesis and characterization of thiobutyltriphenylphosphonium bromide, a novel thiol reagent targeted to the mitochondrial matrix.» *Arch Biochem Biophys.* 1995; 322 (1): 60-8.

Camras CB, Bito LZ. «Reduction of intraocular pressure in normal and glaucomatous primate (Aotus trivirgatus) eyes by topically applied prostaglandin F2 alpha.» *Curr Eye Res.* 1981; 1 (4): 205-9.

Contente ML, Zambelli P, Galafassi S, Tamborini L. «A new chemoenzymatic approach to the synthesis of Latanoprost and Bimatoprost.» *J Mol Catal B: Enzymatic.* 2015; 114: 7-12.

Corey EJ, Weinshenker NM, Schaaf TK, Huber W. «Stereo-controlled synthesis of dl-prostaglandins F2.alpha and E2.» *J Am Chem Soc.* 1969; 91 (20): 5675-77.

Cortés C, Encinas JL, Arias A. *Farmacología ocular.* 1ª ed. Sociedad española de oftalmología; 2007

Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B. «TFOS DEWS II Definition and Classification Report.» *The Ocular Surface.* 2017; 15: 276-283.

Crawford K, Kaufman PL. «Pilocarpine antagonizes prostaglandin F2 alpha-induced ocular hypotension in monkeys. Evidence for enhancement of Uveoscleral outflow by prostaglandin F2 alpha.» *Arch Ophthalmol.* 1987; 105 (8): 1112-6.

Deng R, Hua X, Li J, Chi W. «Oxidative Stress Markers Induced by Hyperosmolarity in Primary Human Corneal Epithelial Cells.» *PLoS ONE.* 2015; 10 (5).

Ernster L, Dallner G. «Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function.» *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1271 (1): 195-204.

Gabeh BT, Kaufman PL. «Prostaglandin F2 α increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey.» *Exp Eye Res.* 1989; 49 389-402.

Gabeh BT, Kaufman PL. «The effect of prostaglandin on trabecular outflow facility in cynomolgus monkeys.» *Exp Eye Res.* 1990; 51: 87-91.

Gruska J, Pawlak A, Kruk J. «Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers-determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products.» *Free Radic Biol Med.* 2008; 45 (6): 920-8.



Hundal T, Fosmark P, Ernster L. «Antioxidant Activity of Reduced Plastoquinone in Chloroplast Thylakoid Membranes.» *Arch Biochem Biophys*. 1995; 324 (1): 117-22.

Iomdina EN, Khoroshilova-Maslova IP, Robustova OV, Averina OA. «Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 reverses glaucomatous lesions in rabbits.» *Frontiers of Bioscience*. 2015; 20: 892-901.

James B, Bron A. *Oftalmología. Diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Manual Moderno S.A.; 2012

Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-de-Castillo JM, Dana R. «TFOS DEWS II Management and Therapy Report.» *The Ocular Surface*. 2017; 15: 575-628.

Kelso GF, Porteus CM, Smith RA, Murphy MP. «Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties.» *J Biol Chem*. 2001; 276 (7): 4588-96.

Kojima T, Wakamatsu TH, DOgru M, Ogawa Y. «Age-related dysfunction of the lacrimal gland and oxidative stress: evidence from the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice.» *Am J Pathol*. 2012; 180 (5): 1879-96.

Kruk J, Jemiola M, Burda K, Schimd GH. «Scavenging of Superoxide Generated in Photosystem I by Plastoquinol and Other Prenylipids in Thylakoid Membranes.» *Biochemistry*. 2003; 42 (28): 8501-05.

Kruk J, Trebst A. «Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II.» *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1777 (2): 154-62.

Lieberman EA, Topali LM, Skulachev VP. «Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria.» *Nature*. 1969; 222: 1076-78.

Lindsey JD, Kashiwagi K, Kashiwagi F, Weinreb RN. «Prostaglandin action on ciliary smooth muscle extracellular matrix metabolism: implications for uveoscleral outflow.» *Surv Ophthalmol*. 1997; 41 (Supl 2): S53-9.

Martynow JG, Józwik, Szelejwski W. «A New Synthetic Approach to High-Purity (15R)-Latanoprost.» *Eur J Org Chem*. 2007; 4: 689-703.

Medeiros FA, Martin KR, Peace J, Sforzolini S, Vittilow JL. «Comparison of Latanoprostene Bunod 0.024% and Timolol Maleate 0.5% in Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension: The LUNAR Study.» *Am J Ophthalmol*. 2016; 160: 250-9.



Miller EE, Berlin MS, War CL, Sharpe JA, Jamil A. «Ocular hypotensive effect of the novel EP3/FP agonist ONO-9054 versus Xalatan: results of a 28-day, doublemasked, randomised study.» *Br J Ophthalmol*. 2017; 101 (6): 796-800.

Millner PA, Barber J. «Plastoquinone as a mobile redox carrier in the photosynthetic membrane.» *FEBS Lett*. 1984; 169: 1-6.

Neroev VV, Archipova MM, Bakeeva LE, Fursova AZh. «Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 4. Age-related eye disease. SkQ1 returns vision to blind animals.» *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73 (12): 1317-28.

Nilsson FE, Samuelsson M, Bill A. «Increased Uveoscleral Outflow as a Possible Mechanism of Ocular Hypotension Caused by Prostaglandin F2 α -1-Isopropylester in the Cynomolgus Monkey.» *Exp Eye Res*. 1989; 48: 707-716.

Nowicka B, Gruszka J, Kruk J. «Function of plastochochromanol and other biological prenyllipids in the inhibition of lipid peroxidation - A comparative study in model systems.» *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1828: 233-240.

Nowicka B, Gruszka J, Kruk J. «Function of plastochochromanol and other biological prenyllipids in the inhibition of lipid peroxidation - A comparative study in model systems.» *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1828 (2): 233-40.



Nowicka B, Kruk J. «Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones.» *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1797 (9): 1587-605.

Ota T, Aihara M, Narumiya S, Araie M. «The effects of prostaglandin analogues on IOP in prostanoid FP-receptor-deficient mice.» *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46 (11): 4159-63.

Petrov A, Perekhvatova N, Skulachev M, Stein L. «SkQ1 Ophthalmic Solution for Dry Eye Treatment: Results of a Phase 2 Safety and Efficacy Clinical Study in the Environment and During Challenge in the Controlled Adverse Environment Model.» *Adv Ther*. 2016; 33: 96-115.

Pospíšil P, Prasad A. «Formation of singlet oxygen and protection against its oxidative damage in Photosystem II under abiotic stress.» *J Photochem Photobiol B*. 2014; 137: 39-48.

Prassana G, Li B, Mogi M, Rice DS. «Pharmacology of novel intraocular pressure-lowering targets that enhance conventional outflow facility: Pitfalls, promises and what lies ahead?» *Eur J Pharmacol*. 2016; 787: 47-56.

	<p align="center">Doble Grado en Farmacia, Óptica y Optimetría Pablo Serrano Giménez</p>	<p align="center">Fármacos de uso oftálmicos, situación actual y nuevos fármacos en desarrollo Trabajo de Fin de Grado</p>	
--	--	--	--

Prévost S, Thai K, Schützenmeister N, Coulthard G. «Synthesis of Prostaglandin Analogues, Latanoprost and Bimatoprost, Using Organocatalysis via a Key Bicyclic Enal Intermediate.» *Org Lett.* 2015; 17 (3): 504-507.

Resul B, Stjernschantz J, No K, Lijebris C. «Phenyl-substituted prostaglandins: potent and selective antiglaucoma agents.» *J Med Chem.* 1993; 36 (2): 243-8.

Resul B, Stjernschantz J, Selén G, Bito LZ. «Structure-activity relationships and receptor profiles of some ocular hypotensive prostanoids.» *Surv Ophthalmol.* 1997; 41 (Supl 2): S47-S52.

Seen S, Tong L. «Dry eye disease and oxidative stress.» *Acta Ophthalmol.* 2017.

Severin SE, Skulachev VP, Yaguzhinky LS. «A possible role of carnitine in transport of fatty acids through the mitochondrial membrane.» *Biokhimiya.* 1970; 35: 1250-7.

Shabalina IG, Vyssokikh MY, Gibanova N. «Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1.» *Aging (Albany NY).* 2017; 9 (2): 315-39.

Stjernschantz J, Bito LZ, Resul B. «The ocular effects of prostaglandins and the therapeutic potential of a new PGF2 alpha analog, PhXA41 (latanoprost), for glaucoma management.» *J Lipid Mediat.* 1993; 6 (1-3): 535-43.

Stjernschantz, Johan Willhelm. «From PGF2a-Isopropyl Ester to Latanoprost: A Review of the Development of Xalatan.» *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42 (6): 1134-45.

Sugimoto I, Kambe T, Okino T, Obitsu T, Ohta N. «Discovery of Novel Seven-Membered Prostacyclin Analogues as Potent and Selective Prostaglandin FP and EP3 Dual Agonists.» *ACS Med Chem.* 2017; 8 (1): 107-12.

Suto F, Rowe-Rendleman CL, Ouchi T, Jamil A. «A Novel Dual Agonist of EP3 and FP Receptors for OAG and OHT: Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ONO-9054 in Healthy Volunteers.» *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56 (13): 7963-70.

Trebst A, Depka B, Holländer H. «A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*.» *FEBS Lett.* 2002; 516 (1-3): 156-60.

Tsybul'ko E, Kremetsova A, Symomenko A, Rybina O. «The Mitochondria-Targeted Plastoquinone-Derivative SkQ1 Promotes Health and Increases *Drosophila melanogaster* Longevity in Various Environments.» *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017; 72 (4): 499-508.



Uchino Y, Kawakita T, Miyazawa M. «Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production.» *PLoS ONE*. 2012; 7 (10).

Villumsen J, Alm A. «Prostaglandin F2alfa-isopropylester eye drops: effects in normal human eyes.» *Br J Ophthalmol*. 1989; 73: 419-426.

Wegener AR, Meyer LM, Schönfeld CL. «Effect of Viscous Agents on Corneal Density in Dry Eye Disease.» *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015; 31 (8): 504-8.

Weinreb Rn, Ong T, Sforzolini S, Vittilow JL. «A randomised, controlled comparison of latanoprostene bunod and latanoprost 0.005% in the treatment of ocular hypertension and open angle glaucoma: the VOYAGER study.» *Br J Ophthalmol*. 2015; 99 (6): 738-45.

Winkler NS, Fautsch MP. «Effects of Prostaglandin Analogues on Aqueous Humor Outflow Pathways.» *J Ocul Pharmacol Ther*. 2014; 30 (2-3): 102-9.

Yamamoto K, Sato K, Masayoshi Y, Masayuki Y. «The neuroprotective effect of latanoprost acts via klotho-mediated suppression of calpain activation after optic nerve transection.» *J Neurochem*. 2017; 140: 495-508.

Yamane S, Karakawa T, Nakayama S, Nagai K, Moriyuki K. «IOP-Lowering Effect of ONO-9054, A Novel Dual Agonist of Prostanoid EP3 and FP Receptors, in Monkeys.» *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56 (4): 2547-52.

Yani, EV, Katargina, LA, Chesnokova, NB. «The first experience of using the drug Vizomitin in the treatment of dry eyes.» *Pract Med (Russ)*. 2012; 4 (59): 134-137.

Zanoni G, D'alfonso A, Porta A, Feliciani L. «The MeyereSchuster rearrangement: a new synthetic strategy leading to prostaglandins and their drug analogs, Bimatoprost and Latanoprost.» *Tetrahedron*. 2010; 66 (38): 7472-78.

Zernii EY, Gancharova OS, Baksheeva VE, Golovastova MO. «Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Prevents Anesthesia-Induced Dry Eye Syndrome.» *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017.

Zhang J, Gong Y, Yu Y. «PG F2 α Receptor: A Promising Therapeutic Target for Cardiovascular Disease.» *Front Pharmacol*. 2010; 1: 116.

Zielonka J, Joseph J, Sikora A, Hardy M. «Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanism of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications.» *Chem Rev*. 2017; 117 (15): 10043-120.