

Francisco José Gonzalvo Ibáñez

Estudio experimental in vitro de la
acción de los inhibidores de los
canales del calcio sobre los
mecanismos reparativos de los
fibroblastos humanos en la cirugía
ocular

Departamento

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es

Honrubia López, Francisco Manuel

Pablo Júlvez, Luis Emilio

Pinilla Lozano, Isabel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**ESTUDIO EXPERIMENTAL IN VITRO
DE LA ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES
DE LOS CANALES DEL CALCIO
SOBRE LOS MECANISMOS
REPARATIVOS DE LOS
FIBROBLASTOS HUMANOS EN LA
CIRUGÍA OCULAR**

Autor

Francisco José Gonzalvo Ibáñez

Director/es

Honrubia López, Francisco Manuel
Pablo Júlvez, Luis Emilio
Pinilla Lozano, Isabel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2003

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**HOSPITAL UNIVERSITARIO MIGUEL SERVET
ZARAGOZA**

SERVICIO DE OFTALMOLOGÍA

Prof. F. M. HONRUBIA LÓPEZ

***"ESTUDIO EXPERIMENTAL IN VITRO DE LA ACCIÓN DE
LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO
SOBRE LOS MECANISMOS REPARATIVOS DE LOS
FIBROBLASTOS HUMANOS EN LA CIRUGÍA OCULAR"***

**Trabajo de investigación para optar al
GRADO DE DOCTOR
presentado por el Licenciado en Medicina y Cirugía:
D. FRANCISCO JOSÉ GONZALVO IBÁÑEZ**

**Junio 2003
ZARAGOZA**

D. FRANCISCO MANUEL HONRUBIA LÓPEZ, Profesor Titular de Oftalmología de la Facultad de Medicina de Zaragoza y Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "*ESTUDIO EXPERIMENTAL IN VITRO DE LA ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO SOBRE LOS MECANISMOS REPARATIVOS DE LOS FIBROBLASTOS HUMANOS EN LA CIRUGÍA OCULAR*" que presenta D. FRANCISCO JOSÉ GONZALVO IBÁÑEZ, Licenciado en Medicina y Cirugía, para optar al GRADO DE DOCTOR, fue realizado bajo mi dirección, no existiendo impedimento alguno para su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 14 de Marzo de 2.003.

Fdo. Prof. FRANCISCO M. HONRUBIA LÓPEZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Honrubia López', is written over the printed name. The signature is stylized and includes a long horizontal stroke at the bottom.

D. LUIS EMILIO PABLO JÚLVEZ, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de Oftalmología de la Facultad de Medicina de Zaragoza y Facultativo Especialista del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "*ESTUDIO EXPERIMENTAL IN VITRO DE LA ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO SOBRE LOS MECANISMOS REPARATIVOS DE LOS FIBROBLASTOS HUMANOS EN LA CIRUGÍA OCULAR*" que presenta D. FRANCISCO JOSÉ GONZALVO IBÁÑEZ, Licenciado en Medicina y Cirugía, para optar al GRADO DE DOCTOR, reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 14 de Marzo de 2.003.



Fdo. LUIS EMILIO PABLO JÚLVEZ

Dña. ISABEL PINILLA LOZANO, Doctora en Medicina y Cirugía y Facultativo Especialista del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "*ESTUDIO EXPERIMENTAL IN VITRO DE LA ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO SOBRE LOS MECANISMOS REPARATIVOS DE LOS FIBROBLASTOS HUMANOS EN LA CIRUGÍA OCULAR*" que presenta D. FRANCISCO JOSÉ GONZALVO IBÁÑEZ, Licenciado en Medicina y Cirugía, para optar al GRADO DE DOCTOR, reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Zaragoza, a 14 de Marzo de 2.003.



Fdo. ISABEL PINILLA LOZANO

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y financiado por la Beca del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) nº 99/1235 del Instituto de Salud Carlos III, dependiente de la Subdirección General de Investigación Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Consumo y por una Beca de ayuda concedida por las Comisiones de Becas y Ayudas y de Formación Continuada del Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Zaragoza.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Honrubia, director de esta tesis, por su ayuda y estímulo, y por saber transmitir el interés por la investigación a todos los miembros de su Servicio.

Al Dr. Luis Pablo y a la Dra. Isabel Pinilla por su interés en crear esta nueva línea de investigación con cultivos celulares y por su asesoramiento y colaboración en la realización del presente trabajo.

A Carlos Solans y al Profesor Bregante por su colaboración en los estudios de fotosensibilidad con dihidropiridinas.

A la Dra. Teresa Ramírez por su colaboración en el estudio citopatológico.

A todos mis compañeros residentes, en especial a la Dra. Lucía Izaguirre.

A todos los miembros del Servicio de Oftalmología del Hospital Miguel Servet.

A todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido desinteresadamente al desarrollo y realización de este trabajo, en especial al Personal del Servicio de Esterilización del Hospital Miguel Servet.

Al Dr. Miguel Angel Rota por su atención, su ejemplo y por despertar en mí la vocación por la Medicina. Mi más sincero agradecimiento.

A mis padres por su esfuerzo y dedicación.

A Isabel por su continuo apoyo y por la gran cantidad de tiempo y esfuerzo dedicados. Muchas gracias por todo lo pasado y por lo que queda por venir.

ÍNDICE

<i>I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA</i>	1
<i>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</i>	6
<i>III. INTRODUCCIÓN</i>	8
A. El glaucoma	9
1. Definición	9
2. Fisiopatología	10
3. Etiopatogenia	11
3.1. Teorías patogénicas	11
3.1.1. Teoría vasogénica	11
3.1.2. Teoría mecánica	12
3.2. Factores de riesgo para desarrollar glaucoma	13
3.2.1. Factores oculares	13
3.2.2. Factores generales	13
4. Tratamiento del glaucoma	14
5. Tratamiento quirúrgico del glaucoma. La trabeculectomía	16
5.1. Bases y modalidades de los procedimientos filtrantes	16
5.2. La trabeculectomía en los glaucomas de alto riesgo	17
B. La reparación tisular. El proceso de cicatrización	19
1. Introducción	19
2. Eventos cronológicos en la curación de la herida quirúrgica. Cicatrización por primera intención	19
3. Fases del proceso de cicatrización	22
3.1. Fase inflamatoria	23
3.1.1. Aumento de la permeabilidad vascular	23
3.1.2. Papel de las plaquetas en el proceso cicatricial	24

3.1.3. La coagulación	26
3.1.4. Papel del sistema inmune en la fase inflamatoria de la cicatrización	27
3.2. Fase proliferativa	30
3.2.1. El tejido de granulación	30
3.2.2. La angiogénesis	31
3.2.3. Papel del fibroblasto en la cicatrización. La fibroplasia	33
3.3. Fase de remodelación cicatricial	40
3.3.1. Matriz extracelular e interacciones célula-matriz	40
3.3.2. Las metaloproteinasas	42
3.3.3. Papel del colágeno cicatricial	43
3.3.4. Elastina, fibrilina y fibras elásticas	46
3.3.5. Glucoproteínas e integrinas de adhesión. Las cadherinas	47
3.3.6. Proteoglicanos e hialuronatos	49
3.3.7. Proteínas de la matriz celular	50
4. Factores que influyen en la curación de las heridas	51
4.1. Factores locales	51
4.2. Factores generales	51
C. La regulación del crecimiento celular	53
1. Fenómenos moleculares del crecimiento celular	53
2. Receptores de la superficie celular implicados en los fenómenos de crecimiento	53
3. Sistemas de transmisión de señales	54
4. Los factores de transcripción	56
5. Ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas y puntos de control. Inhibición del crecimiento	56
6. Factores de crecimiento	58
6.1. Factor transformador del crecimiento (TGF) y factores afines	58
6.2. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	59

6.3. Familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	60
6.4. Otros factores de crecimiento implicados en la cicatrización	60
D. Cultivos celulares en el estudio de la cicatrización	61
1. Utilidad de los cultivos celulares en el estudio de la cicatrización	61
2. Modelos de lesión <i>in vitro</i>	64
E. Modulación de la cicatrización en la cirugía filtrante del glaucoma	66
1. Acción de los fármacos sobre la cirugía filtrante del glaucoma	66
2. Los antimetabólicos: 5-fluorouracilo y mitomicina C	68
3. Nuevas estrategias en la modulación de la cicatrización	69
F. El calcio. Los inhibidores de los canales del calcio	73
1. Homeostasis del calcio. El calcio extracelular. Balance del calcio	73
2. Transporte de calcio en las membranas celulares	75
2.1. Sistemas de transporte de iones en las membranas celulares	75
2.2. Canales de transporte de calcio en la membrana citoplasmática. Los canales iónicos	77
2.3. Los canales del calcio voltaje-dependientes	79
2.3.1. Características generales	79
2.3.2. Clasificación	80
2.3.3. Estructura molecular	83
2.3.4. Funcionamiento	86
2.3.5. Efectos sobre la dinámica del calcio	89
2.4. Canales del calcio asociados a receptores	89
2.5. Canales del calcio asociados a los depósitos intracelulares de calcio	92
2.6. Otras vías de transporte de calcio	93
2.6.1. Canales de calcio asociados a nucleótidos cíclicos	93
2.6.2. El antitransportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$	93
2.6.3. La bomba de calcio dependiente de ATP (ATPasa-Ca^{++})	94

3. El calcio intracelular	95
3.1. Funciones del calcio intracelular	95
3.2. Depósitos endocelulares de calcio	96
3.2.1. El retículo endoplásmico.	
Receptores de inositol-trifosfato y ryanodina	97
3.2.2. La mitocondria y el calcio	100
3.3. Proteínas fijadoras de calcio.	
La calmodulina y el complejo calcio-calmodulina	101
3.4. Sistemas de movilización del calcio intracelular	105
3.4.1. Sistema de las proteínas G	105
3.4.2. Sistemas de las adenilciclasas	106
3.4.3. Sistema de fosfoinosítidos	107
3.4.4. Sistema de la fosfolipasa A ₂	108
3.5. Papel del calcio en los procesos reparativos cicatriciales	109
4. Fármacos antagonistas del calcio	115
4.1. Concepto, clasificación e indicaciones de los antagonistas del calcio	115
4.2. Inhibidores de los canales del calcio de clase 1	121
4.2.1. Mecanismo básico de acción	121
4.2.2. Las dihidropiridinas	122
4.2.3. Diltiazem (DTZ) y verapamilo (VPM)	124
4.2.4. Efecto antiproliferativo de los inhibidores de los canales del calcio de clase 1	125
4.3. Sistemas analíticos de determinación de dihidropiridinas	126
4.4. Trifluoperazina (TFP)	127
4.5. Mibefradil (MBF)	127

IV. MATERIAL Y MÉTODOS	129
A. Material	130
1. Lugar de trabajo	130
2. Equipo, material y reactivos para el estudio de fotosensibilidad	131
2.1. Material de laboratorio para el estudio de fotosensibilidad	131
2.2. Fármacos y reactivos para el estudio de fotosensibilidad	132
3. Equipo, material, reactivos y productos de cultivo celular	132
3.1. Equipo de cultivo celular	132
3.2. Material de cultivo celular	134
3.3. Productos, fármacos y reactivos de cultivo celular	135
B. Métodos	137
1. Estudio de la fotosensibilidad de las dihidropiridinas	137
1.1. Determinación de la longitud de onda del sistema de detección	137
1.2. Optimización de las condiciones cromatográficas	138
1.3. Estudio de la fotosensibilidad	138
2. Cultivo celular	138
2.1. Condiciones de trabajo en el laboratorio	138
2.2. Condiciones generales de cultivo celular	139
2.2.1. Medios de cultivo	139
2.2.2. Preparación del medio de cultivo	140
2.2.3. Condiciones de incubación	142
2.2.4. Origen de las líneas celulares	142
2.2.5. Siembra de la biopsia	142
2.2.6. Propagación inicial de los fibroblastos	144
2.2.7. Subcultivo de fibroblastos	144
3. Estudio de la capacidad de reparación fibroblástica	145
3.1. Modelo de lesión <i>in vitro</i>	145

3.2. Cálculo del área de la lesión	146
4. Estudio de la proliferación celular mediante el reactivo WST-1	148
4.1. Condiciones de incubación	148
4.2. Condiciones de lectura de la absorbancia	148
5. Estudio de adhesividad celular mediante el reactivo WST-1	150
5.1. Condiciones de incubación	150
5.2. Condiciones de lectura de la absorbancia	150
6. Estudios de viabilidad celular	151
6.1. Estudio de la viabilidad celular con WST-1	151
6.2. Estudio de la viabilidad celular con tinción de azul tripán	151
7.- Estudio citopatológico	152
8.- Preparación de los fármacos, diluciones y controles	152
8.1. Fármacos y diluciones	152
8.2. Concentraciones estudiadas	153
9. Protocolo experimental	153
10. Análisis estadístico	155
V. RESULTADOS	156
1. Estudio de fotosensibilidad de las dihidropiridinas	157
1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas	157
1.1.1. Determinación de la longitud de onda del sistema de detección	157
1.1.2. Optimización de la composición de la fase móvil en HPLC	157
1.2. Patrones de fotosensibilidad y fotoestabilidad de las dihidropiridinas	158
1.2.1. Estudio de la fotosensibilidad del nicardipino	158
1.2.2. Estudio de la fotosensibilidad del nimodipino	158
1.2.3. Estudio de la fotosensibilidad del nisoldipino	158
2. Establecimiento de las líneas celulares	172

3. Validación del modelo de lesión <i>in vitro</i>	178
3.1. Comparación y correlación	178
3.2. Reproducibilidad	180
4. Efecto de los inhibidores de los canales del calcio sobre la cinética de reparación fibroblástica <i>in vitro</i>	181
4.1. Efecto de la trifluoperazina sobre la cinética de reparación fibroblástica	185
4.2. Efecto del diltiazem sobre la cinética de reparación fibroblástica	189
4.3. Efecto del verapamilo sobre la cinética de reparación fibroblástica	193
4.4. Efecto del mibefradil sobre la cinética de reparación fibroblástica	197
4.5. Efecto del nicardipino sobre la cinética de reparación fibroblástica	201
4.6. Efecto del nifedipino sobre la cinética de reparación fibroblástica	205
4.7. Efecto del nimodipino sobre la cinética de reparación fibroblástica	209
4.8. Efecto del nitrendipino sobre la cinética de reparación fibroblástica	213
4.9. Efecto del nisoldipino sobre la cinética de reparación fibroblástica	217
5. Efecto de los inhibidores de los canales del calcio sobre la proliferación celular <i>in vitro</i>	221
5.1. Efecto de la trifluoperazina sobre la proliferación celular	221
5.2. Efecto del diltiazem sobre la proliferación celular	223
5.3. Efecto del verapamilo sobre la proliferación celular	225
5.4. Efecto del mibefradil sobre la proliferación celular	227
5.5. Efecto del nicardipino sobre la proliferación celular	229
5.6. Efecto del nifedipino sobre la proliferación celular	231
5.7. Efecto del nimodipino sobre la proliferación celular	233
5.8. Efecto del nitrendipino sobre la proliferación celular	235
5.9. Efecto del nisoldipino sobre la proliferación celular	237
6. Efecto de los inhibidores de los canales del calcio sobre la adhesividad celular <i>in vitro</i>	239
6.1. Efecto de la trifluoperazina sobre la adhesividad celular	239
6.2. Efecto del diltiazem sobre la adhesividad celular	239

6.3. Efecto del verapamilo sobre la adhesividad celular	239
6.4. Efecto del mibefradil sobre la adhesividad celular	239
6.5. Efecto del nicardipino sobre la adhesividad celular	240
6.6. Efecto del nifedipino sobre la adhesividad celular	240
6.7. Efecto del nimodipino sobre la adhesividad celular	240
6.8. Efecto del nitrendipino sobre la adhesividad celular	240
6.9. Efecto del nisoldipino sobre la adhesividad celular	240
7. Efecto de los inhibidores de los canales del calcio sobre la viabilidad celular <i>in vitro</i>	241
7.1. Efecto de la trifluoperazina sobre la viabilidad celular	241
7.2. Efecto del diltiazem sobre la viabilidad celular	241
7.3. Efecto del verapamilo sobre la viabilidad celular	242
7.4. Efecto del mibefradil sobre la viabilidad celular	242
7.5. Efecto del nicardipino sobre la viabilidad celular	242
7.6. Efecto del nifedipino sobre la viabilidad celular	242
7.7. Efecto del nimodipino sobre la viabilidad celular	243
7.8. Efecto del nitrendipino sobre la viabilidad celular	243
7.9. Efecto del nisoldipino sobre la viabilidad celular	243
8. Estudio citopatológico	253
VI. DISCUSIÓN	258
1. Consideraciones metodológicas	259
1.1. Estudio de fotosensibilidad de las dihidropiridinas	259
1.2. Condiciones de iluminación	259
1.3. Preparación de los fármacos	261
1.4. Necesidad y limitaciones de los estudios de citotoxicidad <i>in vitro</i>	262
1.5. El modelo de lesión <i>in vitro</i>	263

1.6. Estudios de proliferación y viabilidad con el reactivo WST-1	270
1.7. Estudios de adhesividad con el reactivo WST-1	276
1.8. Métodos estadísticos	277
1.9. Complicaciones	277
2. Efecto de los inhibidores de los canales del calcio sobre la cinética de reparación <i>in vitro</i>	278
3. Efecto de los inhibidores de los canales del calcio como inhibidores de la proliferación y adhesividad fibroblásticas <i>in vitro</i>	281
4. Citotoxicidad	296
VII. CONCLUSIONES	297
VIII. BIBLIOGRAFÍA	300

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADP: Adenosín difosfato.

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxiazolpropiónico.

AMPc: Adenosín-5'-monofosfato cíclico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: Adenosín trifosfato.

ATPasa-Ca⁺⁺: Adenosín trifosfatasa dependiente del calcio.

BAPN: β -Aminopropionitrilo.

Ca⁺⁺: Calcio.

Ca-Cm: Complejo calcio-calmodulina.

CCRD: Canales del calcio receptor dependientes.

CCVD: Canales del calcio voltaje dependientes.

Cm: Calmodulina.

DG: Diacilglicerol.

DI₅₀: Dosis inhibitoria 50.

DMEM: Medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco.

DTZ: Diltiazem.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EPR: Epitelio pigmentario de la retina.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

5-FU: 5-Fluorouracilo.

GCS: Glaucoma crónico simple.

GDP: Guanosín difosfato.

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico.

GTP: Guanosín trifosfato.

HMG-CoA-R: Hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa.

HPLC: Cromatografía líquida de alta precisión.

ICC: Inhibidores de los canales del calcio.

IF: Interferón.

IGF: Factores de crecimiento similares a la insulina.

IL: Interleuquina.

IP₃: Inositol trifosfato.

kD: Kilodaltons.

M: Molar.

mM: Milimolar.

μM : Micromolar.
nM: Nanomolar.
MAP: Proteína activada por mitógenos.
MBF: Mibefradil.
MEC: Matriz extracelular.
MMC: Mitomicina C.
mmHg: Milímetros de mercurio.
NDMA: N-metil-D-aspartato.
NIC: Nicardipino.
NIF: Nifedipino.
NIM: Nimodipino.
NIS: Nisoldipino.
NIT: Nitrendipino.
PBS: Tampón fosfato salino.
PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
Pi: Fósforo inorgánico.
PIO: Presión intraocular.
PIP₂: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.
PKA: Proteínkinasa A.
PKC: Proteínkinasa C.
PLA₂: Fosfolipasa A₂.
PLC: Fosfolipasa C.
PTH: Hormona paratiroidea.
RGD: Receptores con la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico.
Ry: Ryanodina.
SBF: Suero bovino fetal.
SSB: Solución salina balanceada.
t_{1/2}: Vida media.
TFP: Trifluoperazina.
TGF: Factor transformador del crecimiento.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
Tripsina-EDTA: Solución de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético.
TXA₂: Tromboxano A₂.
VEGF: Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular.
VPM: Verapamilo.

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

JUSTIFICACIÓN.

El glaucoma es la tercera causa de ceguera en el mundo (1). Estimaciones recientes sobre la prevalencia a nivel mundial calculaban que en el año 2000 más de 67 millones de personas presentarían glaucoma primario, y más de 6 millones padecerían ceguera bilateral por dicha causa. En los países desarrollados, menos del 50% de las personas que padecen glaucoma saben que sufren la enfermedad. En los países en vías de desarrollo, la tasa de conocimiento es aún menor (2).

Quigley, siguiendo metodología metaanalítica, estimó que en el año 2000 aproximadamente 68 millones de personas padecerían glaucoma en todo el mundo. En este mismo momento, sólo en los Estados Unidos casi 3 millones de personas padecerían glaucoma, y unas 130.000 serían legalmente ciegas por esta enfermedad (3). Según estadísticas correspondientes a este país, cada año se detectan más de 300.000 nuevos casos de glaucoma, más de 900.000 norteamericanos sufren algún tipo de limitación visual por esta causa y, aunque la mayoría de los ojos que pierden visión por la enfermedad no se convierten en legalmente ciegos, el glaucoma ocasiona anualmente el 12% de las nuevas cegueras legales (4).

Las consecuencias sociales y económicas del glaucoma son importantes. Alrededor del 8,5% de las visitas de pacientes a la consulta oftalmológica son por causa del glaucoma. Los gastos anuales de tratamiento médico en Estados Unidos ascienden a 420 millones de dólares al año y si se incluyen los gastos por consultas médicas, el gasto asciende a 900 millones de dólares. Otros 1.900 millones se perdieron en horas de trabajo (3, 4). Estas cifras demuestran la relevancia del glaucoma como un problema de salud pública.

En el año 1992, Fuchs (5) presentó su trabajo sobre la ceguera por causa del glaucoma en Dinamarca, estimando que el 4-5% de la población glaucomatosa era ciega, lo que suponía una incidencia anual de 7 personas por cada 100.000 habitantes mayores de 65 años. Según Rosenberg (6), el 5% de los ciegos de este país en 1996 lo eran por glaucoma.

En el año 1998, Hattenhauer (7) realizó un estudio retrospectivo en los Estados Unidos sobre 295 pacientes con glaucoma de ángulo abierto, y estimó la probabilidad acumulada de ceguera por dicha enfermedad. La probabilidad acumulada de ceguera por glaucoma tras 20 años de seguimiento era, en al menos un ojo, del 27% y, en ambos ojos, del 9%. La probabilidad acumulada de ceguera en pacientes con hipertensión ocular

tratada tras ese mismo periodo de seguimiento era, en al menos un ojo, del 14% y, en ambos ojos, del 4%.

El glaucoma es raro en niños e infrecuente en jóvenes, pero su frecuencia aumenta progresivamente en pacientes de mayor edad. De un 0,4 a un 1,6% de la población mayor de 40 años padece disminución de la agudeza visual por glaucoma (8). La prevalencia de la enfermedad glaucomatosa en mayores de 70 años es del 1 al 4% (9).

En España la prevalencia de glaucoma se sitúa entre el 1-2%, aumentando al 3-4% en mayores de 70 años y al 10% si los padres padecen la enfermedad. Un octavo de los casos de ceguera son debidos a esta enfermedad. En nuestro país el glaucoma, la retinopatía diabética y los traumatismos oculares son las principales causas de ceguera permanente (10). En Aragón, considerando el progresivo envejecimiento de la población, superior a la media nacional, se puede estimar que la incidencia y prevalencia del glaucoma debe ser todavía superior, y se incrementará en un futuro próximo (11).

El tratamiento inicial del glaucoma es habitualmente médico y se basa en la administración de medicación hipotensora tópica. Si esta modalidad terapéutica no logra el control de la enfermedad, el segundo paso puede ser el tratamiento con láser (trabeculoplastia) o el tratamiento quirúrgico, usando técnicas de cirugía filtrante, siendo la más usada en la actualidad la trabeculectomía (12, 13). Esta estrategia es cuestionada por diversos autores y, actualmente, se tiende a una indicación más precoz del tratamiento quirúrgico (14, 15).

El fundamento de la trabeculectomía consiste en crear una comunicación que permita el paso del humor acuoso desde la cámara anterior del ojo al espacio subconjuntival y luego a la película lagrimal o a los vasos conjuntivales, en cantidad suficiente para conseguir una reducción adecuada de la presión intraocular (PIO) (16, 17).

La trabeculectomía consigue una tasa de éxitos elevada en el glaucoma crónico simple. Desafortunadamente, existe un grupo de pacientes que no logran un control adecuado de su PIO tras las medidas de tratamiento indicadas, con lo que el nervio óptico, y por lo tanto la visión, evolucionan hacia un deterioro progresivo (18-20). Este grupo está formado fundamentalmente por los denominados glaucomas de "alto riesgo" entre los que se encuentran el glaucoma congénito, el juvenil, el postraumático, el inflamatorio, el glaucoma del afáquico o el fracaso de una cirugía filtrante previa (21-23) .

Estudios histológicos realizados en humanos y animales de experimentación sugieren que la principal causa del fracaso de la trabeculectomía se debe a la formación de tejido fibrovascular denso en el área de la intervención (24-28). El proceso de cicatrización que provoca la acumulación de este tejido es consecuencia de la migración,

proliferación celular y formación de neovasos que se acompaña del depósito de material extracelular y su posterior contracción (29-31). Por ello, es razonable pensar que los agentes que puedan interferir en el desarrollo de alguna de las fases de la cicatrización, podrían inhibir una espuesta cicatricial excesiva sobre el área quirúrgica, consiguiendo una mayor y más prolongada eficacia de la técnica filtrante (32).

En los glaucomas de alto riesgo el proceso cicatricial postquirúrgico se manifiesta de forma más intensa, ya sea por la presencia de un proceso cicatricial previo, la existencia de células inflamatorias en el área quirúrgica o una respuesta elevada a la agresión (26-28). Todos estos pacientes son candidatos preferentes a la cirugía del glaucoma con antimetabolitos.

La mitomicina C (MMC) y el 5-fluorouracilo (5-FU) son actualmente los agentes más empleados en la cirugía filtrante del glaucoma por su potencial capacidad inhibitoria de los procesos cicatriciales (33-34). Un notable porcentaje de fracasos en la cirugía filtrante del glaucoma, sobre todo en los casos de alto riesgo, ha sido solucionado con la aplicación de estos antimitóticos. Sin embargo, la irreversibilidad de sus acciones, las dudas en su dosificación y la aparición de algunas complicaciones severas hacen necesaria la búsqueda de procedimientos alternativos (35-38).

Los inhibidores de los canales del calcio (ICC) son un amplio y heterogéneo grupo de fármacos, sobre los que se tiene una prolongada experiencia en el tratamiento de diversos procesos, principalmente del aparato cardiovascular (39). Estos fármacos actúan inhibiendo la entrada de calcio (Ca^{++}) al interior del citoplasma a través de los canales del Ca^{++} dependientes de voltaje (39-41). El catión Ca^{++} juega un papel central en diferentes puntos del proceso cicatricial (42). El Ca^{++} intracelular se une a la Calmodulina (Cm), formando el complejo Ca^{++} -Calmodulina (CaCm), principal mediador de los efectos del Ca^{++} en el interior celular. Algunos ICC han demostrado además un efecto inhibitor directo sobre el CaCm (43). Diferentes estudios han demostrado la capacidad de varios ICC como inhibidores de la proliferación de diferentes estirpes celulares (42, 44-46).

La necesidad del presente estudio de investigación deriva del problema planteado por los fracasos en la cirugía filtrante en ciertos tipos de glaucoma y de la necesidad de buscar nuevos agentes con efecto antiproliferativo, más seguros en cuanto a su modo de utilización, con menor número de complicaciones y una eficacia al menos similar a los actualmente utilizados.

La investigación de los sucesos que acontecen a nivel celular en el proceso de cicatrización ha conducido al desarrollo de sistemas celulares aislados o cultivos de células. Estos sistemas han utilizado fibroblastos oculares humanos (42, 47-58),

fibroblastos humanos de origen extraocular (59, 60) y otros tipos de células oculares humanas (61-63). En modelos animales se han utilizado fibroblastos oculares (64-70), fibroblastos animales extraoculares (71) y otras estirpes celulares oculares animales (70, 72, 73). Los modelos de reparación *in vitro* utilizados consisten básicamente en la producción de lesiones en cultivos de células en monocapa. Este modelo, con pequeñas variantes, se ha utilizado en diferentes estirpes celulares como células del endotelio vascular, queratinocitos, células epiteliales y fibroblastos humanos de origen ocular (64, 74-77).

La aplicación de los ICC sobre el cultivo fibroblástico y sobre un modelo de reparación fibroblástica *in vitro*, posibilita el estudio de las concentraciones exactas a las que estos fármacos son capaces de inhibir los diferentes procesos implicados en la reparación tisular, conocer su toxicidad, su interferencia sobre la viabilidad y proliferación celular, y permite establecer las dosificaciones adecuadas para su aplicación futura en un modelo experimental *in vivo*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Los inhibidores de los canales del calcio trifluoperazina, diltiazem, verapamilo, mibefradil, nicardipino, nifedipino, nimodipino, nitrendipino y nisoldipino inhiben los mecanismos implicados en la reparación tisular (migración, proliferación y adhesividad fibroblástica) en cultivos de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon.

OBJETIVOS.

1.- Determinar las concentraciones de todos los fármacos que presentan actividad inhibitoria sobre dos aspectos básicos del proceso de reparación tisular como son la migración y la proliferación fibroblástica en un modelo de lesión *in vitro*.

2.- Determinar las concentraciones de todos los fármacos que presentan actividad inhibitoria sobre la proliferación celular en monocapas de fibroblastos *in vitro*.

3.- Determinar las concentraciones de todos los fármacos que presentan actividad inhibitoria sobre la adhesividad fibroblástica *in vitro*.

4.- Estudiar el efecto de los fármacos sobre la viabilidad fibroblástica *in vitro*.

5.- Estudiar las alteraciones citológicas que las diferentes concentraciones de los fármacos puedan inducir sobre los fibroblastos *in vitro*.

6.- Establecer un modelo de lesión *in vitro* que permita estudiar la cinética de reparación de los fibroblastos humanos de cápsula de Tenon.

7.- Determinar la fotosensibilidad de nicardipino, nimodipino y nisoldipino frente a diferentes fuentes de radiación luminosa y establecer las condiciones lumínicas óptimas de seguridad para su manejo en el laboratorio.

8.- Abrir nuevas vías de experimentación, sentando las bases sobre las que seguir investigando con el objetivo último de definir las concentraciones de los fármacos que presenten la mejor relación eficacia / efectos adversos para la aplicación de éstos en la cirugía filtrante del glaucoma y en otras patologías oculares que puedan beneficiarse del uso de sustancias con poder antiproliferativo.

INTRODUCCIÓN

A.- EL GLAUCOMA.

1.- DEFINICIÓN DE GLAUCOMA.

El glaucoma puede definirse como un conjunto de procesos patológicos oculares en los cuales la PIO es demasiado alta para permitir el correcto funcionamiento del nervio óptico. Esta disfunción se manifiesta por unos cambios característicos en el campo visual, en la papila y en la capa de fibras nerviosas de la retina (78). Esta definición, sin embargo, es bastante imprecisa, ya que no se conoce cuál es la PIO que llevará, en cada paciente, al daño glaucomatoso, ni ha sido totalmente desvelado el mecanismo por el cual se produce la atrofia del nervio óptico.

La aparición de daño glaucomatoso en el nervio óptico es más frecuente en ojos con PIO superior a 21 mmHg, lo que refuerza la importancia de este factor en la génesis de la enfermedad (78). Sin embargo, en muchos casos la elevación sostenida de la PIO por encima de lo considerado "normal" de forma estadística, no causa alteraciones en el nervio óptico o campo visual (79, 80). Del mismo modo, pacientes con daño en el nervio óptico o campo visual característicos de glaucoma presentan de forma continuada valores de PIO consideradas inferiores al límite inferior de la normalidad (81).

Actualmente, la enfermedad glaucomatosa es considerada como una neuropatía óptica, en la que el factor PIO elevada es uno más de los que concurren para producir la atrofia y desaparición de las fibras nerviosas de la retina (82). Sin embargo, la PIO sigue siendo un factor primordial para el desarrollo de la enfermedad y es necesario comprender por qué se eleva por encima de los límites soportables por las células ganglionares y cómo es posible actuar para que esto no suceda (78, 81).

El glaucoma primario de ángulo abierto o glaucoma crónico simple (GCS) es la forma más frecuente de glaucoma. Se define por la conjunción de una serie de factores que estadísticamente aparecen en el 95% de la población glaucomatosa. Estos factores comprenden:

- PIO elevada en valores superiores a 21 mmHg.
- Alteraciones características de la papila.
- Alteraciones características del campo visual.
- Angulo de la cámara anterior abierto y sin anomalías.

En la actualidad, a estos criterios "clásicos" hay que añadir las alteraciones en la capa de fibras nerviosas de la retina, sin necesidad de encontrar alteraciones en la papila

o campo visual (79). En el glaucoma de baja tensión no es necesaria la existencia de una PIO superior a 21 mmHg para el diagnóstico (81). La evolución clínica del GCS es típicamente asintomática hasta que se produce una pérdida avanzada e irreversible del campo visual.

2.- FISIOPATOLOGÍA DEL GLAUCOMA.

El factor clave en la fisiopatología del glaucoma es el déficit de drenaje del humor acuoso, con el consiguiente incremento de la PIO (83). Sólo en casos excepcionales el aumento de la PIO se debe a la mayor producción de humor acuoso.

En el glaucoma los cambios histológicos que se producen en el trabéculum son muy similares a los encontrados en la edad senil. La malla trabecular incrementa su grosor con la edad, principalmente a expensas de colágeno rizado, espacios vacíos y colágeno regular, todos localizados en la membrana basal de la zona cortical. Hay también un adelgazamiento de la zona central con signos degenerativos en las fibras de colágeno y elásticas. Además, el endotelio de la malla trabecular se adelgaza y sus células se reducen en número aumentando sus inclusiones intracitoplásmicas (84).

Por otra parte, en muestras histológicas de piezas trabeculares de pacientes glaucomatosos se ha observado como dato más notable un aumento de queratán sulfato en la MEC (85). Sin embargo el papel de los mucopolisacáridos que tapizan los espacios de la malla trabecular en el glaucoma es controvertido ya que se han detectado en ojos glaucomatosos y normales (86).

La zona pericanalicular del canal de Schlemm también presenta en el glaucoma cambios comparables a los de ojos seniles normales, existiendo pérdida de la celularidad y aumento del componente fibroso, más marcada en la pared trabecular. Este acúmulo fibroso podría ser clave como productor de un aumento de la resistencia al flujo de salida del humor acuoso y consecuentemente aumentar la PIO en pacientes con glaucoma. Las células endoteliales del canal de Schlemm no muestran cambios apreciables con la edad. En ojos con enfermedad glaucomatosa avanzada se aprecia aplanamiento y pérdida celular con signos de degeneración nuclear y citoplasmática. La membrana basal es más gruesa que en el ojo normal. Los canales vacuolares que configuran las células endoteliales serían fundamentales para mantener la PIO, que aumentaría sin un buen drenaje (84, 87).

3.- ETIOPATOGENIA DEL GLAUCOMA.

3.1.- TEORÍAS PATOGENICAS.

Müeller en el siglo XIX estableció la teoría mecánica, en la que la PIO elevada causaba la muerte neuronal (88). Por otro lado, Von Jaeger sugirió una anomalía vascular como origen de la pérdida neuronal, planteando la teoría vascular (89). En 1925 La Grange y Beauvieux impulsaron esta última teoría, responsabilizando a la isquemia tisular de la atrofia (90). En 1968 Lampert y colaboradores relanzaron la teoría mecánica, al poner de relieve la importancia del flujo axoplásmico (91).

3.1.1.- TEORÍA VASOGENICA DEL GLAUCOMA.

La teoría vasogénica atribuye el daño producido en la cabeza del nervio óptico a una isquemia crónica o temporal en esa zona. El fallo en el aporte sanguíneo de la coroides peripapilar y de las arterias ciliares posteriores a la parte anterior del nervio óptico sería debido a una elevación de la PIO o a un fallo de perfusión de las arterias ciliares cortas posteriores (92).

Los defensores de esta teoría sostienen que la irrigación del nervio óptico se produce desde un sistema de baja presión no autorregulado. La ruptura del equilibrio entre el aporte vascular y la PIO, ya sea por aumento de ésta o por disminución de la irrigación, daría lugar a una isquemia neuronal (80, 93).

La presión arterial sistémica también está relacionada con la etiopatogenia de la enfermedad glaucomatosa. Los pacientes con glaucoma de baja tensión presentan una alta incidencia de hipotensión arterial y/o crisis hemodinámicas por lo que en estos ojos se produciría una alteración circulatoria local con producción de daño neuronal, incluso con PIO baja (92-96).

Las hemorragias en el borde papilar que se encuentran en ojos glaucomatosos serían, para los defensores de esta teoría, los signos de una neuropatía isquémica anterior focal. Así, la lesión del nervio óptico se produciría por una disminución de la tensión arterial media de los vasos nutricios que aportan el riego a la cabeza del nervio óptico y la progresión de los defectos campimétricos sería mayor en aquellos pacientes que presentan hemorragias papilares (97).

En este sentido, Buckley (98) defiende la existencia de una disfunción sistémica de las células del endotelio vascular en pacientes con glaucoma normotensivo. Esta

disfunción endotelial generaría un desequilibrio entre la producción de factores vasodilatadores y vasoconstrictores a favor de éstos últimos. Los factores liberados por el endotelio alterado, como la 5-hidroxitriptamina o la endotelina-1 (tal vez, el vasoconstrictor más potente conocido en la actualidad), determinarían una vasoconstricción en la microvascularización del nervio óptico y su consiguiente isquemia. Atendiendo a este mecanismo patogénico, algunos autores han evaluado el posible efecto terapéutico y neuroprotector que podría aportar la vasodilatación arterial inducida por la administración tópica o sistémica de diversos fármacos ICC (99-102). El vasoespasmo microvascular dependiente de endotelina-1 ha sido experimentalmente revertido por nifedipino (NIF) 10^{-5} M (98).

3.1.2.- TEORÍA MECÁNICA DEL GLAUCOMA.

La teoría mecánica postula el abombamiento de la lámina cribosa, secundario al incremento de la PIO. Esta distorsión de la lámina cribosa origina una obstrucción del flujo axoplásmico y finalmente la muerte celular (103).

Estudios histológicos en ojos humanos y de primates en los que se produjo una elevación de la PIO mediante aplicaciones de láser en la malla trabecular, mostraron patrones idénticos de pérdida de fibras nerviosas tanto en los cuadrantes superiores como inferiores. Se ha demostrado que las fibras nerviosas en estos cuadrantes tienen menos soporte estructural a su paso por la lámina cribosa, con mayor tamaño de los poros y un tejido conectivo más débil. Las fibras de mayor tamaño parecen ser las más susceptibles al daño glaucomatoso (104).

El patrón de excavación papilar puede ser explicado por la conformación histológica de las trabéculas de colágeno. Los meridianos horizontales de la papila tienen trabéculas más gruesas y canales de haces de fibras más estrechos que los verticales. El daño más precoz en los polos verticales sería el resultado de la acción de la presión en estas regiones menos estables del disco (104).

Estos factores mecánicos actuarían sobre el flujo axonal en las fibras del nervio óptico. Estudios en primates demuestran que el transporte axonal se altera notablemente en la papila al aumentar la PIO, sobre todo en la porción escleral (105).

3.2.- FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR GLAUCOMA.

Existen numerosos estudios que han intentado determinar qué factores de riesgo, y en qué medida, pueden determinar un aumento en la probabilidad de aparición de daño glaucomatoso.

Los principales factores de riesgo estudiados son:

3.2.1.- FACTORES OCULARES.

-PIO: Es el factor más estudiado y conocido, y su reducción constituye la base de la mayoría de los tratamientos actuales. El riesgo de daño del nervio óptico está directamente relacionado con el nivel de PIO. Aunque no existe un nivel "seguro" de PIO y la pérdida de campo visual puede aparecer con cualquier nivel de PIO, este riesgo es muy elevado con cifras de PIO de 30 mmHg o mayores (106). La actuación sobre la PIO conseguiría modificar el equilibrio perdido en ambas teorías ya sea mejorando el flujo sanguíneo o disminuyendo la presión ejercida sobre el flujo axonal (81).

-Defectos refractivos: La mayoría de los estudios encuentran una asociación débil o nula. Sin embargo, en el Baltimore Eye Survey se encontró una asociación significativa entre miopía e hipermetropía altas y la prevalencia de defectos glaucomatosos (107).

-Otras condiciones oculares: El síndrome pseudoexfoliativo y el de dispersión pigmentaria son condiciones con un alto riesgo de pérdida de campo visual (108).

3.2.2.- FACTORES GENERALES.

-Edad: La prevalencia del glaucoma aumenta con la edad y éste es el mejor factor predictivo considerado de manera independiente (87, 109).

-Sexo: La mayoría de los autores coinciden al encontrar cifras de PIO significativamente mayores en mujeres. Sin embargo, tanto el Framingham Eye Study como el Barbados Eye Study encuentran una mayor prevalencia en varones (110, 111).

-Raza: La prevalencia e incidencia de ceguera por glaucoma es 8 veces superior en la raza no blanca que en la raza blanca, con una edad media de inicio inferior y una progresión más rápida (107, 111).

-Herencia: Se han descrito varios modelos de herencia poligénica o autosómica recesiva con diversa penetrancia y herencia autosómica dominante asociada a anomalías del ángulo camerular (112, 113). Parece demostrado que el glaucoma es más frecuente en

determinadas familias y grupos raciales de una forma variable. Se considera que la herencia en el glaucoma seguiría un modelo multifactorial, con diferente grado de penetrancia y expresividad, debido a la interacción entre factores genéticos y ambientales (114, 115).

-Factores cardiovasculares: Se han relacionado las cifras de tensión arterial sistólica con la incidencia de glaucoma. En los glaucomas de baja tensión aparece como factor la baja tensión arterial que favorecería la isquemia en el nervio óptico (95, 96).

-Diabetes mellitus: Hay numerosos estudios que sugieren una asociación entre la diabetes mellitus y el glaucoma, encontrando que los pacientes con hipertensión ocular tienen alta incidencia de diabetes mellitus y test de tolerancia a la glucosa anormal. Los diabéticos tienen mayor riesgo de padecer glaucoma (116).

-Otros factores como el tabaquismo, el consumo de alcohol o la hiperlipemia, han sido estudiados sin llegar a resultados concluyentes (117).

Podemos considerar, según los estudios epidemiológicos actuales, que la edad y los valores de PIO son los factores de riesgo más importantes de glaucoma. La combinación de estos factores, junto con otros factores conocidos y no conocidos, nos conducen a la enfermedad glaucomatosa (118).

4.- TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA.

La reducción de la PIO mediante tratamiento médico o quirúrgico es la base del tratamiento actual del glaucoma (78, 82). La finalidad última de este tratamiento es la prevención de la lesión del nervio óptico y la consiguiente pérdida de visión. Se ha demostrado la correlación entre las cifras de PIO y la progresión de los defectos glaucomatosos del campo visual y una menor progresión de éstos con una PIO baja (119, 120). La actuación frente a otros factores como el flujo sanguíneo del nervio óptico, es motivo de numerosos estudios en la actualidad.

Clásicamente, considerando la relación beneficio/riesgo de las diferentes pautas terapéuticas del glaucoma, se ha aconsejado el inicio del tratamiento mediante drogas hipotensoras, quedando en un segundo escalón terapéutico la aplicación de láser y dejando como último escalón terapéutico el tratamiento quirúrgico, fundamentalmente la técnica de trabeculectomía (20).

En los últimos años, la pauta terapéutica del glaucoma descrita anteriormente ha sido cuestionada (14). Ya en el año 1981, Watson y Grierson publicaron un estudio retrospectivo sobre el control médico del glaucoma observando que, aunque inicialmente

en el 74% de los enfermos con tratamiento médico antiglaucomatoso se conseguía un control óptimo de la PIO, solamente en un 40% de los casos se mantenía este control tras 5 años de tratamiento (13). Por el contrario, cuando se analizan los resultados obtenidos con la técnica quirúrgica de la trabeculectomía, éstos parecen más favorables. En el estudio del Hospital de Adderbrooke en Cambridge, con un seguimiento mínimo de 2 años, el 84% de los 397 ojos operados de trabeculectomía permanecían controlados sin precisar ninguna medicación adicional y el porcentaje de controles correctos llegaba al 94% cuando se añadía terapéutica médica (18). En un trabajo del Servicio de Oftalmología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, de un total de 150 ojos con un seguimiento máximo de 4 años, se comprobó que sin tratamiento médico adicional el 73,3% de los ojos tenía una PIO inferior a 22 mmHg, porcentaje que se incrementaba al 88,8% cuando se incluían los que mantenían dicho control tensional con algún fármaco hipotensor (19).

La otra alternativa terapéutica al tratamiento médico es la trabeculoplastia con láser de argón, que presenta un elevado porcentaje de control del glaucoma tras el primer año de tratamiento, pero su eficacia disminuye progresivamente con el tiempo. En un estudio realizado sobre 196 ojos con glaucoma tratados con láser, con un seguimiento de hasta un máximo de 9 años, se pudo comprobar que en los ojos tratados con 100 disparos de láser distribuidos en 360° del trabéculum, el índice de control adecuado del glaucoma era del 75% en el primer año, pero que, incluso al octavo año de seguimiento, alrededor del 50% de los ojos tratados con láser se consideraban éxitos terapéuticos (12).

Algunos autores han planteado pautas terapéuticas distintas como tratamiento inicial del glaucoma. El estudio aleatorizado realizado en el Moorfields Hospital de Londres, comparó la eficacia de la terapéutica médica convencional, la trabeculoplastia láser y la trabeculectomía como terapéutica inicial del glaucoma, con un seguimiento mínimo de cinco años. Aunque los tres grupos de estudio tenían una PIO inicial similar, a los cuatro años la PIO media era menor, 13,3 mmHg, en el grupo quirúrgico, frente a 16,8 mmHg en el grupo con tratamiento médico y 17,8 mmHg en el grupo con trabeculoplastia láser. El éxito sobre el control de la PIO inferior a 22 mmHg era del 98% en el grupo quirúrgico, frente al 80% en el grupo de tratamiento médico y de solamente el 60% en el grupo sometido a trabeculoplastia láser. La conclusión del estudio fue que si lo que se busca en el tratamiento del glaucoma es el mantenimiento de la PIO en unos niveles bajos y óptimos para preservar mejor el normal funcionamiento del nervio óptico, estos resultados se obtienen con mayor eficacia mediante la terapéutica quirúrgica, trabeculectomía, como opción a elegir en el tratamiento inicial del glaucoma (20).

Recientemente, algunos autores han propuesto el efecto beneficioso de la trabeculectomía en la progresión del daño del campo visual en pacientes con glaucoma normotensivo (121).

Aunque la cirugía actual del glaucoma presenta un número reducido de complicaciones, éstas siguen siendo más numerosas y graves que las observadas con el tratamiento médico y con el láser (16, 22).

Mayor importancia tiene la existencia de ciertas formas de glaucoma que no responden adecuadamente al tratamiento médico o con láser y en las que la eficacia de la terapéutica quirúrgica es menor. En estas situaciones se incluyen los ojos que ya han sido intervenidos previamente de glaucoma sin éxito, el glaucoma afáquico, el glaucoma post-tinflamatorio o el post-traumático, donde la técnica de la trabeculectomía ha demostrado un notable descenso en su eficacia (23, 122, 123). Entre los abordajes quirúrgicos de estos problemas se incluyen técnicas filtrantes modificadas mediante modulación de la cicatrización de la herida con fármacos u otros métodos, la implantación de sistemas de drenaje y distintas formas de cirugía ciclodestructiva (124-129).

Actualmente se estudian drogas con potencial antiproliferativo que podrían junto con las ya existentes, incrementar el porcentaje de éxitos de la trabeculectomía. Su uso correcto puede desequilibrar la balanza beneficio/riesgo del tratamiento del glaucoma a favor del tratamiento quirúrgico (130).

5.- TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL GLAUCOMA. LA TRABECULECTOMÍA.

5.1.- BASES Y MODALIDADES DE LOS PROCEDIMIENTOS FILTRANTES.

El mecanismo básico de todos los procedimientos filtrantes es la creación de una fístula entre la cámara anterior y el espacio subconjuntival que permita el paso del humor acuoso en cantidad suficiente para conseguir una reducción adecuada de la PIO (16, 17). El éxito de la técnica se acompaña de una elevación de la conjuntiva, conocida como ampolla de filtración. El humor acuoso contenido en la ampolla suele filtrar a través de la conjuntiva y se mezcla con la película lagrimal o es reabsorbido por el tejido conectivo vascular o perivascular (131).

Existen distintas modalidades de cirugía filtrante:

-Cirugías filtrantes no protegidas: Las técnicas originales se basaban en la creación de una apertura directa de espesor completo en el tejido limbar. Así, La Grange en 1906 describió

la esclerectomía, que consistía en realizar una incisión límbica de espesor total y, posteriormente, cortar un trozo de tejido del labio anterior de la herida para crear una fístula limbar (132). Posteriormente la técnica fue modificada, siendo la esclerectomía de labio posterior descrita por Iliff y Haas la que tomó más auge (133). La trepanación fue descrita por Elliot, creando una fístula con un trépano de 1,5 a 2 mm inmediatamente por detrás de la unión córneo-limbar (134).

-Cirugías filtrantes protegidas: La creación de un colgajo escleral de espesor parcial sobre la fístula intenta minimizar las complicaciones de la cirugía filtrante no protegida. Sugar introdujo de forma experimental la aposición de un colgajo escleral parcial sobre la fístula (135). Cairns en 1968 describió la técnica de la trabeculectomía según la cual, se disecciona un colgajo escleral de 5x5 mm de la mitad del espesor escleral. La penetración en la cámara anterior se realiza por delante de la línea de Schwalbe. Posteriormente se extirpa una porción de tejido escleral de 1x4 mm de espesor total, tras lo que se realiza una iridectomía. Se finaliza la intervención con el cierre de los colgajos escleral y conjuntival (17).

5.2.- LA TRABECULECTOMÍA EN GLAUCOMAS DE ALTO RIESGO.

Existen una serie de factores incontrolables que pueden condicionar el resultado funcional de la cirugía filtrante del glaucoma.

La cirugía ocular previa a la trabeculectomía se acompaña de un mayor índice de fracasos por cierre de la fístula, ya sea debido al proceso de cicatrización previo o a factores bioquímicos presentes en el humor acuoso (136, 137).

La afaquia va asociada a un menor índice de éxito de la trabeculectomía, siendo éste de un 39%. El fracaso en esta situación podría deberse a un factor bioquímico liberado por el vítreo a través del humor acuoso que induciría la proliferación fibroblástica o a la incarceration del vítreo en la fístula (138, 139).

La trabeculectomía en pacientes jóvenes presenta un alto número de resultados insatisfactorios llegando a ser de un 30 a 40% peores que en pacientes de mayor edad (23, 138).

Los pacientes con rubeosis de iris suelen tener neovasos y sinequias en el ángulo camerular, lo que ocasiona un cierre precoz de la fístula al facilitar dichos elementos la proliferación fibroblástica. El sangrado intraoperatorio, frecuente en estos casos, y la consiguiente ruptura de la barrera hemato-acuosa favorece el aumento de la cicatrización en la zona quirúrgica (138).

Otros factores que ensombrecen el futuro de la trabeculectomía son: la cirugía filtrante previa fracasada, la asociación a queratoplastia, la raza negra, asiática o esquimal, la inflamación ocular activa, la duración prolongada de la terapia tópica, la existencia de contraindicación para la toma de corticoides, la enfermedad glaucomatosa avanzada, la predisposición a formar queloides, la presencia de una cámara anterior estrecha, el aumento del riesgo de sangrado, la toma de fármacos anticoagulantes, la luxación del cristalino, la presencia de una conjuntiva cicatricial o anormal, las anomalías del grosor escleral o la inexperiencia del cirujano.

B.- LA REPARACIÓN TISULAR. EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN.

1.- INTRODUCCIÓN.

Para sobrevivir es esencial que el organismo sea capaz de sustituir las células lesionadas o muertas y de reparar los tejidos donde ha tenido su asiento la inflamación. La curación de las heridas es un mecanismo de defensa propio de los seres vivos, que tiene como finalidad la reparación del órgano dañado, reorganizando su tejido y restaurando su función. La reparación de los tejidos puede realizarse mediante dos procesos distintos:

-La *regeneración* o sustitución de las células lesionadas por otras de la misma clase, a veces sin que queden huellas residuales de la lesión anterior.

-La sustitución por tejido conjuntivo, llamada *fibroplasia* o *fibrosis*, que deja una cicatriz permanente.

En la mayoría de los casos, estos dos procesos contribuyen a la reparación de forma conjunta. La capacidad de regeneración tisular del ser humano es bastante limitada y las células parenquimatosas no regeneradas son reemplazadas por una proliferación del tejido conectivo, con formación de una cicatriz fibrosa (140).

Tanto la regeneración como la fibroplasia son fenómenos extremadamente complejos y dependen de la sucesión de una serie de procesos bien ordenados: inducción de una respuesta inflamatoria aguda desencadenada por la agresión inicial, regeneración de las células parenquimatosas, migración y proliferación tanto de las células parenquimatosas como de los componentes del tejido conectivo, síntesis de proteínas especializadas de la matriz extracelular (MEC), formación de colágeno, remodelación de los componentes de los tejidos conjuntivo y parenquimatoso, y desarrollo de resistencia por la cicatriz (140).

2.- EVENTOS CRONOLÓGICOS EN LA CURACIÓN DE LA HERIDA QUIRÚRGICA. CICATRIZACIÓN POR PRIMERA INTENCIÓN.

La cicatrización presente en las heridas quirúrgicas (heridas no infectadas, con incisiones de bordes limpios y aproximados por suturas quirúrgicas) se denomina cicatrización "por primera intención" (141). Por norma general, en cualquier procedimiento quirúrgico se busca una correcta cicatrización; paradójicamente, en el caso de la cirugía filtrante del glaucoma es primordial el mantenimiento de una fístula o zona de ausencia de

cicatrización. El conocimiento de la evolución de este fenómeno nos ayudará a encontrar la forma de modularlo, impidiendo o retardando el cierre de la comunicación.

Tras la producción de la solución de continuidad se pueden distinguir en los tejidos una serie de cambios a lo largo del tiempo (figura 1).

En los primeros momentos tras el daño tisular, vascular y la extravasación hemática, los márgenes y el estrecho surco de la incisión están llenos de fibrina, fibronectina, hematíes, plaquetas y detritus celulares, teniendo lugar el depósito de fibrinógeno y otras proteínas sanguíneas en la zona lesionada. El fibrinógeno se convierte en fibrina y ésta, en contacto con las plaquetas, los factores de la coagulación plaquetarios y procoagulantes tisulares, da lugar al coágulo sobre la incisión.

A las 24 horas, aparecen neutrófilos que comienzan a localizarse alrededor de los capilares y a ponerse en contacto con fibroblastos quiescentes o marginales en los bordes de la incisión. Debido al daño vascular hay un paso de componentes intravasculares al espacio extravascular generando un edema intersticial. También a partir de las 24 horas se inicia la activación del fibroblasto quiescente y éste se transforma en una célula oval, con núcleo vesiculoso y nucleolo hiper cromático y comienzan a proliferar células endoteliales vasculares, para formar a los 3-5 días, junto al resto de los componentes celulares y de la MEC, el tejido de granulación (142, 143).

Al tercer día, los neutrófilos han sido reemplazados en gran parte por macrófagos. El tejido de granulación invade progresivamente el espacio vacío creado por la incisión. Este consta fundamentalmente de fibroblastos con elevada actividad mitótica y vasos neoformados. Los fibroblastos se hacen alargados, fusiformes y son capaces de segregar colágeno. Los bordes de la herida contienen ya fibras colágenas, pero al principio esas fibras están dispuestas verticalmente y no mantienen unidos los bordes de la herida.

Al quinto día, el espacio de la incisión está repleto de tejido de granulación y la neovascularización es máxima. La fibrillas de colágeno se vuelven más abundantes y comienzan a soldarse los bordes de la incisión. Los macrófagos incrementan su función fagocitando los restos necróticos de células pavimentosas y los neutrófilos muertos.

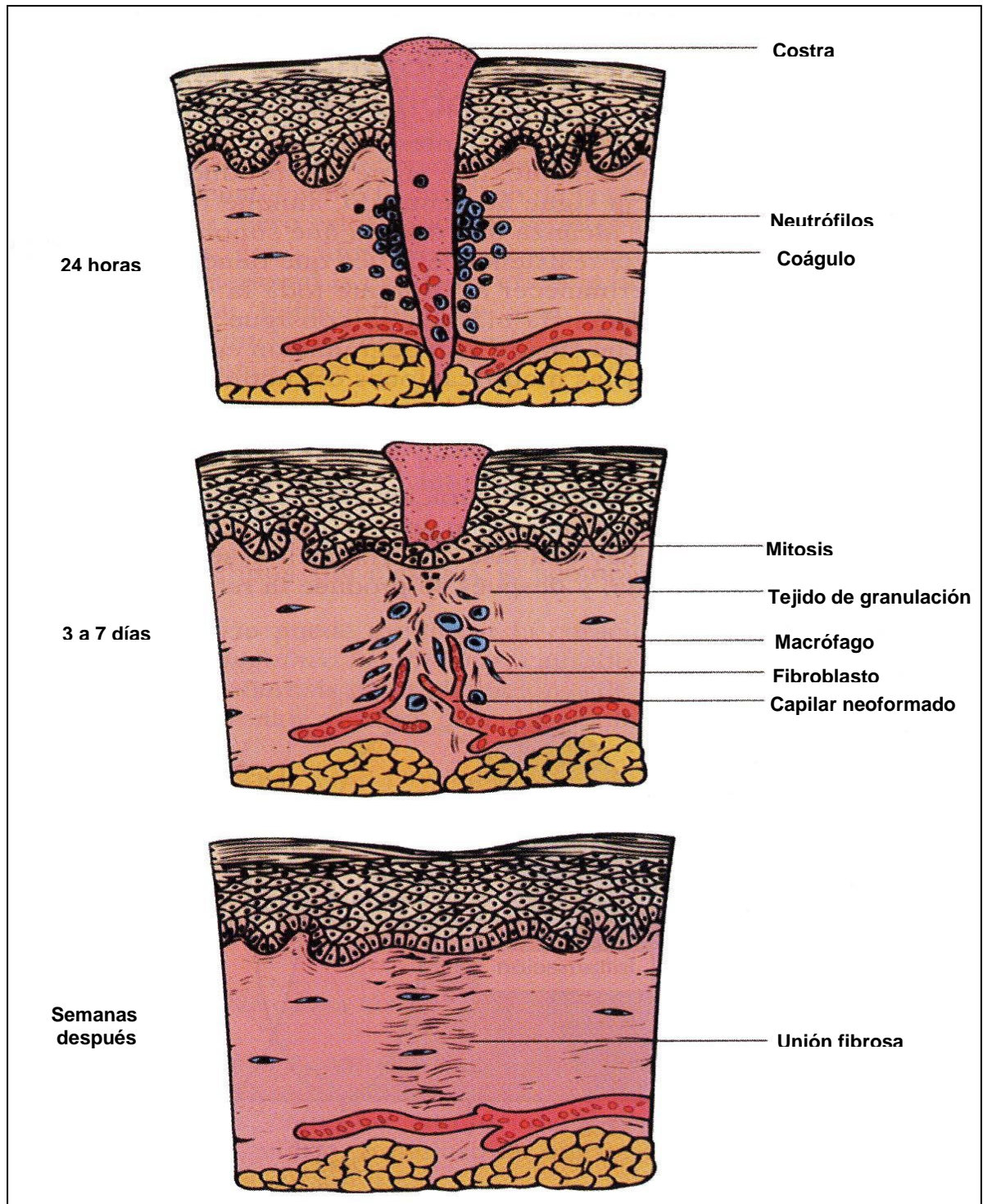


Figura 1 . Evolución de una solución de continuidad tras sutura. Cicatrización por primera intención. Modificada de Cotran R, Kumar V, Collins T (140).

En la segunda semana, se deposita colágeno continuamente y hay proliferación de fibroblastos. El colágeno se condensa, primero en la base y luego hacia la superficie. El infiltrado leucocitario, el edema y la riqueza vascular han desaparecido en gran parte. En este momento comienza a palidecer la herida, un largo proceso que se produce gracias a la creciente acumulación de colágeno en la cicatriz de la incisión, y que se acompaña de la desaparición progresiva de los conductos vasculares. Posteriormente comienza a disminuir el número de fibroblastos y aumenta el de miofibroblastos que iniciarán la contracción de la herida.

Al final del primer mes, la cicatriz está formada por un tejido conjuntivo celular sin infiltrado inflamatorio. A partir de ese momento, aumenta la resistencia elástica de la herida, pero pueden necesitarse meses para que la zona herida consiga su resistencia máxima.

3.- FASES DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN.

La cicatrización es un proceso continuo y dinámico, de forma que los fenómenos que la constituyen se solapan en el tiempo, pero tradicionalmente se han tratado por separado con objeto de explicar con más claridad los distintos sucesos que tienen lugar durante el proceso de reparación (144).

El proceso de cicatrización se puede dividir en tres fases (figura 2):

-La fase inicial inflamatoria: Tras la agresión quirúrgica, se producen unos cambios metabólicos en el área afectada que inducen la aparición de un proceso inflamatorio en el que se inicia la cicatrización. Los principales eventos de esta fase son: el aumento de la permeabilidad vascular, la hemostasia producida por las plaquetas y las proteínas plasmáticas de la coagulación, y la respuesta inmune que originará una reacción inflamatoria.

-La fase proliferativa se caracterizará por la formación del tejido de granulación. Sus rasgos definitorios vienen marcados por dos fenómenos histológicos: la angiogénesis o neoformación de pequeños vasos sanguíneos y la fibroplasia o proliferación de fibroblastos. Estos fenómenos son seguidos de la síntesis y depósito de los componentes de la MEC.

-La fase de remodelación con reestructuración de la MEC y restauración de la función del tejido (144).

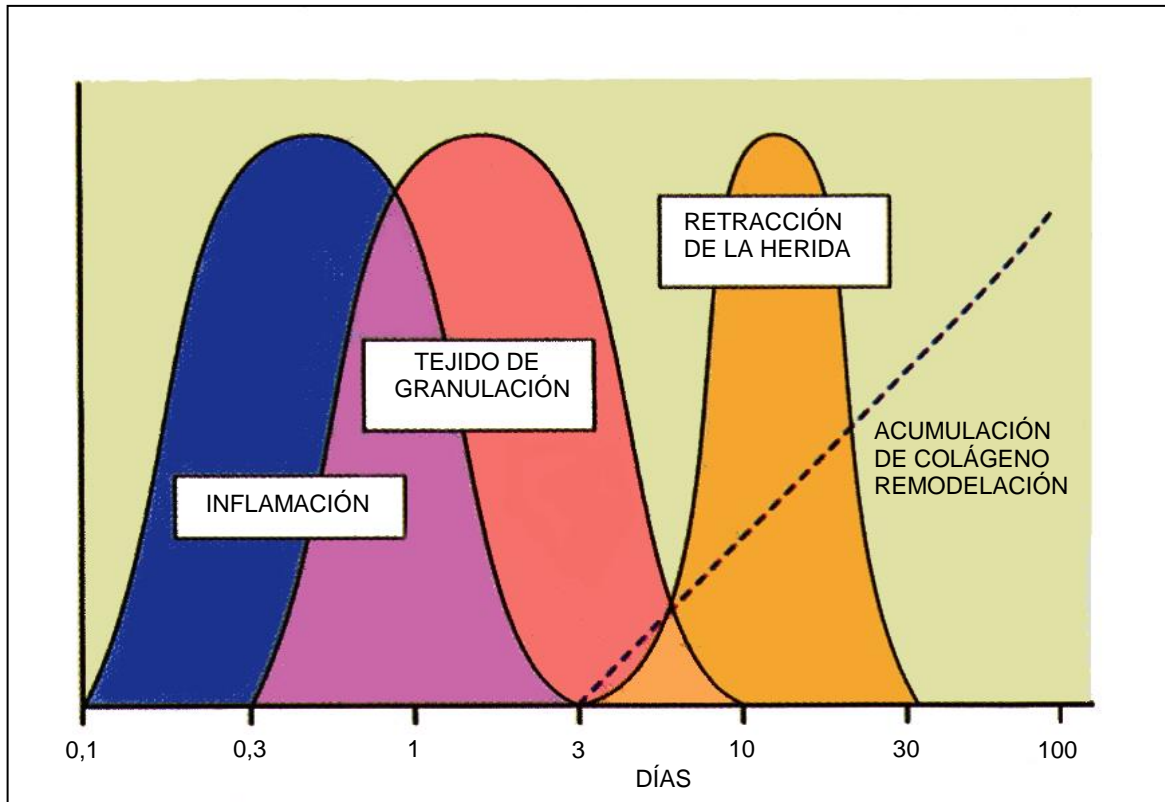


Figura 2. Fases de la cicatrización. Modificada de Cotran R, Kumar V, Collins T (140).

La inflamación interviene en la regulación del resto de fenómenos de la cicatrización. En cada estadio intervienen tanto elementos celulares como extracelulares. Entre los primeros, hay que destacar la acción coordinada de células inmunes, mesenquimales, endoteliales, epiteliales y vasculares. Mientras que en la MEC aparecen factores de crecimiento y citoquinas que coordinan la actividad celular a través de sus efectos sobre la migración, crecimiento y diferenciación celular, regeneración de la MEC y otras actividades metabólicas (145).

3.1.- FASE INFLAMATORIA.

3.1.1.- AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR.

La producción de una herida conlleva la rotura de vasos sanguíneos, y por lo tanto, la extravasación de proteínas y células hemáticas, y la liberación de sus citoquinas y mediadores de la inflamación. Entre las sustancias que se extravasan se encuentran hormonas vasoactivas y quimiotácticas (histamina, serotonina, quininas, prostaglandinas,

leucotrienos, etc) con funciones encaminadas a regular la función vascular, modular la coagulación, favorecer la reacción inflamatoria e iniciar el proceso cicatricial (32, 130).

-La histamina induce la contracción y separación de las células endoteliales, aumentando así la permeabilidad vascular.

-La serotonina contrae la fibra muscular lisa de las arterias y venas y dilata las arteriolas.

-La formación de quininas con funciones vasodilatadoras es debida a la activación del factor XII de la coagulación (factor de Hageman o factor de contacto).

-Los factores C_{3a} y C_{5a} estimulan la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y otros derivados del ácido araquidónico que incrementan la permeabilidad vascular (146). Los leucotrienos promueven la función quimiotáctica de los leucocitos (140). La prostaglandina E_2 es un potente vasodilatador que aumenta la permeabilidad vascular, promueve el flujo de leucocitos y prolonga el período de inflamación. Por el contrario la prostaglandina $F_{2\alpha}$ es vasoconstrictora. El producto más importante del metabolismo de las prostaglandinas es la prostaciclina, que, junto con el tromboxano A_2 , modula la agregación plaquetaria.

3.1.2.- PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN EL PROCESO CICATRICIAL.

Las plaquetas desempeñan un papel decisivo en la detención de la hemorragia, debido a que forman el trombo plaquetario, el cual proporciona la hemostasia primaria o provisional. Las plaquetas también intervienen en otras fases de la hemostasia, como la vasoconstricción y la coagulación plasmática (proporcionando el factor plaquetario 3, que activa la protrombina, y el factor plaquetario 4, que tiene efecto antiheparina).

La intervención de las plaquetas en la hemostasia se debe esencialmente a un proceso de contracción celular dependiente del Ca^{++} , que se inicia desde el momento que se produce el contacto de las plaquetas con las estructuras del subendotelio, lo que implica el paso de Ca^{++} del sistema tubular denso al citoplasma. La producción de una lesión vascular y endotelial provoca la exposición del tejido conectivo subendotelial, que tiene un poder trombogénico muy importante, especialmente el colágeno fibrilar y el factor XII de la coagulación, de forma que las plaquetas se adhieren a este tejido conectivo subendotelial y sufren la denominada activación por contacto, que desencadena su adhesión, su cambio de configuración (pasan de ser discoides a ser esféricas y emiten pseudópodos), su contracción interna, la secreción (reacción de liberación de sus gránulos) y su agregación (140).

Los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, presentes en el colágeno, son de gran importancia en el comienzo de la activación de las plaquetas (147). El incremento del Ca^{++} necesario para la contracción celular se realiza por la liberación de adenosindifosfato (ADP) de los gránulos intracitoplasmáticos, por la síntesis intraplaquetaria de la prostaglandina tromboxano A_2 (TXA_2), y por trombina, que se forma por la reacción en cadena de los factores de la coagulación absorbidos en la atmósfera plasmática intraplaquetaria. El TXA_2 producido por parte de las plaquetas activadas, junto con el ADP liberado, pone en marcha una reacción autocatalítica que provoca una agregación plaquetaria intensificada conocida como tapón hemostático primario o temporal. Esta agregación primaria es reversible, pero tras la activación de la secuencia de la coagulación se genera trombina, que es un potente agonista plaquetario. La combinación de trombina, ADP y TXA_2 , induce la contracción plaquetaria dependiente del Ca^{++} (mediada por los filamentos intraplaquetarios de actomiosina) para dar lugar a una masa fusionada de plaquetas que constituye un tapón hemostático secundario o definitivo (140). Las plaquetas, estimuladas por el colágeno, y posteriormente también por la trombina generada en el proceso de coagulación cambian de forma y liberan, finalmente, el contenido de sus gránulos.

El proceso de contracción plaquetaria promueve la secreción de otros componentes intraplaquetarios, además del ADP, almacenados en los dos tipos principales de gránulos plaquetarios, los gránulos α y los cuerpos densos. Los gránulos α contienen enzimas hidrolíticas, fibrinógeno, fibronectina, factor V, factor von Willebrand y tres proteínas específicas: betatromboglobulina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y un factor antiheparínico (factor 4 plaquetario). Las plaquetas también liberan factor transformador del crecimiento α ($\text{TGF}\alpha$) y β ($\text{TGF}\beta$) que poseen actividad quimiotáctica y mitogénica para las células inflamatorias. De los gránulos densos se libera adenosín trifosfato (ATP), ADP, Ca^{++} , serotonina, histamina y adrenalina (148).

La adhesión se refiere a la adherencia de las plaquetas a los puntos de lesión endotelial. Para ello, es necesario el factor de von Willebrand, que actúa como un puente molecular entre las plaquetas y el endotelio a través de receptores glucoproteicos, especialmente la glucoproteína I (GPI) de la membrana plaquetaria. Una vez que las plaquetas se activan por el contacto con el subendotelio, el complejo glucoproteico GPIIb-IIIa contribuye a su deposición, con lo que se extienden al máximo sobre la pared vascular lesionada. El factor de von Willebrand y otra proteína adhesiva, la fibronectina, intervienen también en la interacción del complejo GPIIb-IIIa con el subendotelio. Además, otro complejo glucoprotéico (GPIa-IIa) de la membrana plaquetaria contacta directamente con

el colágeno del subendotelio, favoreciendo aún más la interacción de las plaquetas y la pared vascular.

La agregación plaquetaria (que implica la interadherencia plaqueta-plaqueta) se produce inmediatamente tras la adhesión y secreción. La formación de agregados plaquetarios requiere la integridad de las glucoproteínas del grupo GPIIb-IIIa, que se enlazan con el fibrinógeno en presencia de Ca^{++} extracelular, lo que origina los puentes interplaquetarios. Secundariamente también intervienen el factor von Willebrand y la fibronectina, que se enlazan con la GPIIb-IIIa del plasma.

El TXA_2 determina el aumento del Ca^{++} intracitoplasmático que procede del sistema tubular denso, contribuyendo así a la contracción plaquetaria. El grado de contracción de las plaquetas depende de la disponibilidad de Ca^{++} en el citoplasma modulada por el adenosín-5'-monofosfato cíclico (AMPc), que favorece la incorporación de Ca^{++} desde el citoplasma al sistema tubular denso de la membrana y al exterior de las células. La cantidad de AMPc en la célula está determinada por la adenilciclase, que cataliza la transformación de ATP en AMPc, y por una fosfodiesterasa específica que hidroliza el AMPc a adenosín-monofosfato (AMP).

De forma concomitante, las células endoteliales producen prostaciclina, la cual inhibe la agregación plaquetaria, limitando de esta forma el alcance de la agregación al lugar de la lesión (147). Las plaquetas son además de extraordinaria importancia, ya que secretan diversos factores de crecimiento necesarios para la cicatrización.

3.1.3.- LA COAGULACIÓN.

La salida de plasma y otros elementos sanguíneos desde los vasos dañados provoca la formación del coágulo a través de las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación. Ambas vías desembocan en la transformación de la protrombina (factor II de la coagulación) en trombina (factor II activado), la enzima que convierte el fibrinógeno (que es soluble) en fibrina (insoluble) y de este modo se produce la coagulación sanguínea, que intensifica y asegura la hemostasia temporal desarrollada por las plaquetas.

La vía intrínseca es activada por la exposición de la sangre a los tejidos subendoteliales en el lugar de la lesión vascular. Consiste en cuatro reacciones que se inician con la activación del factor XII (factor de contacto) y conducen a la activación del factor X, la enzima necesaria para la transformación de protrombina en trombina; esta reacción requiere factor X activado (Xa), además de fosfolípidos, factor V y Ca^{++} .

La vía extrínseca comienza con el factor VII (proconvertina o factor estable), una glucoproteína circulante, que es activada tras su interacción con un factor tisular (TF o tromboplastina tisular o factor III de la coagulación), proteína liberada por las células endoteliales y otros tejidos tras la lesión en presencia de Ca^{++} . La activación de la protrombina por el factor VII también requiere Ca^{++} . Además de su importante papel en la coagulación, la trombina también activa las plaquetas. Los componentes de la cascada de la coagulación, en particular el factor XII (factor de Hageman) estimulan el sistema inmune y la generación de péptidos vasoactivos como la bradiquinina.

El fibrinógeno se une a los receptores de superficie de las plaquetas y se polimeriza formando una matriz de fibrina, y de este modo se crea el trombo (147). La estabilización de la fibrina se realiza por el factor XIII, activado por la trombina en presencia de Ca^{++} . La importancia del fibrinógeno y la fibrina en el fracaso de la cirugía filtrante justificaría, para algunos autores, el empleo de fibrinolíticos, que de este modo dificultarían la formación del trombo (149-151).

El Ca^{++} interviene en una gran parte de estos procesos y es considerado como el factor IV de la coagulación. También actúa como acelerador de la actividad de diversos inhibidores naturales de la coagulación como las proteínas C y S, dos inhibidores de los factores VIIIa y Va.

El coágulo de fibrina formado por la vía intrínseca y/o extrínseca no sólo sirve para la hemostasia, si no que junto con la fibronectina, forma una matriz provisional que permite la migración de monocitos, fibroblastos y queratinocitos hacia la lesión. Esta matriz, producida como resultado de los productos derivados de la cascada de la coagulación, depende del daño vascular y es, por lo tanto, un suceso precoz en el proceso de cicatrización, normalizándose una vez que el endotelio es restablecido.

3.1.4.- PAPEL DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO EN LA FASE INFLAMATORIA DE LA CICATRIZACIÓN.

El sistema inmune juega un papel fundamental en los estadios iniciales de la cicatrización (152). De hecho, esta primera fase del proceso reparativo se denomina fase inflamatoria debido al gran aflujo de células blancas en el área lesionada. La conjuntiva sana está normalmente poblada por células del sistema inmune: linfocitos T, macrófagos, células de Langerhans y, ocasionalmente, linfocitos B han sido identificados en el epitelio y sustancia propia de biopsias conjuntivales. La relación de linfocitos T CD4^{+} (*helper* o efector) / CD8^{+} (citotóxicos) es aproximadamente de 1:2 en condiciones normales (153,

154). Durante la reparación tisular se produce un rápido y significativo incremento en el número de células inflamatorias (155). De las 12 a las 24 horas tras producirse la herida, se incrementa el número de leucocitos polimorfonucleares con capacidad fagocítica.

Los neutrófilos son las primeras células inflamatorias en llegar a la herida, aunque su presencia no es indispensable para que el resto de los fenómenos cicatriciales discurran normalmente (figura 3) (156). Se acumulan en la herida durante las primeras 6 horas, alcanzan su número máximo a los 2 días y van disminuyendo progresivamente los días siguientes. Tanto los neutrófilos como los macrófagos son estimulados para migrar hacia la lesión por factores producidos por productos de la cascada de la coagulación, por factores quimiotácticos segregados por las plaquetas y por componentes del sistema del complemento (140). Los neutrófilos son atraídos a la herida por el factor C5a, el factor plaquetario 4 (PF4), los leucotrienos, el TGF β , el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleuquina-1 (IL-1) y por los materiales bacterianos (152).

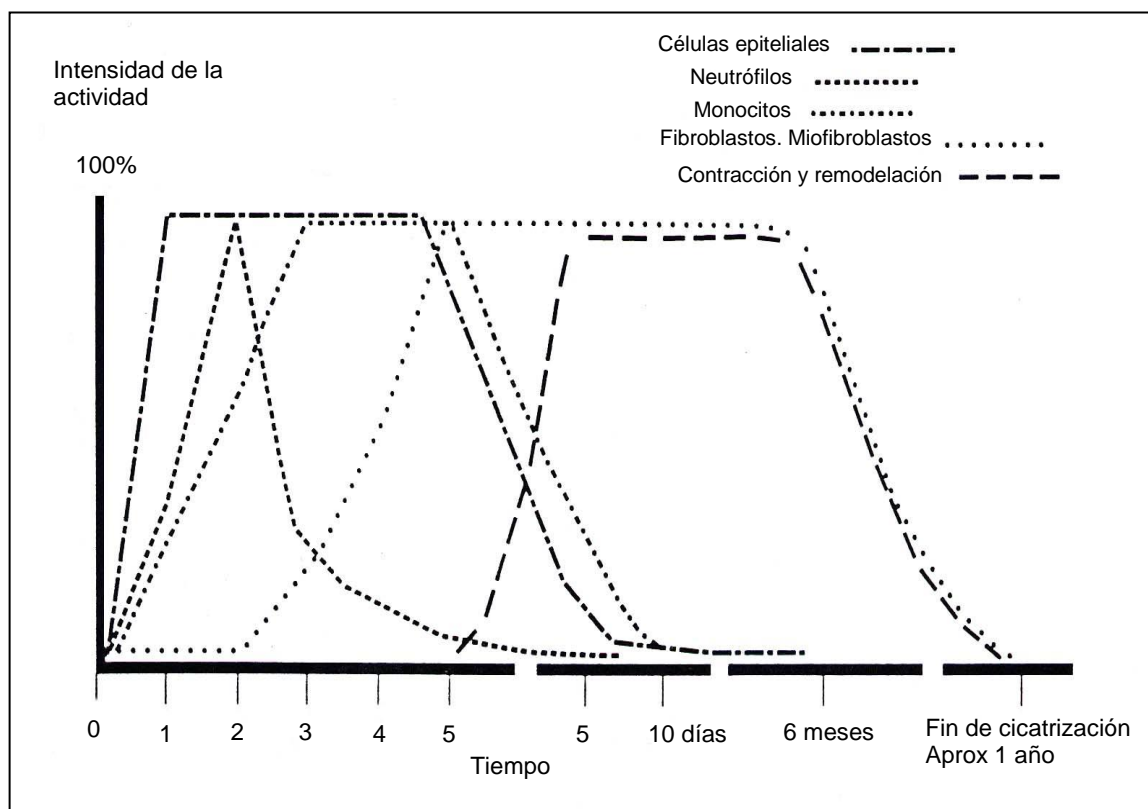


Figura 3. Cronología de la actividad celular durante la cicatrización. Modificada de Tahery M, Lee D (130).

La migración de los neutrófilos desde los vasos sanguíneos hasta el lugar de la lesión es un proceso complejo. La expresión de determinadas moléculas de adhesión favorecida por la calicreína, fibrinopéptidos liberados del fibrinógeno y productos de la degradación de la fibrina, permite y facilita la diapédesis de los neutrófilos (157). Los neutrófilos liberan elastasa y colagenasa, lo que podría facilitar su paso a través de la membrana basal de los vasos sanguíneos. Sus movimientos en el interior de la MEC son facilitados por receptores del endotelio vascular, llamados selectinas. Una vez que alcanzan el lecho de la herida, las integrinas presentes en la superficie de los neutrófilos aumentan las interacciones con la matriz (158).

La principal misión de estas células es la de prevenir la infección, fagocitando las bacterias, proteínas y materiales extraños en el lecho de la herida. La presencia de sustancias contaminantes en la herida prolonga su presencia en la lesión que, en condiciones normales, dura sólo unos pocos días. Además, los neutrófilos producen citoquinas como la IL-1 α , la IL-1 β y el TNF α .

Las siguientes células inflamatorias que aparecen en la herida son los monocitos, convirtiéndose en las células predominantes del proceso inflamatorio unas 12 horas después de la agresión (figura 3) (159). Alcanzan su número máximo a los 3 días y empiezan a disminuir a los 5 días. Los monocitos son inicialmente atraídos hacia la lesión por algunos de los factores quimiotácticos de los neutrófilos, pero su reclutamiento y posterior conversión en macrófagos es debida a la acción de factores quimiotácticos específicos para ellos. Los leucotrienos, la trombina, el factor plaquetario 4 y el TGF β son quimiotácticos para los monocitos, mientras que su activación y transformación en macrófagos depende de los productos liberados por las plaquetas, los productos de degradación celular, la fibronectina y el colágeno (160). Diversos estudios experimentales han demostrado que los macrófagos, a diferencia de los neutrófilos, son indispensables para un normal proceso reparativo tisular (161, 162).

Una vez dentro del tejido diana, los macrófagos sintetizan y secretan factores de crecimiento: PDGF, factor de crecimiento fibroblástico b (FGFb), TGF β y IGF α . Estas citoquinas son de gran importancia porque inducen la migración y proliferación fibroblástica y de otras células inflamatorias, así como la síntesis de la MEC. Los macrófagos producen colagenasa y elastasa, y participan en la limpieza de la herida, junto con otros leucocitos, fagocitando el colágeno alterado del tejido lesionado, eliminando organismos patógenos, detritus tisulares, y destruyendo los neutrófilos que quedan (147).

Los linfocitos juegan un papel fundamental en la cicatrización, ya que regulan y modulan el resto de los procesos de reparación tisular (161). Los linfocitos migran a las

heridas cutáneas mucho antes que los macrófagos, apareciendo en el primer día. Alcanzan su número máximo entre los 8 y 14 días, y persisten durante los 4 meses siguientes (figura 3) (163). Los linfocitos T CD4+ y CD8+ han sido cuantificados en un modelo experimental de lesión cutánea en la rata, presentando una proporción CD4+/CD8+ de 2:1 (164). Ambas subpoblaciones de linfocitos T también han sido identificadas en la conjuntiva de pacientes que presentaron fracaso en la cirugía filtrante del glaucoma en los tres meses posteriores a la cirugía. Sin embargo, se desconoce el papel que pueden desempeñar ambas subpoblaciones de linfocitos T en el desarrollo de una cicatrización normal o patológica (165).

Los linfocitos T son capaces de producir factores estimuladores e inhibidores de la actividad fibroblástica (166) e, *in vitro*, son capaces de producir factores que estimulan o inhiben la producción de colágeno en dependencia de las condiciones de cultivo (167, 168). Los linfocitos T activados pueden inhibir la proliferación fibroblástica a través de la acción mediadora del interferón gamma (IF γ), y modular la migración fibroblástica estimulando la expresión de determinadas enzimas de la MEC, como la metaloproteinasa 1 (169).

El papel regulador de los linfocitos T en los procesos cicatriciales ha sido demostrado en diferentes estudios en los que dichas células han sido deplecionadas de forma selectiva. La ausencia total de linfocitos T produce una peor cicatrización, con una reducción en la resistencia de la herida y del depósito de colágeno. La depleción selectiva de la subpoblación de linfocitos T CD8+ produce un aumento de la reacción cicatricial, y la depleción conjunta de linfocitos T CD4+ y CD8+ también desencadena un aumento de la reacción cicatricial. Cuando la subpoblación CD4+ es selectivamente deplecionada la respuesta cicatricial no se modifica (170, 171).

3.2.- FASE PROLIFERATIVA.

3.2.1.- EL TEJIDO DE GRANULACIÓN.

La cicatrización se inicia muy precozmente en el curso de la inflamación, cuando los macrófagos comienzan a digerir los detritus celulares, los neutrófilos muertos y los microorganismos que han sobrevivido al ataque de los neutrófilos (24). A veces, tan pronto como 24 horas después de la lesión, comienzan a proliferar los fibroblastos y las células vasculares endoteliales para originar, entre el tercer y quinto día, un tejido especializado

denominado *tejido de granulación*, que es el rasgo fundamental de curación en la inflamación (142, 143).

El término “granulación” se debe al aspecto rosado, blando y granular que adquieren las superficies de las heridas, aunque sus rasgos definitorios vienen marcados por dos fenómenos histológicos: la angiogénesis o neoformación de pequeños vasos sanguíneos y la fibroplasia o proliferación de fibroblastos (140).

En el tejido de granulación en desarrollo, los fibroblastos proliferan, adquieren una mayor cantidad de retículo endoplásmico rugoso y en los cortes histológicos aparecen hinchados y grandes. También existen macrófagos ocupados de limpiar la zona de los detritus extracelulares, fibrina y otros cuerpos extraños. Si persiste el estímulo quimiotáctico apropiado, también se ven otras células inmunes como neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y células cebadas.

Al progresar la curación se produce un incremento de los componentes extracelulares, principalmente colágeno, disminuyendo el número de fibroblastos activos y vasos neoformados. Muchos de los vasos de los primeros estadios sufren trombosis y degeneración y sus componentes celulares son reabsorbidos y digeridos por los macrófagos. El final del tejido de granulación es una cicatriz formada por fibroblastos fusiformes de aspecto inactivo, colágeno denso, fragmentos de tejido elástico, MEC y escasos vasos sanguíneos (140).

3.2.2.- LA ANGIOGÉNESIS.

La angiogénesis o neovascularización consiste en el crecimiento de nuevos vasos que se forman por gemación a partir de los vasos preexistentes adyacentes a la herida (172). Este fenómeno facilita el aporte de oxígeno y nutrientes a la base de la herida y es, por lo tanto, crucial en el proceso de cicatrización.

La angiogénesis se inicia debido a la agresión tisular y a la acción de factores enzimáticos que rompen la membrana basal venular y permiten que las células endoteliales comiencen a multiplicarse. Para que la angiogénesis progrese adecuadamente es indispensable la existencia de un tejido de granulación con una matriz predominantemente fibroblástica, acompañada de fibras colágenas dispuestas verticalmente y de células epiteliales (29, 143, 173).

Para el desarrollo de un nuevo capilar son necesarios al menos cinco pasos (140):

-Degradación enzimática de la membrana basal del vaso progenitor, para permitir la formación de una nueva yema capilar y la consecutiva migración celular.

-Migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico.

-Proliferación de las células endoteliales, inmediatamente por detrás del frente de células en migración.

-Maduración de las células endoteliales y remodelación en forma de tubos capilares.

-Reclutamiento de células periendoteliales (pericitos de los pequeños capilares y células musculares lisas vasculares de los vasos más gruesos), que han de servir de sostén a los tubos endoteliales, proporcionando resistencia y otras funciones accesorias necesarias al nuevo vaso.

Todos estos pasos son regulados por las interacciones entre los factores de crecimiento, las células vasculares y la MEC. Aunque existen muchos factores de crecimiento que poseen poder angiogénico, la mayoría de las pruebas indican que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y las angiopoyetinas (Ang1 y Ang2) son las que desempeñan un papel especial en la angiogénesis. El FGFb es también un potente factor angiogénico. La expresión del VEGF es estimulada por algunas citoquinas y factores de crecimiento ($TGF\beta$, PDGF, $TGF\alpha$) y, especialmente, por la hipoxia tisular. Otros factores como el PDGF y el $TGF\beta$, y sus correspondientes receptores (PDGF-R y el $TGF\beta$ R) también tienen importancia en la correcta maduración y remodelación vascular.

La motilidad y migración de las células endoteliales son controladas por las células adyacentes y por diversas clases de proteínas de la MEC incluyendo integrinas, especialmente la $\beta\alpha_v\beta_3$ (la más importante), tromboespondina 1, la SPARC y la tenascina C, diversas proteasas, como los activadores del plasminógeno, las metaloproteinasas de la MEC, etc (140, 174). Por otra parte, se ha postulado que la proliferación de las células endoteliales podría ser un efecto secundario a la migración celular. Así pues, la fibronectina, heparina y factores derivados de las plaquetas que estimulan la migración celular hacia el foco de lesión pueden además, de forma directa o indirecta, estimular la proliferación de las células endoteliales. Los macrófagos y fibroblastos liberan diversos factores que estimulan la angiogénesis. Además, otros factores como el ácido láctico y las aminas biógenas pueden estimular la neovascularización (147).

Estos nuevos vasos tienen uniones interendoteliales laxas que permiten el escape de proteínas y hematíes al espacio extravascular, así pues, el nuevo tejido de granulación es frecuentemente edematoso (31, 130, 140).

3.2.3.- PAPEL DEL FIBROBLASTO EN LA CICATRIZACIÓN. LA FIBROPLASIA.

La célula reparadora del tejido conectivo y componente fundamental de la cicatriz es el fibroblasto. Los fibroblastos intervienen en la cicatrización mediante tres acciones fundamentales: su proliferación, su movilidad y la quimiotaxis que favorece su llegada (175).

In vivo, dentro de la MEC, se trata de una célula de baja actividad metabólica y mitótica, virtualmente inactiva, denominada *fibroblasto quiescente* o *fibroblasto marginal* o *fibrocito*. El fibroblasto quiescente se localiza predominantemente junto a los vasos sanguíneos, en contacto con haces de colágena, y es una célula elongada o estrellada cuyo citoplasma contiene numerosas organelas y, especialmente, un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado (28, 176). Tras la agresión quirúrgica, el fibroblasto inactivo sufre una serie de transformaciones ultraestructurales nucleares y citoplásmicas evidenciables mediante microscopía electrónica, que lo convierten en la pieza clave del proceso de reparación tisular (130, 177). El estudio microscópico de la evolución natural del fibroblasto durante la cicatrización sin influencia de agentes externos sería el siguiente (30, 178).

Inmediatamente tras la agresión quirúrgica, el fibroblasto quiescente pierde progresivamente su ergastoplasma modificando su cromatina y transformándose. Al tercer día, el fibroblasto activado es ovoideo, con un núcleo oval vesicular, con escasa cromatina y contiene un voluminoso e hipercromático nucleolo central (de apariencia en "ojo de pájaro"). Su citoplasma es escaso, contiene pocas organelas, pero con abundantes ribosomas y polirribosomas. Al cuarto día, adquiere un abundante retículo endoplásmico rugoso, y una apariencia de gran actividad. Los miofibroblastos aparecen en la base de la solución de continuidad de la herida junto a una gran población de células inflamatorias, predominantemente polimorfonucleares y neovasos. La MEC es claramente edematosa y contiene abundante fibrina y aisladas fibras de colágena. En el sexto día, la población fibroblástica es abundante y de morfología variable ya que algunos presentan grupos de microfilamentos, sin cuerpos densos y, en otros casos, los fibroblastos no presentan microfilamentos citoplasmáticos, siendo similares a los observados en el cuarto día (178). En el octavo día un 25% de los fibroblastos existentes presentan grupos de microfilamentos con algunos cuerpos densos. Hacia el décimo día, algunas células fibroblásticas siguen mostrando características de miofibroblastos mientras que otras son similares a células macrofágicas. Estos últimos, son fibroblastos activos que contienen fibrillas de colágena inmersas en vacuolas lisosomiales. Entre los días 12 y 15, el 70% presentan características de miofibroblastos, con núcleos indentados y con grandes

grupos de microfilamentos localizados predominantemente en la periferia del citoplasma. La MEC contiene abundantes fibras de colágena. En el tejido de granulación persisten todavía aisladas células inflamatorias. En el día 20, la actividad metabólica fundamental se ha orientado a la producción de colágeno por ello, en el estudio microscópico, destaca la presencia de abundantes microfilamentos intracitoplásmicos y grandes grupos de fibras de colágena dispuestas paralelamente en la MEC (178, 179). En el día 25, la mayoría de los fibroblastos ya no tienen microfilamentos, la matriz colágena extracelular se ha convertido en la predominante. En el día 30, la actividad fibroblástica se ha reducido, ya no hay fibroblastos con filamentos. Su aspecto recuerda a los fibroblastos del tejido celular subcutáneo normal. Esta evolución natural puede ser modificada mediante fármacos (corticoides, antimitóticos) o agentes físicos (180).

La proliferación celular puede ser estimulada por fenómenos tales como las lesiones y la muerte celular, así como por la deformación mecánica de los tejidos. Tanto la migración, como la proliferación de los fibroblastos en la herida son requisitos indispensables para la formación del tejido de granulación, y por lo tanto una correcta cicatrización. Además, el fibroblasto es la célula responsable de la síntesis de la mayoría de los componentes de la MEC.

La mayoría de los fibroblastos implicados en el proceso de fibroplasia proceden de los fibrocitos tisulares localizados en la periferia de los vasos sanguíneos. Sin embargo, recientemente ha sido descrita una población celular de estirpe sanguínea, con características similares a los fibroblastos (*fibroblast-like*), denominada fibrocitos de sangre periférica o fibrocitos circulantes, que puede jugar un papel menor en las fases iniciales de la cicatrización (181). Los fibrocitos se caracterizan por tener en su membrana el fenotipo CD13+, CD34+, CD54+, colágeno+ y vimentina+ (182). Estas células suponen un 0,5% de los leucocitos de sangre periférica, se introducen en la herida 24 horas después de la agresión y producen citoquinas proinflamatorias y quimiotácticas.

El fibroblasto durante el proceso de cicatrización atraviesa diferentes etapas:

- a) Estimulación y migración.
- b) División.
- c) Contracción.
- d) Síntesis de la MEC.

Estos sucesos tienen lugar con frecuencia al mismo tiempo, pero los describiremos por separado.

a) Estimulación y migración:

El fibrocyto, activado a fibrocytasto, es estimulado a través de sus receptores de membrana para migrar. Los estímulos migratorios pueden ser de tres tipos: haptotáticos, quimioquinéticos y quimiotáticos (25). La haptotaxis es el movimiento direccional de las células a lo largo de un sólido que se ha impregnado con un atrayente. El estímulo quimioquinético induce a los fibrocytastos a migrar pero no en una forma direccional, mientras que el estímulo quimiotático hace que los fibrocytastos migren en dependencia de un gradiente de concentración.

Los fibrocytastos migran hacia la herida entre 48 y 72 horas tras la agresión atraídos por estímulos quimiotáticos (147). La lista de sustancias quimiotáticas para los fibrocytastos es extensa e incluye sustancias como la fibronectina, fragmentos de colágeno, de elastina, factores de crecimiento $TGF\beta$, PDGF, $TGF\alpha$, EGF, FGFb, IGF-I) y las llamadas citoquinas fibrogénicas (IL-1 y $TNF\alpha$), leucotrienos, factores del complemento, e incluso el ATP. Como se puede apreciar, son en su mayor parte productos presentes en un tejido lesionado y sustancias que pueden ser producidas por células en proliferación en el lugar de la lesión, plaquetas, diversas células inflamatorias (macrófagos y linfocitos T) y células del endotelio activado.

En el caso de la cicatrización escleral se ha intentado descubrir cuál es el estímulo o estímulos que provocan la migración y la manera de influir sobre ellos; el humor acuoso parece actuar como agente quimiotático sobre los fibrocytastos (137, 183).

b) División. Ciclo celular y potencial de proliferación:

El ciclo de crecimiento celular comprende las siguientes fases: G1 (de presíntesis), S (de síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN)), G2 (premitótica) y M (mitótica). Las células quiescentes se encuentran en un estado fisiológico llamado G0 (figura 4).

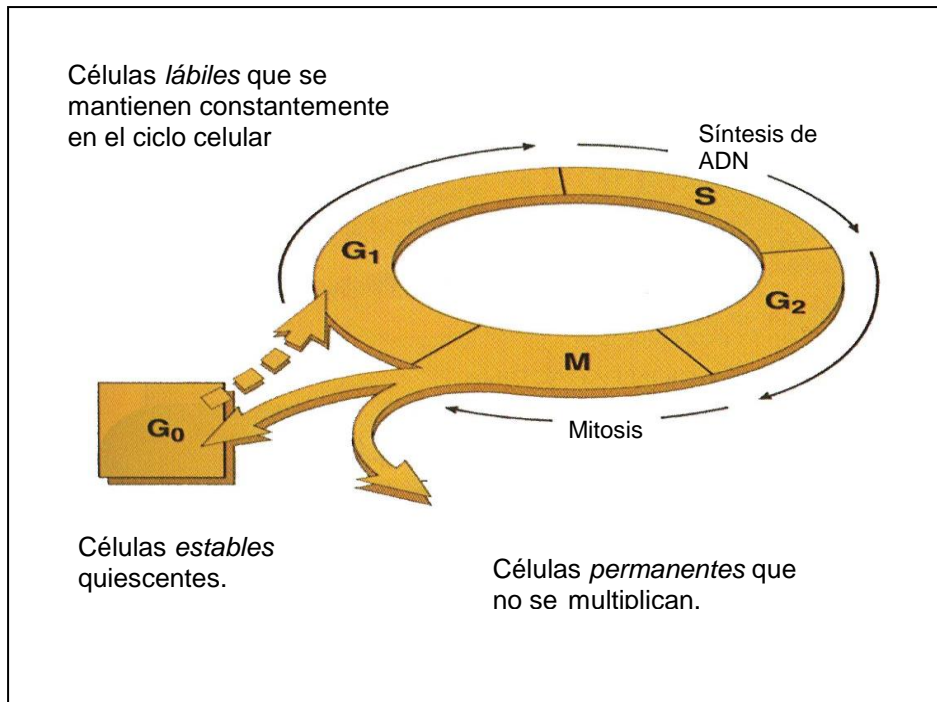


Figura 4 . Ciclo celular. Fases de la replicación celular.

Modificada de Cotran R, Kumar V, Collins T (140).

Las células del organismo se dividen en tres grupos de acuerdo con su capacidad proliferativa y su relación con el ciclo celular:

-Las células en división constante o células *lábiles* recorren el ciclo celular desde una mitosis a la siguiente y siguen proliferando durante toda la vida, reemplazando a las células que se van destruyendo continuamente.

-Las células quiescentes o estables muestran normalmente una actividad mitótica escasa; sin embargo, estas células pueden dividirse rápidamente ante ciertos estímulos y, por tanto, son capaces de reconstruir el tejido del que proceden. Se considera que se encuentran en la fase G₀, pero pueden ser estimuladas y pasar a la fase G₁. A este grupo pertenecen las células parenquimatosas de prácticamente todos los órganos glandulares del cuerpo, las células mesenquimatosas como los fibroblastos y las fibras musculares lisas y las células endoteliales de los vasos. El tejido conjuntivo y las células mesenquimatosas (fibroblastos, células endoteliales, fibras musculares lisas, condrocitos y osteocitos) son elementos quiescentes en el mamífero adulto. Sin embargo, todos ellos proliferan al producirse una lesión y los fibroblastos concretamente proliferan mucho, constituyendo la respuesta del tejido conjuntivo a la inflamación.

-Las células no divisibles o permanentes abandonaron el ciclo celular y no pueden entrar en mitosis en la vida postnatal.

Salvo los tejidos formados principalmente por células no divisibles, la mayoría de los tejidos maduros contienen una mezcla de células que están multiplicándose constantemente, de células quiescentes que de vez en cuando se incorporan al ciclo celular, y de células que no se dividen.

La proliferación puede ser considerada una consecuencia de los efectos combinados de migración y división, por lo que la mayoría de factores de crecimiento no sólo inducen mitosis sino también quimiotaxis (32).

Los fibroblastos llegan relativamente tarde al lugar de la herida y alcanzan un número óptimo alrededor de 1-2 semanas, disminuyendo lentamente durante los siguientes meses (141) (figura 3).

Las células mononucleares son la mayor fuente de factores de crecimiento y sustancias inhibitoras de los fibroblastos; su actividad es máxima entre los 2 y 6 días del postoperatorio. Los factores de crecimiento regulan el ciclo de división de los fibroblastos. Algunos estimulan al fibrocito a salir de la fase G0 y pasar a una fase activa, mientras que otros ejercen su influencia en la fase G1 previa a la síntesis de ADN (fase S) (184). Estos factores de crecimiento no parecen influir en el ciclo de división a partir de la fase S de síntesis.

c) Contracción de la herida:

En un principio se pensó que la contracción, responsable del cierre de una herida, se debía al acortamiento de las fibras de colágeno. Es cierto que la contracción del colágeno puede producirse experimentalmente, pero a una temperatura alta, no fisiológica. Según Tahery (130), la contracción de la herida se debe a un acortamiento de las fibras de colágeno, que producen un movimiento centrípeto mediado por miofibroblastos (173, 185). La importancia de la contracción es dependiente de factores como el tamaño, localización, forma y modificaciones patológicas de la herida y es máxima a las 4-5 semanas de producirse la lesión (130).

Hoy se considera que la contracción de la herida es un suceso celular más que extracelular, y la célula responsable de la generación de la fuerza contráctil es el fibroblasto. Gabbiani (185), en 1972, propuso el concepto de "miofibroblasto" como el estadio contráctil en la vida del fibroblasto en una herida o en el tejido de granulación. Su idea era que los fibroblastos adquirirían características de fibras musculares lisas, como la contractilidad, ayudando así al cierre de la herida. Mediante estudios ultraestructurales con

microscopía electrónica de transmisión se demostró que, efectivamente, los fibroblastos adquieren características típicas de las células del músculo liso, eran elongados, con núcleos voluminosos e indentados, no presentaban un abundante retículo endoplásmico y poseían fascículos de fibrillas citoplásmicas. Mediante estudios bioquímicos e inmunofluorescencia se vio que presentaban importantes cantidades de actinmiosina en el citoplasma, pudiendo así explicarse los fenómenos de contracción de las heridas (140).

Se sugiere que las células inflamatorias son responsables de la producción de los mediadores biológicos de la inducción miofibroblástica. Braunstein (186), en 1980, demostró que cuando los polimorfonucleares desaparecen o mueren, liberan un factor mitogénico inductor de los fibroblastos. Es bien claro, que las células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, mastocitos) y la acción de hormonas locales, producidas en respuesta a la inflamación, estimulan la fase de fibroplasia, sin embargo estos factores no están directamente relacionados con la diferenciación miofibroblástica.

Se estudió la localización de los miofibroblastos en el tejido de granulación cicatricial, observándose una alta densidad de los mismos en las proximidades del foco inflamatorio. McGrath (179), en 1982, mediante incisiones en cerdos, observó que el porcentaje de miofibroblastos en zonas situadas a 1 mm del foco inflamatorio y en relación con el número de células inflamatorias es 14 veces superior al hallado a 3 mm del mismo ($p < 0,001$) en la primera semana. Después del octavo día, al ser menos aparentes las áreas inflamatorias y disminuir considerablemente el número de sus células, el porcentaje de miofibroblastos no podía ser valorado.

Los miofibroblastos se disponen de una forma organizada a lo largo de las líneas de tracción (147). Parece que la contracción de la herida se debe a fuerzas de tracción, lo que implica que las fuerzas generadas por los miofibroblastos se transmiten a otras células y a la MEC (187). El miofibroblasto activado produce colágeno de tipo III que aumenta transitoriamente en los estadios iniciales de la cicatrización y desaparece posteriormente (188).

El hecho de que la actividad del fibroblasto sea la responsable de la contracción en el proceso de cicatrización no se duda, sin embargo, el que actúe como una fibra muscular lisa puede no ser correcto. Se piensa que el cierre de la herida y la contracción del tejido de granulación se debe a la migración del fibroblasto al lugar de la solución de continuidad. Fue Harris (173) quien demostró estas fuerzas sembrando fibroblastos sobre capas de silicona. Estas capas de silicona quedaban totalmente distorsionadas por las fuerzas de tracción que generaban los fibroblastos al moverse sobre ellas, mientras que los macrófagos prácticamente no producían ninguna alteración en la superficie. Según este

autor, al migrar, los miofibroblastos generan fuerzas de tracción en el sustrato donde se mueven; esta tracción no es debida a una contracción de tipo muscular, sino a una propulsión en el movimiento longitudinal (25).

La migración fibroblástica altera los puntos de unión del coágulo, glucoproteínas y colágeno en la zona de la herida. Esta movilidad fibroblástica sería la responsable de la generación de unas fuerzas isotónicas, necesarias para el cierre de la solución de continuidad. Según esta hipótesis, los fibroblastos establecen uniones con las células adyacentes, mediante unas extensiones conocidas como microtendones. Éstos contienen microfilamentos de actina que se organizan a modo de fibras de estrés (130). Los miofibroblastos desarrollan un importante sistema de filamentos de actina que corresponde a las fibras de estrés descritas *in vitro*, y se ha demostrado que contienen proteínas asociadas a la actina, como miosina, tropomiosina, α -actinina y filamina (187). La función de estas fibras de estrés permanece indefinida, pero se cree que constituyen un elemento generador de fuerza en la contracción de la herida y que están involucradas en la adhesión célula-sustrato (185, 189).

La estimulación de los miofibroblastos *in vitro* con sustancias como la angiotensina, epinefrina, norepinefrina, serotonina, prostaglandinas y bradiquinina, provoca contracciones similares a las del músculo (147). Kreis y Birchmeier (190) demostraron que las fibras de estrés son contráctiles y su función es mantener la tensión, generando fuerzas de tipo isotónico; la contracción del fibroblasto es Ca^{++} dependiente y precisa ATP. Por todo ello, propusieron el uso del término fibroblasto fusiforme (meramente descriptivo), más que el de miofibroblasto (que no se correspondería con su función).

d) Síntesis de la MEC:

Además de su función estructural, el fibroblasto es la célula responsable de la síntesis de la mayoría de los componentes de la MEC: proteínas estructurales (colágeno, glucoproteínas, glucosaminoglicanos y fibras elásticas), diversas enzimas proteolíticas que intervienen en los procesos de reestructuración y remodelación de la MEC, así como algunos de sus inhibidores específicos, ejerciendo de este modo un estricto control en la composición y renovación de la MEC (remodelación de la MEC) (187, 191).

La apariencia ultraestructural de muchos de los fibroblastos durante la cicatrización no es como la del miofibroblasto, sino la de una célula activa, rica en retículo endoplásmico rugoso. Normalmente el fibroblasto tiene un aparato de Golgi bien desarrollado, gran cantidad de vesículas, mitocondrias compactas con matrices densas y abundantes lisosomas.

Durante la cicatrización la producción máxima de glucoproteínas precede a la de colágeno. La principal glucoproteína que se produce en este momento es la fibronectina, que se adhiere ávidamente al coágulo de fibrina. Dado que los fibroblastos no se adhieren particularmente bien a la fibrina y que la fibronectina es el substrato ideal para éstos, es más que probable que los complejos insolubles fibrina-fibronectina sirvan de soporte, temporalmente, a los primeros fibroblastos que llegan al lecho de la lesión y regulen inicialmente la organización espacial del tejido cicatricial (192). La fibronectina, que es abundante en la etapa temprana de la cicatrización, está prácticamente ausente en la cicatriz madura.

Los fibroblastos sintetizan diversos glucosaminoglicanos, como ácido hialurónico, condroitín sulfatos, heparán sulfatos y dermatán sulfatos, un grupo heterogéneo de macromoléculas constituidas por un núcleo proteico unido a polisacáridos que contienen hexosamina y ácido urónico, que participan en el proceso de adhesión intercelular y son también capaces de producir y secretar diversas enzimas proteolíticas, como metaloenzimas o metaloproteinasas (colagenasa) y serín-proteasas, así como algunos de sus inhibidores específicos, ejerciendo de este modo un estricto control en la composición y renovación de la MEC, incluso después de que la herida esté reparada (187, 191).

Una vez conocido el fibroblasto, su comportamiento y papel en la cicatrización de las heridas, se puede intentar comprender el funcionamiento y la efectividad de las drogas capaces de controlar su actividad (25).

3.3.- FASE DE REMODELACIÓN CICATRICIAL.

3.3.1.- MATRIZ EXTRACELULAR E INTERACCIONES CÉLULA-MATRIZ.

Las células crecen, se desplazan y se diferencian manteniendo un íntimo contacto con la MEC, y existen pruebas contundentes de que la matriz influye decisivamente en estas funciones celulares (193). La MEC es secretada localmente y se incorpora a la trama que se encuentra en los espacios intercelulares. Forma una proporción considerable de la masa de cualquier tejido y consta de macromoléculas situadas fuera de las células. La MEC cumple muchas funciones (140): proporciona un sustrato para que las células se adhieran, emigren y proliferen, forma un reservorio para los factores del crecimiento que regulan la proliferación celular, puede influir directamente sobre la forma y el funcionamiento de las células, y su degradación acompaña a la morfogénesis y a la curación de las heridas.

Para que se forme la MEC es preciso que se asocien físicamente tres clases de macromoléculas (140):

- Las proteínas estructurales fibrosas, como las de colágeno y las elastinas.
- Un grupo variado de glucoproteínas de adhesión, que comprende a la fibronectina, la laminina y las integrinas.
- Un gel de proteoglicanos e hialuronato.

Estas macromoléculas se reúnen formando dos estructuras: la matriz intersticial y la membrana basal. La matriz intersticial ocupa los espacios situados entre las células epiteliales, endoteliales y musculares lisas, y en el tejido conjuntivo. Está formada por colágeno fibrilar (de los tipos I, III, V) y no fibrilar, elastina, fibronectina, proteoglicanos, hialuronato y otros componentes. Las membranas basales son elaboradas por las células epiteliales y mesenquimatosas, y están íntimamente asociadas a la superficie celular. Constan de una red de colágeno amorfo sin fibrillas (en su mayoría del tipo IV), laminina, heparán sulfato, proteoglicanos y otras glucoproteínas.

La MEC especializada funciona como una trama o andamiaje extracelular que ayuda a lograr una reconstrucción exacta de las estructuras preexistentes. La tercera fase del proceso de reparación, fase de remodelación, consiste en la reestructuración y remodelación de esta MEC. Durante la reparación se depositan macromoléculas como el colágeno, la fibronectina, el ácido hialurónico y los proteoglicanos que sirven de tejido de sostén y de soporte para la migración celular (147). La deposición y remodelación de la MEC es un proceso dinámico, existiendo diferencias en las proporciones de las proteínas de la MEC en las diferentes fases del proceso reparativo, e incluso entre el centro y la periferia de la lesión. El equilibrio entre la degradación y síntesis de los componentes de la MEC determina la remodelación del tejido cicatricial. Algunos de los factores de crecimiento que estimulan la síntesis de colágeno y de otras proteínas de la MEC también modulan la síntesis y activación de las metaloproteinasas, enzimas encargadas de la degradación de los componentes de la MEC.

Si tomamos como modelo la piel, tras el restablecimiento de la barrera funcional dérmica, siguen ocurriendo sucesos relacionados con la reparación. La cantidad total de colágeno aumenta precozmente en el proceso de reparación, alcanzando su máximo entre 2 y 3 semanas después de producirse la lesión (194). La resistencia aumenta un 40% un mes después de la lesión y puede continuar aumentando durante un año; sin embargo, nunca supera el 80% de la resistencia previa a la herida (147). Durante esta fase ocurren cambios en los tipos de colágeno presentes. El colágeno tipo III es el principal tipo de colágeno sintetizado por los fibroblastos durante la cicatrización. Sin embargo, la dermis

está constituida fundamentalmente por colágeno tipo I, por lo que debe recuperar su composición histológica normal, proceso que puede durar un año o más. Además, la composición de otros materiales de la matriz cambia a medida que la cantidad de agua y glicosaminoglicanos disminuye. El proceso de conversión de una dermis compuesta fundamentalmente de colágeno tipo III por otra formada mayoritariamente por colágeno tipo I se lleva a cabo mediante la interacción, rigurosamente controlada, entre la síntesis de nuevo colágeno y la lisis del colágeno viejo. La lisis de colágeno se lleva a cabo por la acción de colagenasas. Esto conlleva un cambio en la orientación de la cicatriz. El colágeno que escapa a la acción de las colagenasas durante esta fase es el que inicialmente fue organizado de forma paralela a las líneas de tensión (194). Con el tiempo, la dermis lesionada recupera su estado primitivo y la cicatrización de la lesión se considera concluida (147).

3.3.2.- LAS METALOPROTEINASAS.

La degradación del colágeno y de otras proteínas de la MEC es realizada por una familia de enzimas denominadas metaloproteinasas de la MEC, ya que su activación depende de su unión a iones zinc (195). Las metaloproteinasas deben diferenciarse de otras enzimas del grupo de las serínproteasas como la elastasa de los neutrófilos, la catepsina G, diversas quininas, la plasmina y otros importantes enzimas proteolíticos que también pueden degradar los componentes de la MEC.

Las principales metaloproteinasas son las colagenasas intersticiales que se adhieren al colágeno fibrilar tipo I, II y III; antes de que estos enzimas puedan actuar, otros enzimas como la hialuronidasa y otras proteasas deben eliminar previamente otras sustancias, dejando así expuestas las fibras de colágeno. Las gelatinasas o colagenasas tipo IV degradan el colágeno amorfo y la fibronectina. Las estromalinasas actúan sobre una gran variedad de componentes de la MEC, incluyendo proteoglicanos, laminina, fibronectina y colágeno amorfo. La familia de las metaloproteinasas de la matriz unidas a la membrana son proteasas asociadas a las superficies celulares (196).

Las metaloproteinasas son sintetizadas por diversos tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células sinoviales, células vasculares y algunas células epiteliales), y su secreción es inducida por diferentes estímulos, entre los que se incluyen factores de crecimiento (PDGF, FGF), citoquinas (IL-1, $TNF\alpha$), el estímulo de la fagocitosis y los traumatismos tisulares. Son inhibidas por el $TGF\beta$ y los esteroides (197). Las colagenasas son sintetizadas en forma inactiva (procolagenasas) y necesitan ser activadas por radicales químicos ($HOCl\cdot$, producido por los leucocitos) y proteasas (plasmina). Las

colagenasas activas degradan el colágeno cortando la triple hélice en dos fragmentos iguales que son susceptibles a la digestión por otras proteasas. Las metaloproteinasas de la MEC activadas son inhibidas por un grupo de inhibidores específicos, producidos por la mayoría de las células mesenquimales (198).

3.3.3.- PAPEL DEL COLÁGENO CICATRICIAL.

El colágeno es la proteína más abundante del reino animal, forma el almacén extracelular de todos los organismos pluricelulares y es el principal componente no celular de la cicatriz. *In vivo* los fibroblastos sintetizan y secretan colágeno; curiosamente, los fibroblastos *in vitro* sintetizan diferentes tipos de colágeno en dependencia de su lugar de origen (199).

En 1970, Peacock y Van Winkle (200) describen cuatro niveles de organización molecular en la estructura del colágeno. La unidad fundamental de la fibra de colágena es la molécula de colágena o tropocolágena, que tiene un peso molecular de 285 kD y mide 300x1,4 nanómetros. Está constituida por una triple espiral de cadenas (α -cadena); cada cadena conforma la estructura primaria y está formada por aproximadamente 1.000 aminoácidos que tienen una secuencia repetitiva (gly-x-y)_n, donde x e y son aminoácidos diferentes de la glicina (201). Las cadenas están fuertemente enrolladas en una triple hélice levógira que se estabiliza por múltiples enlaces cruzados intercatenarios entre residuos de lisina e hidroxilisina (140). Finalmente las triples hélices se asocian bilateral y longitudinalmente en fibrillas.

La síntesis de colágeno tiene lugar en dos etapas: una intracelular y otra extracelular (figura 5). El precursor del colágeno es el preprocolágeno, un polipéptido sintetizado por los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico rugoso que es procesado por éste y posteriormente por el aparato de Golgi. El preprocolágeno contiene una secuencia guía de 100 aminoácidos en su extremo aminoterminal, y cuando la secuencia señal entra en el espacio vesicular del retículo endoplásmico rugoso es separada del polipéptido en formación y el extremo aminoterminal de procolágeno sigue introduciéndose en el espacio reticular endoplásmico, donde la prolil-4-hidrolasa y la lisil-hidrolasa actúan sobre los residuos de prolina y lisina. La prolina es hidroxilada en posición α y proporciona al colágeno su característico contenido en hidroxiprolina (10%). Las prolil-hidroxilasas son dependientes del ácido ascórbico, hierro y oxígeno, y su acción permite la unión de las tres cadenas α en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso. Esta molécula es transportada a través del aparato de Golgi y vacuolas más grandes a la superficie celular.

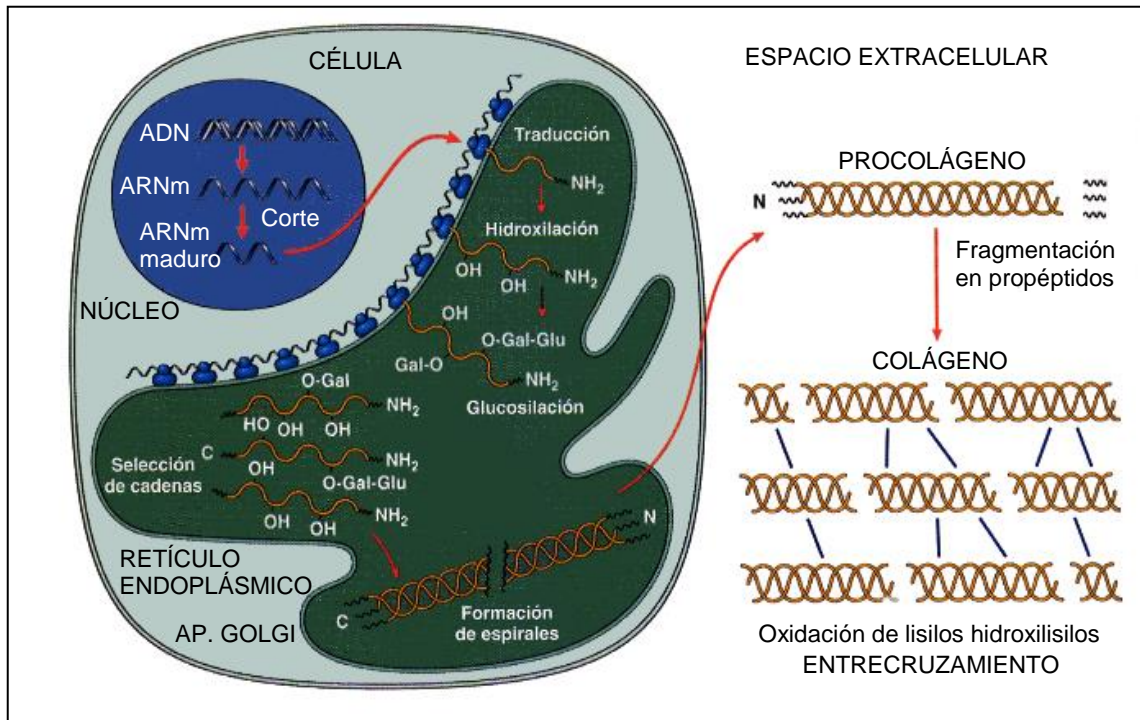


Figura 5. Fases de la síntesis de colágeno. Modificada de Cotran R, Kumar V, Collins T (140).

La molécula de procolágena contiene en sus extremos unos propéptidos que no están presentes en la colágena madura. El propéptido del extremo aminoterminal, con un peso molecular de 20 kD, forma sólo enlaces disulfuro intracatenarios, y el propéptido del extremo carboxilo forma puentes disulfuro intra y extracatenarios, dando lugar a un ensamblaje de las moléculas de procolágena a modo de triple hélice (202). Una vez configurada la triple hélice ya no puede haber una hidroxilación posterior de los residuos de prolina ni lisina. Después, una glucosiltransferasa adhiere glucosa o galactosa a los residuos de hidroxilisina, para lo cual es necesario que las cadenas α de procolágena no sean helicoidales. La procolágena glicosilada es transportada al espacio extracelular. Las enzimas procolágena-aminoproteasa y procolágena-carboxiproteasa durante o poco después de su secreción a la MEC, sueltan los extremos N-terminal y C-terminal, dando lugar a la molécula de colágena madura, que en este momento contiene unos 1.000 aminoácidos. Las verdaderas fibrillas de colágeno se forman en el espacio extracelular, uniéndose de forma cruzada por medio de enlaces covalentes y proporcionando resistencia al tejido conjuntivo (25, 203, 204).

La estructura cuaternaria del colágeno se basa en el agrupamiento del tropocolágeno en forma de filamentos que se unen formando fibrillas y fibras. La formación de fibrillas se acompaña de la oxidación de ciertos residuos de lisina e hidroxilisina, por acción de la enzima extracelular lisil oxidasa. Esto hace que aparezcan entrecruzamientos

entre las cadenas α de las moléculas adyacentes que, de esa forma, ayudan a que se forme y consolide la característica arquitectura del colágeno. Los enlaces entrecruzados son el principal factor que favorece la resistencia a la tensión del colágeno (25, 27).

Se distinguen genética y estructuralmente 30 tipos de cadenas α que originan los 19 tipos de colágeno reconocidos actualmente, cada uno de ellos especializado funcionalmente (130, 140, 205, 206):

-Tipo I [$\alpha_1(I)$]₂ $\alpha_2(I)$: En piel (80%), hueso (90%), tendones, ligamentos y córnea sobre todo. Es el más abundante. Rico en hidroxiprolina. Forma marañas de bandas de fibras con gran resistencia tensil.

-Tipo II [$\alpha_1(II)$]₃: En cartílagos articulares (50%), discos intervertebrales, notocorda y cuerpo vítreo. Rico en hidroxilisina. Delgadas fibrillas con función de proteína estructural.

-Tipo III [$\alpha_1(III)$]₃: En piel fetal y adulta (10%), aparato cardiovascular, fibras reticulares, membranas sinoviales, útero y aparato gastrointestinal. Delgadas fibrillas muy flexibles.

-Tipo IV [$\alpha_1(IV)$]₂ $\alpha_2(IV)$: En todas las membranas basales (cápsula del cristalino, membrana de Descemet y en las membranas basales de los epitelios). Amorfo. Otras cadenas α del colágeno tipo IV son las $\alpha_3(IV)$, $\alpha_4(IV)$ y $\alpha_5(IV)$.

-Tipo V $\alpha_1(V)$ $\alpha_2(V)$ $\alpha_3(V)$: En vasos sanguíneos, placenta, piel y en tejidos intersticiales (2-5%). Amorfo, formado por finas fibrillas.

-Tipo VI $\alpha_1(VI)$ $\alpha_2(VI)$ $\alpha_3(VI)$: En tejidos intersticiales. Amorfo, formado por finas fibrillas.

-Tipo VII [$\alpha_1(VII)$]₃: En las uniones dermo-epidérmicas. Son filamentos de anclaje.

-Tipo VIII [$\alpha_1(VIII)$]₂ $\alpha_2(VIII)$: En el endotelio y membrana de Descemet de la córnea. Morfología probablemente amorfa.

-Tipo IX $\alpha_1(IX)$ $\alpha_2(IX)$ $\alpha_3(IX)$: En el cartílago. Posible papel en la maduración del cartílago.

-Tipo X [$\alpha_1(X)$]₃: Posible papel en la maduración del cartílago.

-Tipo XI $\alpha_1(XI)$ [$\alpha_2(XI)$]₂: Posible papel en la maduración del cartílago.

-Tipo XII [$\alpha_1(XII)$]₃.

-Tipo XIII [$\alpha_1(XIII)$]₃: En músculo ciliar, nervio óptico y retina neural.

Los tipos I, II, III, V y XI son los colágenos fibrilares, presentan fibrillas estriadas como rasgo característico y son los más abundantes. Los tipos IX, XII y XIV son los colágenos fibrilares con triples hélices interrumpidas. Los tipos VIII y X son los colágenos

de cadenas cortas. Los tipo IV, VI, VII y XIII son formas no fibrilares (o amorfas) y están presentes en los tejidos intersticiales y los tipo IV en las membranas basales (140).

De los distintos tipos de colágeno, los tipos I y III son de particular interés en el proceso de cicatrización. Inicialmente, el colágeno tipo III es el que llena la herida, posteriormente es reemplazado por colágeno de tipo I, ya maduro (130). No se reconocen otros tipos de colágeno como participantes directamente en el proceso de la cicatrización.

La síntesis de colágeno por los fibroblastos comienza en el día 3 ó 5 tras la agresión quirúrgica y continúa durante varias semanas en dependencia del tamaño de la herida. La síntesis colágena es estimulada por diferentes factores, como los factores de crecimiento (PDGF, FGF, TGF β) y citoquinas (IL-1, IL-4) que son producidas por los leucocitos y fibroblastos de la herida. Sin embargo, la acumulación final de colágeno depende, no sólo de su síntesis, sino también de su degradación.

3.3.4.- ELASTINA, FIBRILINA Y FIBRAS ELÁSTICAS.

Aunque los componentes de la familia del colágeno proporcionan resistencia a la distensión, la capacidad de retracción de estos tejidos se obtiene gracias a las fibras elásticas (207). Estas fibras pueden estirarse y multiplicar varias veces su longitud, para recuperar después su tamaño inicial al cesar la fuerza de distensión. Morfológicamente, las fibras elásticas constan de un núcleo central rodeado por una red de microfibrillas. El núcleo central está formado en gran parte por elastina, una proteína de 70 kD. Se encuentran cantidades importantes de elastina en las paredes de los grandes vasos, como la aorta, y en el útero, la piel y los ligamentos. Al igual que en el colágeno, la glicina constituye una tercera parte de los residuos de elastina y también es rica en prolina y alanina. A diferencia del colágeno, la elastina contiene poca hidroxiprolina y ningún residuo de hidroxilisina. En la elastina madura existen entrecruzamientos que regulan su elasticidad.

La red de microfibrillas que rodea al núcleo está formada en gran parte por fibrilina, una glucoproteína secretada de 350 kD que está asociada consigo misma o con otros componentes de la MEC (140). Las microfibrillas sirven de almacén para el depósito de elastina y el ensamblaje de las fibras elásticas.

3.3.5.- GLUCOPROTEÍNAS E INTEGRINAS DE ADHESIÓN. LAS CADHERINAS.

Las glucoproteínas fibronectina y laminina y las integrinas de adhesión son proteínas cuya principal propiedad es su capacidad para unirse, por un lado, a otros componentes de la MEC y, por otro, a ciertas proteínas específicas integrantes de la membrana celular. Estas sustancias, por tanto, unen a los componentes de la MEC entre sí y a las células. Las integrinas, además, tienen un importante papel ensamblando los complejos de señalización en los puntos de contacto que existen entre las células y la MEC.

La fibronectina es una proteína de adhesión dotada de numerosas funciones, entre las que destaca la de fijar las células a una serie de matrices. Es una gran glucoproteína (de 450 kD aproximadamente) formada por dos cadenas que se mantienen unidas por puentes disulfuro (208). Se encuentra en la superficie de las células, en las membranas basales y las matrices pericelulares. Es elaborada por los fibroblastos, además de monocitos, células endoteliales y otras células. Se une a varios componentes de la MEC (como el colágeno, la fibrina y los proteoglicanos) por varias regiones específicas, y a las células por sus receptores, los cuales reconocen la secuencia específica de aminoácidos que tiene el tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). El elemento que reconoce al RGD desempeña un papel clave en la adhesión entre la célula y la matriz. Se cree que la fibronectina participa directamente en esa unión, donde sirve para potenciar la sensibilidad de ciertas células, como las del endotelio capilar, a los efectos proliferativos de los factores de crecimiento.

La laminina es la glucoproteína que más abunda en las membranas basales. Este grupo de proteínas de la matriz son estructuras de gran tamaño (unos 820 kD) formadas por entrecruzamientos heterotriméricos que abarcan todo el espesor de la lámina basal, y están unidas a receptores específicos por el extremo situado en la superficie celular y, por el otro, a algunos componentes de la matriz, como el colágeno de tipo IV y el heparán sulfato (140). Se cree también que la laminina actúa como mediadora uniendo la célula a los sustratos del tejido conjuntivo; en los cultivos, altera el crecimiento, la supervivencia, morfología, diferenciación y motilidad de varios tipos de células. En los cultivos de células endoteliales expuestos al FGF, la laminina produce el alineamiento de las células endoteliales y la subsiguiente formación de los conductos capilares, un fenómeno que es esencial para la angiogénesis. Hay otras MEC que también pueden inducir la formación de tubos capilares. La laminina y la fibronectina, igual que otros muchos componentes de la MEC, se unen a los miembros de la familia de los receptores de las integrinas.

Las integrinas son la principal familia de receptores de la superficie celular que actúan mediando la unión de las células a la MEC. Existen algunas clases de integrinas

que sirven también como mediadoras de importantes interacciones celulares involucradas en la adhesión de los leucocitos. Hay muchos tipos de integrinas y la mayoría de las células tienen más de un tipo en su superficie celular. La importancia de las integrinas es evidente por las funciones esenciales que desempeñan en una extensa variedad de procesos biológicos. Por ejemplo, su papel en la adhesión las convierte en unos elementos esenciales para la extravasación leucocitaria, la agregación plaquetaria, los procesos del desarrollo y la curación de las heridas. Además, algunas células deben estar adheridas para proliferar, y si no se unen a una MEC por medio de integrinas, se produce la apoptosis.

Las integrinas son glucoproteínas formadas por cadenas α y β que cruzan de lado a lado la membrana (209). Hay 14 clases de subunidades α y 8 clases de subunidades β , que producen al menos 20 heterodímeros de integrinas. Una sola cadena β puede reaccionar con una serie de 20 cadenas α , produciendo integrinas capaces de unirse a distintos componentes de la matriz. Las porciones extracelulares de las integrinas se unen a muchos componentes de la MEC (fibronectina, laminina y algunas clases de colágeno) gracias al reconocimiento de la secuencia RGD citada anteriormente.

Los receptores de las integrinas son importantes para organizar el citoesqueleto celular de la actina y para transmitir las señales desde la MEC hasta el interior de la célula. El enganche entre los componentes de la MEC y el receptor de la integrina produce agrupamiento de los receptores y la formación de adhesiones locales, en donde las integrinas se conectan con los complejos del citoesqueleto intracelular (210). Las proteínas que se fijan con las integrinas en esas adhesiones locales son la talina, vinculina, α -actinina, tensina y paxilina. Una vez ensambladas, los complejos formados por integrina-citoesqueleto funcionan igual que los receptores activados, y reclutan a los componentes de los sistemas de señalización intracelular. Las vías moleculares que seguidamente se unen a las proteínas de la MEC para regular el crecimiento y diferenciación celular se conocen mal. Sin embargo, es probable que los receptores de los factores de crecimiento y distintas moléculas de la MEC compartan las mismas vías metabólicas intracelulares, como las vías de activación de la cinasa de MAP, la fosfoinosítido-3 cinasa y la proteínkinasa C (PKC).

La conexión mecánica entre los receptores de las integrinas y el sistema de señalización del citoesqueleto quizá consista en una transformación de la fuerza mecánica en señales bioquímicas realizada por las células. La hipótesis de la tensigridad sugiere que las tensiones aplicadas a la MEC se transmitirían siguiendo a los receptores de las

integrinas y a un citoesqueleto tenso por toda la célula e incluso al interior del núcleo, donde ocurren los cambios en la expresión genética (140).

Las conexiones intercelulares están mediadas por glucoproteínas de adhesión (moléculas de adhesión celular o MAC), situadas en la superficie celular y por las cadherinas (moléculas de adhesión dependientes de Ca^{++}) (211, 212) (figura 6).

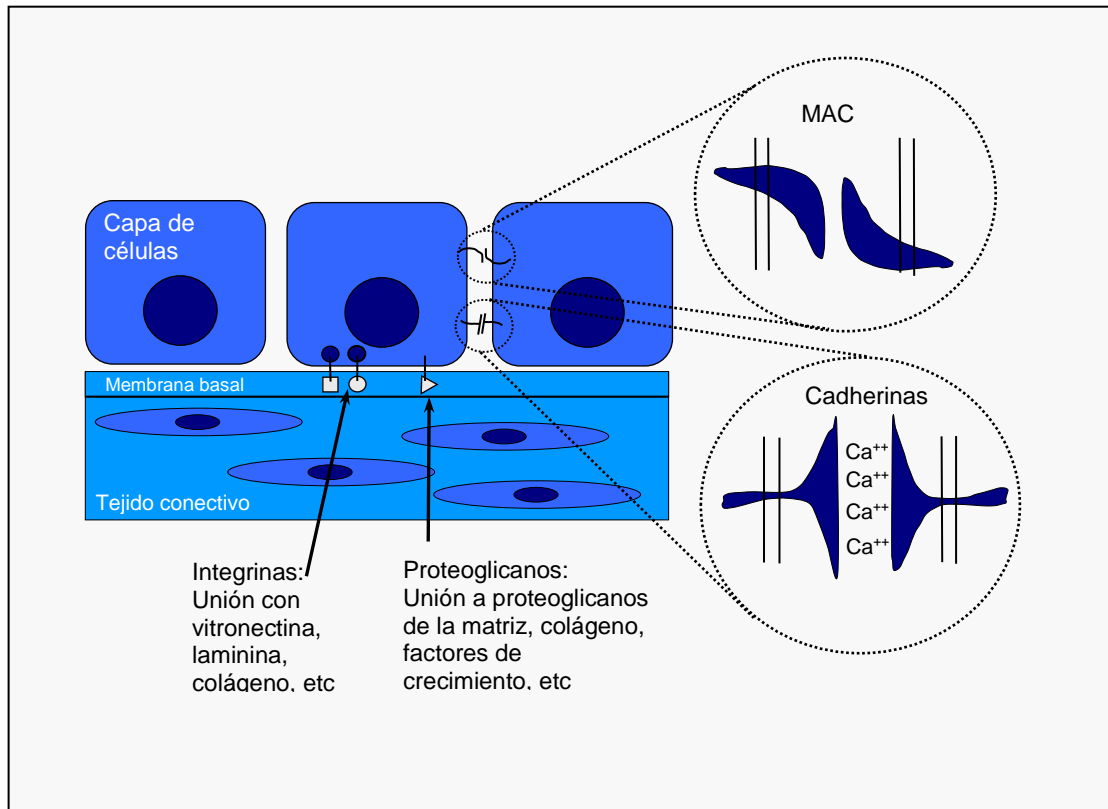


Figura 6. Moléculas de adhesión celular. Modificada de Freshney R (211).

3.3.6.- PROTEOGLICANOS E HIALURONATOS.

Los proteoglicanos están formados por una proteína central unida a uno o más polisacáridos llamados glucosaminoglicanos (140). Estos últimos son largos polímeros compuestos por ciertos disacáridos repetidos, donde uno de ellos o ambos, contienen un residuo de sulfato. Los proteoglicanos destacan por su gran diversidad. Una MEC puede estar formada por varias clases distintas de proteínas centrales, cada una de las cuales contiene distintos glucosaminoglicanos. Los proteoglicanos se designan de acuerdo con la estructura del principal disacárido que se repite. Entre los más frecuentes están: el

heparán sulfato, el condroitín sulfato y el dermatán sulfato. Cumplen diversas funciones relacionadas con la regulación de la estructura y la permeabilidad del tejido conjuntivo. Los proteoglicanos también pueden formar parte de las proteínas de la membrana y ser moduladores, por tanto, del crecimiento y la diferenciación celular.

El hialuronato es una enorme molécula formada por numerosas repeticiones, desde un extremo al otro, de un disacárido sencillo. El hialuronato funciona como un ligando de las proteínas centrales, tales como la proteína de unión al cartílago, el agregano y el versicano y, muchas veces, sirve de estructura central para los grandes complejos de proteoglicanos (213). Se adhiere también a los receptores de la superficie que regulan la proliferación y migración celular, como el CD44. El hialuronato fija gran cantidad de agua, formando un gel viscoso hidratado que proporciona al tejido conjuntivo una gran turgencia y capacidad para resistir las fuerzas de compresión. También existe hialuronato en la matriz de las células que están en migración y proliferación, en donde inhibe la adhesión célula-célula y favorece la migración celular.

3.3.7.- PROTEÍNAS DE LA MATRIZ CELULAR.

Las proteínas de la matriz celular son una clase de proteínas secretadas, recientemente descritas, que no forman parte de la estructura de la MEC, sino que reaccionan con las proteínas de la matriz, con los receptores de la superficie celular o con otras moléculas (como los factores de crecimiento, las citocinas o las proteasas) que, a su vez, interactúan con la superficie celular. Aunque una propiedad inherente a las proteínas de la matriz celular es su diversidad funcional, todas ellas tienen en común su capacidad para impedir las interacciones célula-matriz.

Esta familia de proteínas adaptadoras comprende (140):

-La proteína ácida secretada rica en cisteína (SPARC o *secreted protein acidic and rich in cysteine*), también conocida como osteonectina, que favorece la remodelación de los tejidos que han sufrido lesiones y que inhibe la angiogénesis.

-Las tromboespondinas, una familia de grandes proteínas dotadas de numerosas funciones, algunas de las cuales también inhiben la angiogénesis.

-La osteopontina, que interviene en la regulación de la calcificación, pero que también sirve de mediadora de la migración leucocitaria.

-El grupo de las tenacinas, que son unas grandes proteínas multiméricas involucradas en la morfogénesis y modulación de la adhesión celular.

4.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CURACIÓN DE LAS HERIDAS.

El proceso cicatricial no se presenta con la misma intensidad en todos los pacientes. Existen unos factores, conocidos unos y desconocidos otros, tanto intrínsecos como extrínsecos, que condicionan dicho proceso y deterioran la calidad y eficacia de la inflamación y la reparación. Estas influencias abarcan a factores del huésped que son tanto generales como locales.

4.1.- FACTORES LOCALES.

Los factores locales que influyen en la curación son los siguientes:

- La infección, que es la causa aislada más importante de retraso de la curación.
- Los factores mecánicos, como la movilización precoz de las heridas, pueden retrasar la curación.
- Los cuerpos extraños, como las suturas innecesarias, implantes de colágeno, los fragmentos de acero, vidrio, o incluso de hueso, constituyen obstáculos para la curación.
- El tamaño, la localización y la clase de herida influyen en la curación. Las heridas de áreas muy vascularizadas, como las de la cara, curan más rápidamente que las situadas en regiones poco vascularizadas, como los pies. Las pequeñas lesiones intencionadas curan más rápidamente que las heridas más grandes causadas por traumatismos no penetrantes.
- La presión de oxígeno presente en la zona de cicatriz se correlaciona con la contracción de la misma, siendo favorable una ligera hiperoxia (214). Pese a esto, experimentalmente se sabe que los fibroblastos pueden desarrollarse en un medio avascular, e incluso hipóxico.

4.2.- FACTORES GENERALES.

Los factores generales que influyen en la curación son los siguientes:

- Factores metabólicos y nutricionales. Es conocida desde 1.930 la importancia del metabolismo proteico y la nutrición para la correcta cicatrización de las heridas (203). El déficit de proteínas, especialmente la carencia de vitamina C, inhibe la síntesis de colágeno y retrasa la curación. La diabetes mellitus, por ejemplo, se acompaña de retraso de la curación.

-Edad: Se han realizado estudios experimentales en animales objetivándose que en animales viejos, aumenta el adelgazamiento y rigidez de la dermis, retrasándose los procesos de contracción cicatricial respecto a animales jóvenes (215).

-El estado circulatorio puede modificar la curación de las heridas. Un riego sanguíneo insuficiente, causado habitualmente por la arteriosclerosis o por alteraciones de las venas que entorpecen el drenaje venoso, dificulta también la curación.

-Agentes farmacológicos: Aplicados tópicamente o sistémicamente, los agentes citotóxicos retrasan la contracción de la cicatriz. Los antimetabólicos y drogas quimioterápicas inhiben la proliferación fibroblástica, así como las radiaciones ionizantes cuando son usadas en los periodos de rápida división fibroblástica (216, 217).

-Los corticoides poseen efectos antiinflamatorios que influyen sobre varios componentes de la inflamación, inhiben la proliferación fibroblástica y aumentan la actividad colagenolítica (218).

C.- LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR.

1.- FENÓMENOS MOLECULARES DEL CRECIMIENTO CELULAR.

Los acontecimientos moleculares que se observan durante el crecimiento celular son complejos y consisten en un despliegue creciente de moléculas y vías intercelulares. En general, hay cinco esquemas de señalización intercelular: autocrina, paracrina, yuxtacrina, intracrina y endocrina, según la distancia a la que actúan las señales.

-Señalización autocrina: Las células responden a las moléculas de señalización que ellas mismas sintetizan y secretan. Hay varios factores de crecimiento (o citocinas) de tipo polipeptídico que pueden actuar de esta manera.

-Señalización paracrina: Una célula produce sustancias que actúan sobre células diana histogenéticamente diferentes, situadas en su inmediata proximidad. La estimulación paracrina es frecuente durante la curación de las heridas y su reparación por tejido conjuntivo, donde un factor elaborado por cierta clase de células (por ejemplo, un macrófago) influye sobre el crecimiento de las células adyacentes que generalmente, pertenecen a otra clase distinta (por ejemplo, un fibroblasto).

-Señalización yuxtacrina: Un factor de crecimiento anclado en la membrana de una célula estimula a otra célula adyacente.

-Señalización intracrina: Ocurre cuando un factor de crecimiento se une a un receptor intracelular y es activo biológicamente sin salir de la célula.

-Señalización endocrina: Las hormonas son sintetizadas por las células de los órganos endocrinos y actúan sobre células diana que están muy alejadas del sitio donde fueron elaboradas, siendo habitualmente transportadas por la sangre.

2.- RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR IMPLICADOS EN LOS FENÓMENOS DE CRECIMIENTO.

El crecimiento celular comienza por la unión de un producto de señalización, que casi siempre es un factor de crecimiento, a un receptor específico. Las proteínas del receptor pueden estar situadas en la superficie de la célula diana, en su citoplasma o en el núcleo. La proteína del receptor posee especificidad para unirse a determinados ligandos, y el complejo receptor-ligando resultante pone en marcha una determinada respuesta celular. Al unirse al ligando, dichos receptores emiten señales que se dirigen hacia el núcleo por distintas vías. Algunas de esas vías de transmisión son más o menos

exclusivas de una determinada familia de receptores, mientras que otras son vías compartidas. En la superficie celular hay tres clases de receptores que son importantes para el crecimiento celular (140):

-Receptores con actividad intrínseca cinasa: Ocupan una región extracelular destinada a unirse al ligando y una región citosólica que puede tener actividad tirosinacina o, con menos frecuencia, serina/treonina. El EGF, el FGF y el PDGF se unen a los receptores que poseen actividad intrínseca tirosinacina. La autofosforilación del receptor da lugar a la aparición de sitios capaces de unirse a una serie de proteínas citosólicas con regiones src de homología 2 (SH2), que van reuniéndose con los residuos de tirosina fosforilada en el lugar ocupado por el receptor activado. Esas proteínas citosólicas son varias proteínas adaptadoras, que conectan al receptor con la vía de señalización *ras*, los componentes de la vía de la fosfoinosítido-3-cinasa, la fosfolipasa C- γ de la vía de la PKC y los miembros de la familia *src* de las tirosinacinasas. En total, estos cuatro sistemas generan a su vez una cascada de respuestas que, en último término, obligan a la célula a incorporarse a la fase S del ciclo celular.

-Receptores sin actividad catalítica intrínseca: Tienen una porción extracelular dispuesta a unirse al ligando; ocupan una sola región que atraviesa la membrana y una porción citosólica que se asocia directamente y activa a una o más tirosinacinasas de las proteínas del citosol, las cuales, a su vez, fosforilizan al receptor. Como los receptores de muchas citocinas pertenecen a esta clase, a veces se designa a este grupo de receptores con el nombre de superfamilia de receptores de las citocinas.

-Receptores ligados a las proteínas G: Desempeñan varias funciones importantes relacionadas con la regulación del crecimiento celular. Por ejemplo, los receptores de las quimiocinas inflamatorias y de ciertas hormonas, como la epinefrina y el glucagón, pertenecen a esta clase. Al unirse al ligando, se activa una señal que se transmite al complejo de las proteínas G que, a su vez, activa a un sistema efector que produce segundos mensajeros intracelulares que, en última instancia, aumentarán la concentración citosólica de Ca^{++} .

3.- SISTEMAS DE TRANSMISIÓN DE LAS SEÑALES.

Sirven para identificar a las señales extracelulares y transformarlas en intracelulares, y producir respuestas celulares específicas. Los sistemas de transmisión de señales se disponen normalmente en forma de redes de proteínas cinasas sucesivas. Entre las que intervienen en la regulación del crecimiento celular, las más importantes son: las

proteínas activadas por mitógenos (quinasas-MAP), la fosfoinosítido-3-quinasa, la vía de los inositol-lípidos, la vía del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), el sistema de señalización JAK/STAT (quinasas de Janus/proteínas transmisoras de señales y activadoras de la transcripción) y el sistema de quinasas del estrés.

El sistema de quinasas-MAP es especialmente importante en la señalización de los factores de crecimiento. La unión del ligando a la tirosinquinasa del receptor da lugar a la autofosforilación del receptor y a la unión con las proteínas del adaptador, como la GRB2 y la SOS, lo que produce la activación de la proteína Ras. La proteína Ras pertenece a la superfamilia de proteínas de la guanosina trifosfatasa (GTPasa), que pasa de la forma activa a la inactiva y viceversa. La proteína Ras inactiva se encuentra unida al guanósido difosfato (GDP), que se convierte en GTP, su forma activa, y esto pone en marcha una cascada de reacciones en las quinasas distales que acaba provocando cambios en la expresión de los genes. La activación del Ras es contrarrestada por otra proteína activadora de la GTPasa llamada GAP (*GTPase activating protein*), que desvía al Ras hacia la forma inactiva de GDP. El Ras activado se une a otra proteína, la Raf, que se une y fosforila a la MEK, un miembro de la familia de las quinasas llamadas en conjunto quinasas-MAP. La última quinasa-MAP (ERK) penetra en el núcleo y fosforila ciertos factores de transcripción, como el c-jun y c-fos, que, a su vez, activan la expresión de los genes. El resultado final de esta vía es la activación de una cascada de fosforilación de las proteínas, que aumenta la potencia de la señal y estimula a las células quiescentes a incorporarse al ciclo de crecimiento (140).

La vía de la fosfoinosítido-3-quinasa produce mediadores lipídicos asociados como el fosfatidilinositol-3,4-difosfato, que actúa como un segundo mensajero reclutando y activando a una serie de quinasas intracelulares. La activación de estas quinasas provoca unas respuestas celulares que guardan relación con la supervivencia celular, como ocurre con la fosforilación de la quinasa 3 de la glucógeno sintasa y el aumento de la síntesis de glucógeno (140).

El sistema de señalización inositol-lípidos puede acoplarse a los receptores de la tirosinquinasa o de proteínas G, y produce la activación de una proteína G (G_o o G_q) que, seguidamente, activa a la fosfolipasa $C\gamma$. Esta, a su vez, desdobla al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y en 1,3-diacilglicerol (DAG) (219). Después, el IP_3 se extiende por el citoplasma y se asocia a los canales del Ca^{++} sensibles al IP_3 de la membrana del retículo endoplásmico, liberando el Ca^{++} almacenado. El DAG y el Ca^{++} activan también a la PKC, la cual fosforiliza entonces a diversos componentes celulares que son importantes para el crecimiento y el metabolismo celular.

La unión de las hormonas, como la epinefrina y el glucagón, o de las quimiocinas a los receptores de siete tramos está acoplada, gracias a las proteínas G, a la activación de la adenilato ciclasa y a la obtención del AMPc como segundo mensajero. Al aumentar las concentraciones de AMPc se activa la proteínkinasa A que, a través de una serie de pasos intermedios, estimula la expresión de los genes diana (220).

4.- LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

Los sistemas de transmisión de señales trasladan la información al núcleo, donde la regulación de la expresión de los genes experimenta ciertos cambios. Esta regulación se efectúa con frecuencia sobre la transcripción de los genes, que está controlada por factores reguladores conocidos como factores de transcripción, y cuyo papel es esencial para controlar el crecimiento celular. Los factores de transcripción presentan una estructura modular formada por «dominios» o regiones, entre los que se encuentran las porciones destinadas a unirse al ADN y las encargadas de regular la transcripción (región reguladora). La región de unión al ADN permite que el factor se fije específicamente a unos motivos o secuencias del ADN (221). La región reguladora permite que la proteína aumente la transcripción (dominio de activación) o la disminuya (dominio de represión). Los factores de transcripción son fosforilizados por unas cinasas específicas proximales, y esa fosforilización puede modificar la localización del factor de transcripción o su afinidad por el ADN (222).

Entre los factores de transcripción que regulan la proliferación celular se encuentran varios protooncogenes (c-myc), y genes de supresión tumoral (o antioncogenes), como el p53 y el gen del retinoblastoma. Los factores de transcripción también intervienen en la regulación del propio ciclo celular.

5.- CICLINAS, CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS Y PUNTOS DE CONTROL. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO.

Existen dos clases de controles moleculares que regulan el paso de las células por cada fase del ciclo celular y organizan los fenómenos de multiplicación celular: una cascada de vías de fosforilización de las proteínas, en donde interviene un grupo de proteínas llamadas ciclinas, y una serie de puntos de control, que vigilan la ejecución completa de los fenómenos moleculares y, si es necesario, retrasan el paso a la siguiente fase del ciclo.

Cuando las células se incorporan y avanzan a lo largo del ciclo celular son controladas por variaciones en los niveles y grado de actividad de las ciclinas. Algunas ciclinas (las llamadas A, B y E) alcanzan su máxima concentración en ciertas fases del ciclo celular y luego se degradan rápidamente cuando las células pasan a la fase siguiente del ciclo. Las ciclinas realizan sus funciones formando complejos con un grupo de proteínas expresadas estructuralmente, que se llaman cinasas dependientes de ciclinas (223). Cada paso importante del ciclo celular se asocia a distintas combinaciones de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas. Después de ese paso, las ciclinas implicadas se degradan por la vía de la ubiquitina-proteasoma. Además de su síntesis y degradación, los complejos activos de cinasas dependientes de ciclinas son regulados por medio de su unión a ciertos inhibidores, como el p21 y p27, y por otras cinasas y fosfatasas (140).

Los puntos de control representan un segundo modelo de regulación del ciclo celular y proporcionan un mecanismo de vigilancia, que asegura el cumplimiento de los pasos esenciales y que los fenómenos importantes se lleven a cabo con toda fidelidad. Los puntos de control permiten detectar la existencia de problemas en la replicación del ADN, reparación del ADN y separación de los cromosomas (140). Cuando los puntos de control se activan, por ejemplo por un ADN dañado o con replicación insuficiente, surgen señales que detienen la maquinaria del ciclo celular. Al retrasar el ciclo celular, los puntos de control dan tiempo para que se produzca una reparación y para que disminuyan las posibilidades de una mutación. Los sistemas de control consiguen detener el ciclo celular, bien estimulando las vías inhibitoras, o bien inhibiendo las vías activadoras.

La otra cara de la moneda del control del crecimiento celular es la inhibición del crecimiento. Durante decenios, basándose en la observación de que las poblaciones de células *in vitro* o *in vivo* son capaces de reducir el crecimiento de otras poblaciones, se ha sospechado que existían señales inhibitoras del crecimiento que mantienen la integridad de un tejido. La inhibición por contacto que se produce en el crecimiento de los cultivos confluentes es una manifestación de esa inhibición del crecimiento. Los mecanismos moleculares que inhiben el crecimiento se parecen a los que lo estimulan y se entrecruzan durante sus intercambios intercelulares. Un buen ejemplo de un sistema de señalización inhibitor del crecimiento es el del TGF β .

6.- FACTORES DE CRECIMIENTO.

Los factores de crecimiento son proteínas que controlan la proliferación celular y modulan múltiples funciones celulares a través de la unión a receptores específicos y de alta afinidad, presentes en la superficie de la membrana plasmática de sus células diana. Pueden ejercer su acción a través de diferentes mecanismos, pero la mayoría actúan por un mecanismo autocrino y/o paracrino. Estos factores ejercen sus funciones biológicas a concentraciones extremadamente bajas (nanogramos/ml). Algunos de ellos actúan sobre diferentes clases de células, mientras que otros son bastante específicos de algunas de ellas (140).

Los factores peptídicos de crecimiento fueron descubiertos en un principio debido a su capacidad para estimular la mitosis de células en reposo, en un medio de cultivo desprovisto de suero. Este hecho distingue a los factores de crecimiento de elementos esenciales, cofactores, y nutrientes, los cuales son necesarios, pero no suficientes para iniciar la división celular en células en reposo (148).

A pesar de que la mayoría de los factores de crecimiento estimulan la proliferación celular, se han descrito algunos que la inhiben o que presentan actividades que no tienen relación con el crecimiento celular. Actualmente el término “factores peptídicos reguladores” sería más apropiado, a la vista de los múltiples efectos que estos factores desempeñan sobre la diferenciación, locomoción, motilidad y contractilidad celular, estimulación o inhibición de la síntesis de proteínas específicas (efectos que pueden ser tan importantes para reparar y curar las heridas como la estimulación del crecimiento), así como por su influencia en la supervivencia de la célula y en el comienzo del envejecimiento celular.

En un intento de simplificar las cosas, los factores del crecimiento se han agrupado en familias que englobarían factores con estructura y/o función similar. Los dos factores de crecimiento más importantes en el proceso cicatricial, dado su poder de inducción de fibrosis son el TGF β y el PDGF. También tienen interés el FGF, TNF α , IL-6, IL-1 y los IF.

6.1.- FACTOR TRANSFORMADOR DEL CRECIMIENTO (TGF) Y FACTORES AFINES.

El TGF consta de las tres isoformas principales del TGF β (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3) y de otros factores (140). Este factor es elaborado por la mayoría de las células del tejido de granulación. Las tres isoformas son expresadas por los fibroblastos conjuntivales *in vitro*, pero únicamente el TGF β 2 ha sido identificado *in vivo* en el estroma conjuntival y es el factor de crecimiento más importante que participa en la fibrosis inflamatoria.

El TGF β funciona como un factor tanto inhibidor como estimulador. El TGF β es inhibidor del crecimiento de la mayoría de las células epiteliales mantenidas en cultivo. Sus efectos sobre los fibroblastos y las fibras musculares lisas dependen de la concentración y de las condiciones del cultivo. A concentraciones bajas, este factor estimula la síntesis y la secreción del PDGF y, por tanto, favorece indirectamente la mitosis. A elevadas concentraciones, inhibe el crecimiento, debido a su capacidad para impedir la expresión de los receptores del PDGF. El TGF β estimula también la quimiotaxis de los fibroblastos y la producción de colágeno y fibronectina por las células, al mismo tiempo que inhibe la degradación del colágeno, disminuyendo las proteasas y aumentando los inhibidores de las proteasas, y reduce la degradación de la MEC por parte de las metaloproteinasas. Además, el TGF β posee también acción quimiotáctica sobre los monocitos y produce angiogénesis *in vivo*. Todas estas acciones favorecen la fibrogénesis, y cada vez hay más pruebas de que el TGF β participa en el desarrollo de la fibrosis en varios procesos inflamatorios crónicos. El TGF β , alterando el funcionamiento de los factores de transcripción y de las proteínas que controlan el ciclo celular, inhibe el paso a la fase S del ciclo celular. A nivel experimental el TGF β se ha mostrado como un potente inductor de la proliferación, migración y producción de colágeno por los fibroblastos de cápsula de Tenon (224) y, recientemente, Cordeiro (58) ha determinado la potencial utilidad en la cirugía filtrante del glaucoma de un anticuerpo específico dirigido contra el TGF β .

6.2.- FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS (PDGF).

El PDGF es secretado en tres isoformas (AA, AB y BB) que poseen actividad biológica (225). Se acumula en los gránulos α de las plaquetas y se libera durante su activación. También pueden producirlo los macrófagos activados, células endoteliales, células epiteliales, linfocitos T, fibroblastos y las fibras musculares lisas, además de muchas células tumorales.

El PDGF *in vivo* es el factor quimiotáctico más potente para macrófagos y fibroblastos (induce la migración y proliferación de fibroblastos), promueve la producción de las fibras musculares lisas, y posee también otras propiedades proinflamatorias. Los animales transgénicos con déficit de las cadenas A o B del PDGF albergan células conjuntivas cuya migración y proliferación son defectuosas, indicando que el PDGF tiene un papel especial en estos procesos (140). En modelos animales experimentales de cicatrización cutánea *in vivo*, el PDGF estimula el aumento de tejido de granulación, e *in vitro*, estimula la proliferación fibroblástica, incluidos los fibroblastos de cápsula de Tenon (226).

6.3.- FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF).

La familia del FGF incluye al menos 18 factores entre los que se encuentran el FGF ácido (FGFa o FGF1) y el FGF básico (FGFb o FGF2) (140). El FGF liberado puede asociarse al heparán sulfato en la MEC, que sirve de reservorio de los factores de crecimiento que controlan la proliferación celular. Al FGF se le atribuye la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) tanto *in vivo*, como *in vitro*, e interviene en la reparación de las heridas. El FGF parece jugar un papel fundamental en el proceso de cicatrización. El FGF estimula la migración de los macrófagos, la proliferación de la mayoría de las células involucradas en la cicatrización tanto *in vivo*, como *in vitro*, incluyendo células del endotelio vascular, fibroblastos, queratinocitos, y algunas células especializadas como condroblastos y miofibroblastos. Además, el FGFb induce la migración celular, la neovascularización y la formación de tejido de granulación en modelos animales. Muchas de las células que responden al FGF son capaces además de sintetizarlo. Los fibroblastos, astrocitos, células del endotelio vascular, células musculares lisas, condrocitos y osteoblastos producen FGF en cultivo (227). El KGF, a diferencia de los FGFs, se ha encontrado sólo en los fibroblastos.

6.4.- OTROS FACTORES DEL CRECIMIENTO IMPLICADOS EN LA CICATRIZACIÓN.

El VEGF estimula la angiogénesis en el cáncer, los procesos inflamatorios crónicos y la curación de las heridas (140). El EGF y el TGF α estimulan la replicación de fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y la angiogénesis. *In vitro*, el VEGF produce la mitosis de diversas células epiteliales y fibroblastos.

El FNT α estimula la proliferación de fibroblastos de cápsula de Tenon, la producción de glucosaminoglicanos y colagenasa, y la angiogénesis.

Aunque las citocinas desempeñan funciones importantes como mediadoras de la inflamación y de las respuestas inmunitarias, estas proteínas pueden clasificarse dentro del gran grupo funcional de los factores polipeptídicos del crecimiento pues, muchos de ellos, cumplen funciones favorecedoras del crecimiento en distintas clases de células. La IL-1 y la IL-6 estimulan la proliferación de fibroblastos de cápsula de Tenon *in vitro*.

Los IF son inhibidores de la cicatrización ya que inhiben la síntesis de colágeno sin afectar la proliferación fibroblástica. Recientes estudios han demostrado el efecto beneficioso de la inyección subconjuntival intraoperatoria y postoperatoria de IF α en la cirugía filtrante al reducir la respuesta cicatricial (228).

D.- CULTIVOS CELULARES EN EL ESTUDIO DE LA CICATRIZACIÓN.

1.- UTILIDAD DE LOS CULTIVOS CELULARES EN EL ESTUDIO DE LA CICATRIZACIÓN.

Los modelos de cirugía filtrante en animales de experimentación (principalmente en los primates y en el conejo) han proporcionado la posibilidad de estudiar el patrón de cicatrización en esta localización tan específica e investigar la aplicación de drogas sistémicas y tópicas. Sin embargo, en el modelo *in vivo* resulta difícil distinguir y cuantificar con exactitud qué poblaciones celulares y qué funciones y/o estructuras celulares se ven alteradas por la acción de estas drogas. La investigación *in vitro* con fibroblastos oculares puede superar estas limitaciones, aportando nuevos datos que mejoren las condiciones de posteriores estudios *in vivo* y permitan una mejor comprensión de sus resultados.

El cultivo de fibroblastos ha servido como modelo del comportamiento de éstos en unas condiciones que, sin ser las ideales, son aproximadas a la realidad. Las principales diferencias entre el comportamiento de fibroblastos en cultivos e *in vivo* dependen de (211):

- La disociación de una geometría tridimensional y su propagación en un sustrato bidimensional.
- La pérdida de las interacciones celulares entre células de un mismo tejido y con células de diferente tipo (en general en los cultivos proliferan una o dos líneas celulares).
- El aumento de la motilidad celular y, en muchos casos, aumento de la fracción celular proliferante.
- El ambiente del cultivo no contiene todos los factores locales y generales (nerviosos y endocrinos) que intervienen en la regulación del metabolismo celular en el ser vivo.
- La modificación en las vías energéticas celulares, con aumento de la glicólisis y reducción de la energía generada por el ciclo de Krebs.

A pesar de dichas diferencias, muchas de las funciones celulares especializadas se manifiestan con claridad en el cultivo. Esto ha permitido estudiar *in vitro* los diferentes mecanismos de la reparación tisular en los que el fibroblasto está implicado:

- Capacidad contráctil del fibroblasto: El cultivo se realiza en un medio permeabilizado con glicerol. Cuando se le añade una solución de ATP con cofactores metaloides se observa que las células se encogen, es decir, se contraen. Tras la adición de ATP, y como resultado de la contracción celular, los filamentos ricos en actina se pueden observar como

agregados compactos debido al mecanismo de desplazamiento de los filamentos de actina-miosina (175).

-Motilidad celular: Según el método descrito por Harris (173) en 1981, se sitúa el fibroblasto sobre una superficie formada por una delgada capa de silicona polimerizada. Los fibroblastos no muestran fibras de estrés ricas en actina en las primeras 24 horas, si bien a las 48 horas ya se evidencia su presencia en el citoplasma celular. La movilidad celular da lugar a un arrugamiento de la superficie de silicona al generar unas fuerzas de tracción en ausencia de fibras de estrés. Cuando éstas cesan, desaparece el arrugamiento de la superficie y aparecen las fibras de estrés citoplasmáticas. De este modo, se puede objetivar si existe una movilidad celular propia. Daniels y Cordeiro estudiaron el efecto de diferentes drogas y anticuerpos específicos en la migración de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon a través de membranas porosas. Estas membranas pueden estar formadas por materiales diferentes y con porosidad variable (policarbonato con poros de 0,3-0,8 μm , AnoporeTM con poros de 0,02 μm , etc) (58, 61, 229). La cuantificación del movimiento puede realizarse mediante el análisis de las huellas producidas por la fagocitosis celular en su desplazamiento por placas recubiertas de oro coloidal (230), mediante la medición del desplazamiento celular sobre superficies de cultivo recubiertas de un gel de agarosa (68), o mediante el estudio de la invasión de filtros recubiertos con Matrigel[®] u otros componentes de la MEC implantados en la placa de cultivo (231). Saika y Wong estudiaron la migración fibroblástica en distintos modelos de lesión en monocapas celulares confluentes mediante fotografías seriadas (64, 67, 232).

-Contracción de la herida y de la cicatriz: Según el modelo de Bell, se colocan los fibroblastos sobre una rejilla de colágeno de 800 nm, para estudiar la interacción del colágeno y los fibroblastos en una matriz similar a lo que sería la dermis. Los fibroblastos se sueltan de la matriz base mediante tripsina y se mezclan en una placa de Petri con el medio de cultivo, que contiene suero y colágeno nativo. El colágeno se polimeriza y atrapa las células en una matriz colágena. Los fibroblastos experimentan una reducción directamente proporcional al número de células e inversamente proporcional a la concentración de colágeno. Durante la contracción de la rejilla los fibroblastos se hacen más alargados. Si se aumentan los niveles de AMPc tienden a redondearse y su contracción es menos eficaz. En las primeras 24 horas, los filamentos de actina son una estructura filamentosa. A las 48 horas, aparecen algunas fibras de estrés y disminuye el tamaño de la rejilla hasta 50 nm, a las 96 horas vuelve a disminuir a 30 nm, siendo las fibras de estrés claramente prominentes. En la fase de contracción rápida las células son alargadas y con pocas fibras de estrés, durante la contracción lenta habían aumentado considerablemente su número. Así se demuestra que los fibroblastos son los responsables

de la contracción (204). Una variante es el “equivalente dérmico”, diseñado por Genever (233) en fibroblastos de piel. En este modelo los fibroblastos no se siembran directamente sobre una placa de cultivo, sino sobre una matriz de colágeno (en la que se efectúan pequeñas perforaciones), intentando reproducir *in vitro* una estructura similar a la dermis, en la que poder estudiar la influencia de las interacciones de los fibroblastos con la matriz de colágeno.

-Proliferación y viabilidad fibroblástica: Los métodos más utilizados para determinar la viabilidad y proliferación celular incluyen el estudio de la síntesis de ácidos nucleicos, mediante la medición de la radioactividad producida por la incorporación de nucleósidos radiactivos, como la timidina- ^3H al ADN (54) o de la 5-bromo-2'-deosiridina (BrdU)* al ARN, o el test lisosómico de la hexosaminidasa (N-acetil- β -D-hexosaminidasa) (234). En los últimos años se han utilizado diferentes sales de tetrazolio (MTT, XTT, MTS) para cuantificar la viabilidad y proliferación celular (235). Las sales de tetrazolio son metabolizadas a formazán por las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas contenidas en el cultivo. El formazán puede cuantificarse mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda apropiada. El agente más novedoso de este grupo y que reúne las mayores ventajas por su fácil manejo, precisión y rapidez es el WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno disulfonato (236).

-Adhesividad fibroblástica: Los modelos de estudio de la adhesividad son muy variados. La inhibición de la vitroadhesión puede estudiarse adicionando las células junto con el agente a estudiar y cuantificando posteriormente el efecto mediante observación microscópica o con diversos métodos de cuantificación celular (42, 237). También puede estudiarse la adhesividad de forma indirecta por el análisis de las moléculas implicadas en los fenómenos de adhesividad celular (integrinas, moléculas de adhesión celular, cadherinas, etc) (238).

-Síntesis proteica: Mediante técnicas de ELISA puede detectarse la síntesis de componentes de la MEC por los fibroblastos de cápsula de Tenon en cultivo, como hialuronato (239), colágenos tipo I y III (240), etc.

-Capacidad autocrina: Mediante técnicas de RCP y *southern blot* puede demostrarse la síntesis de factores de crecimiento por fibroblastos de cápsula de Tenon en cultivo, como el FGFb, TGF β 1, PDGF, etc (241).

Del mismo modo, los cultivos han permitido el estudio de diversas características morfofuncionales del fibroblasto que no podían ser evaluadas por otros métodos. El estudio de fibroblastos *in vitro* ha permitido también comprobar la eficacia de distintos

fármacos antimitóticos (242). Extrapolando los resultados obtenidos *in vitro* pueden estimarse datos sobre su dosificación, modo de actuación y tiempos adecuados para su administración, aunque deben tenerse en cuenta varias consideraciones (211, 243):

-La medición de la toxicidad celular *in vitro* es, en general, un acontecimiento celular aislado y no una respuesta de un tejido en conjunto.

-En el tejido *in vivo* existirán diferencias en cuanto al tiempo de exposición y concentración del fármaco, y la penetración, metabolismo y eliminación tisulares.

-La aplicación sistémica de sustancias puede modificar su toxicidad tras su metabolismo hepático.

En oftalmología, el estudio *in vitro* de fibroblastos humanos ha permitido evaluar el potencial antiproliferativo de diversas drogas o agentes físicos con vistas a su aplicación futura en la cirugía filtrante del glaucoma. Estos experimentos permiten determinar la existencia o no de dicho potencial antiproliferativo, el rango de concentraciones al cual se desarrolla dicho efecto, estudiar los posibles mecanismos implicados y la aparición de alteraciones estructurales en el fibroblasto (42, 47, 49, 50, 52, 54, 55, 57, 58, 238, 244-247).

2.- MODELOS DE LESIÓN *IN VITRO*.

La necesidad de investigar los sucesos que acontecen a nivel celular en el proceso de cicatrización ha conducido al desarrollo de sistemas celulares aislados o cultivos de células aisladas que pueden crecer en una monocapa.

Los modelos de reparación *in vitro* utilizados consisten básicamente en la producción de lesiones en cultivos de células en monocapa. La mayoría de las células de vertebrados mantenidas *in vitro*, crecen desarrollando monocapas celulares. Cuando las células se introducen en frascos que contienen un medio de cultivo tisular, éstas se adhieren a la superficie, se extienden y se dividen. La adhesión intercelular y a la superficie de cultivo está mediada por glucoproteínas de adhesión, situadas en la superficie celular y por Ca^{++} (211). Las cadherinas son las moléculas de adhesión dependientes de Ca^{++} que intervienen en la adhesividad intercelular de células homólogas en monocapa (212). Normalmente, el crecimiento celular continuará hasta que se haya formado una monocapa confluyente en la que las células vecinas se tocan unas a otras. En este momento, sin espacio libre en el que extenderse, las células normales dejan de dividirse y entran en fase de quiescencia, fenómeno conocido como inhibición de la división celular por contacto. Si en una monocapa de este tipo se produce una solución de continuidad, generando una

zona libre de células sobre la placa, las células de los bordes de esta zona comienzan a migrar hacia el área denudada y, posteriormente, inician la síntesis de ADN y la proliferación, de una forma comparable a la que tiene lugar *in vivo*. Estos modelos, con pequeñas variantes, se han utilizado con éxito en diferentes estirpes celulares, como células del endotelio vascular, queratinocitos, células epiteliales y fibroblastos humanos de origen ocular (64, 74-77).

Las diferencias existentes entre los distintos modelos de lesión *in vitro* radican en la forma de realizar la lesión, así como en la manera de cuantificar la capacidad de reparación de las células. La lesión en un cultivo en monocapa puede realizarse de forma mecánica, bien por rascado (67), mediante la succión de una zona circunscrita del cultivo o con una punta rotante recubierta de material plástico que se aplica momentáneamente sobre la superficie del cultivo (77) o mediante compresión de la monocapa con diversos materiales como el papel de filtro Millipore (248, 232). Una de estas variantes es el modelo diseñado por Stenn (249), en el que las células se siembran sobre una placa de cultivo en la que previamente se ha colocado una pequeña superficie de cristal recubierta por un colorante. Cuando las células del cultivo alcanzan la confluencia, se elimina una parte de la monocapa celular mediante rascado de la superficie, eliminando al mismo tiempo el colorante, de manera que se puede visualizar fácilmente el punto a partir del cual las células pueden iniciar la migración. Sin embargo, el modelo que ha sido más utilizado hasta el momento es el modelo de lesión lineal por rascado, similar al anterior pero con la diferencia de que en este último, la lesión se practica mediante el rascado directo sobre la placa de cultivo, evitando así la excesiva manipulación del cultivo. La respuesta celular puede cuantificarse de diferentes maneras. Puede medirse la distancia lineal máxima que alcanzan las células en su migración o bien, puede contarse el número de células presentes en el área denudada o en un área determinada a partir del margen de la lesión.

El patrón más frecuentemente empleado para medir la actividad antimitótica de un fármaco es la dosis inhibitoria 50 (DI_{50}) definida como la concentración de una sustancia que es necesaria para inhibir la proliferación fibroblástica al 50% en los casos con respecto a un control de células no tratadas y en un tiempo determinado (244, 250). A menudo no representa la dosis precisa para una inhibición adecuada.

E.- MODULACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN EN LA CIRUGÍA FILTRANTE DEL GLAUCOMA.

1.- ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA CICATRIZACIÓN EN LA CIRUGÍA FILTRANTE DEL GLAUCOMA.

La respuesta cicatricial, considerada de forma aislada, es el factor más determinante sobre el valor de PIO tras la realización de la trabeculectomía (251). La intensa proliferación celular, sobre todo de fibroblastos, que se produce tras la trabeculectomía puede conducir al fracaso quirúrgico. Por este motivo se han propuesto diferentes métodos que tratan de enlentecer la marcada cicatrización observada. Entre estos métodos se incluye el uso de fármacos con capacidad antiproliferativa que inhiban el crecimiento de estas células.

El uso prolongado de hipotensores oculares tópicos repercute negativamente en los resultados de la trabeculectomía (252). La explicación más aceptada sobre las razones del aumento de fracasos, mantiene que las poblaciones celulares se encuentran activadas como respuesta a la "agresión" que supone la medicación u otros estímulos irritativos (como sucede en los glaucomas inflamatorios, traumáticos, etc); la activación fibrovascular supone un mayor número, tanto de células inflamatorias como de fibroblastos. Por ello la fibrosis postoperatoria será mayor y la proliferación más rápida que en ojos no sometidos a tales factores (26, 27, 253).

La acción de los corticoides se basa en la inhibición de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂) que cataliza la liberación de prostaglandinas y leucotrienos a partir del ácido araquidónico generado en las vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (130). Los estudios de McGuigan sobre la aplicación postoperatoria de corticosteroides tópicos muestran una mejora del resultado de la cirugía filtrante en el animal de experimentación, con una mayor duración de la ampolla de filtración frente a un grupo control (217). En humanos, la acción de los corticoides, administrados de forma tópica y postoperatoria sobre la cirugía filtrante primaria, mejora significativamente sus resultados a corto y largo plazo (254). En los glaucomas denominados de alto riesgo el efecto de los corticoides no parece ser tan importante. Miller (122) y colaboradores obtienen un 57% de éxitos al año en glaucomas reintervenidos con el uso de altas dosis de prednisolona horaria durante varios meses.

El uso de antiinflamatorios no esteroideos en la cirugía filtrante del glaucoma no parece ventajoso (255).

La utilización de radiación β en un modelo de cirugía filtrante en el conejo, determinó una prolongación de la ampolla de filtración y una menor proliferación fibroblástica en el grupo irradiado aunque los valores de PIO no difirieron del grupo control (180). Khaw y colaboradores (256) observaron una inhibición mayor del 50% de la proliferación fibroblástica aplicando 3000 rads en un cultivo fibroblástico humano. Actualmente su utilización está restringida dado el riesgo de complicaciones locales, su discutida eficacia clínica, la inexactitud de las dosis precisadas y la aparición de los antimetabólicos.

Entre los agentes que interfieren la síntesis de la MEC se encuentran la D-Penicilamina y el β -Aminopropionitrilo (BAPN). La D-Penicilamina es una droga que altera la síntesis del colágeno y posee actividad antiinflamatoria. Estas propiedades hicieron pensar que el empleo de esta droga podría retardar el proceso cicatricial de la herida quirúrgica y mejorar los resultados de la cirugía filtrante. El uso de la D-Penicilamina en modelos experimentales sobre conejo y primate prolongó, en cierta medida, los resultados de la cirugía (218, 257). No obstante los resultados no fueron los esperados, ni en su uso aislado, ni combinada con otras drogas.

El BAPN causa una inhibición irreversible de la enzima lisil-hidroxilasa, responsable de la formación de puentes cruzados en las fibrillas de tropocolágeno. Su utilización en administración intramuscular y en pomada tópica produce un incremento significativo de la filtración, que persiste tan sólo ocho días tras la cirugía (258) y en cultivos de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon reduce la formación de colágeno tipo I (259).

Los agentes fibrinolíticos como el activador tisular del plasminógeno, la urokinasa y el ácido tranexámico han sido utilizados con éxito para mejorar la evolución postquirúrgica de animales de experimentación sometidos a cirugía del glaucoma (150). Su actuación en la cirugía filtrante disminuiría la aposición de fibrina en el área cicatricial, que es uno de los factores críticos en la formación y tamaño final de la cicatriz (260). Sin embargo, los resultados obtenidos en humanos son contradictorios (261).

El taxol es un agente antineoplásico que interfiere la formación y reciclaje de los microtúbulos intracelulares, elementos necesarios para el mantenimiento de la arquitectura intracelular, la migración, proliferación y contracción de los fibroblastos (262, 263). Otros agentes que alteran la formación de microtúbulos son la colchicina, vincristina, vinblastina, paclitaxel, etopósido, citocalasina B, etc (264, 265). La utilización de estos fármacos en la cirugía filtrante del glaucoma se encuentra en fase de experimentación y, en un futuro, es posible que igualen o incluso mejoren los resultados de los compuestos actualmente en uso.

2.- LOS ANTIMITÓTICOS: 5-FLUOROURACILO Y MITOMICINA C.

El grupo de los agentes antimitóticos ha sido ampliamente experimentado y utilizado en la cirugía filtrante del glaucoma. Dentro de este grupo son dos los fármacos que han demostrado una clara efectividad como coadyuvantes de la cirugía filtrante, tanto en animales de experimentación como en humanos: el 5-fluorouracilo (5-FU) y la mitomicina C (MMC).

El 5-FU es un agonista pirimidínico fluorado que actúa inhibiendo la síntesis de ADN y ARN (266). Las primeras experiencias en humanos con 5-FU fueron realizadas en pacientes, a priori, de mal pronóstico quirúrgico, obteniendo unos resultados iniciales esperanzadores (267-269). El grupo de estudio de la cirugía filtrante con 5-FU ha demostrado su utilidad en diferentes tipos de glaucoma de alto riesgo (38, 124, 270). El efecto inhibitorio del 5-FU sobre la proliferación fibroblástica ha mostrado su eficacia en el tratamiento quirúrgico de glaucomas refractarios, inflamatorios o juveniles (23, 34, 271). La consecuencia lógica fue la extensión de su uso a cirugías, en principio no complicadas, pero en las que el número de fracasos era todavía significativo, intentando además ajustar la dosis de antimetabolito (272-274).

La MMC es un antibiótico-antineoplásico que interfiere la síntesis de ADN, ARN y proteínas (275-277). Se ha usado para el tratamiento de múltiples tumores (colon, recto, pulmón, cérvix, vejiga, etc). En oftalmología el empleo de la MMC se introdujo como preventivo de la recidiva del pterigion tras su exéresis. La MMC aplicada en modelos experimentales de cirugía filtrante en conejo y primate revela una menor proliferación de los fibroblastos tras la aplicación tópica intraoperatoria o postoperatoria de MMC (278-282).

Chen introdujo en 1983 el uso de la MMC como coadyuvante de la cirugía filtrante en ojos humanos (125). Estudios posteriores han demostrado su utilidad y unos resultados más que aceptables en glaucomas de alto riesgo (283, 284).

Los efectos de la MMC sobre la proliferación y motilidad fibroblástica son similares a los obtenidos con el uso del 5-FU, dependiendo en ambos casos de la concentración y el tiempo transcurrido (285). La diferencia entre ambas sustancias radica en que las concentraciones a emplear con MMC son menores que las necesarias con 5-FU (68, 286-291).

La duración de la actividad es también mayor para la MMC. Una dosis de MMC de 0,4 mg/ml consigue una DI_{50} de, al menos, 30 días, mientras que 50 mg/ml de 5-FU consiguen el mismo efecto durante sólo 7 días (292). La MMC no afecta a la adherencia fibroblástica (244).

La comparación de los efectos clínicos de la MMC con los observados al aplicar 5-FU se muestran favorables a la primera, tanto por el efecto hipotensor, como por la menor aparición de complicaciones (280, 293). Los estudios clínicos aleatorizados que comparan la eficacia de la MMC frente al "estándar" del 5-FU, han demostrado unos mejores resultados de la MMC con menores efectos secundarios (293, 294).

Las complicaciones derivadas de la aplicación de MMC o 5-FU son similares, aunque, según refieren varios autores, su incidencia es menor con el uso de MMC (294, 295). Los defectos en la cicatrización conjuntival se presentan con una relativa frecuencia, pero son pocos los que requieren nueva cirugía (294, 295). Se ha descrito el exceso de filtración con aplanamiento de la cámara anterior (292, 296). Esta hiperfiltración puede conducir a una hipotonía persistente que, en ocasiones, puede originar una maculopatía con pérdida visual irreversible (294, 297, 298). El índice de defectos epiteliales es menor con la MMC que con el 5-FU, aunque este riesgo no desaparece en su totalidad (294). Se ha comunicado el desarrollo de neovascularización corneal con alteraciones epiteliales corneales que, en la mayoría de los casos, se autolimitaron sin tratamiento (280, 295). La penetración en cámara anterior de la MMC podría causar daños en las estructuras endoculares, siempre que la concentración fuera superior a la tolerada por cada una de esas estructuras. Es precisa una concentración superior a 1 mg/ml de MMC para provocar daño endotelial importante, siendo esta concentración lejana a la concentración terapéutica habitual (299). La infección de la ampolla de trabeculectomía y la endoftalmitis son complicaciones graves de la cirugía filtrante del glaucoma. Su incidencia era más baja antes de la introducción de estos agentes antiproliferativos. Con la utilización de estos fármacos las ampollas son típicamente avasculares y de paredes finas y frágiles, observándose una alta incidencia de endoftalmitis, con un porcentaje de hasta el 9,4% (35, 36, 278).

Otros antimetabólicos experimentados en fibroblastos subconjuntivales son el mitoxantrón, la bleomicina, la mitramicina, la daunorrubicina (244), 6-mercaptopurina, etc.

3.- NUEVAS ESTRATEGIAS EN LA MODULACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN.

Además de los fármacos comentados anteriormente, se están investigando nuevos métodos y agentes farmacológicos capaces de reducir la cicatrización postoperatoria.

La utilización de agentes inmunomoduladores es una de las estrategias terapéuticas que presentan un futuro más prometedor. Entre los agentes inmunomoduladores destaca el IF α , citoquina antifibrótica que ha mostrado su utilidad como reductor de la cicatrización

tras la cirugía filtrante. Guillies en un estudio randomizado, comparando inyecciones postoperatorias de 5-FU o IF α , no encontró diferencias en cuanto al control tensional o inhibición de la respuesta cicatricial a los dos años de seguimiento (228). Otros agentes inmunomoduladores que han mostrado su potencial antiproliferativo en fibroblastos humanos de cápsula de Tenon son el micofenolato (300), la ciclosporina (301) y la rapamicina (302).

Algunos antivirales, como el arabinósido de citosina (citarabina) (54, 303), la fluoxuridina (250), el aciclovir, la amantadina, la vidarabina o la zidovudina (54) también han sido estudiados en la cirugía filtrante y/o en cultivos de fibroblastos de cápsula de Tenon.

Algunas vitaminas y derivados vitamínicos, como el ácido ascórbico (304) y los derivados de la vitamina E (305, 306) también han demostrado su potencial como inhibidores de la proliferación de fibroblastos oculares. Otros agentes bloqueadores de la proliferación celular y de la síntesis de colágeno experimentados en fibroblastos oculares son el tranilast (307) y la genisteína (308).

Recientemente ha sido estudiada la utilidad de anticuerpos específicos bloqueantes de los factores de crecimiento. Cordeiro estudió en fibroblastos humanos de cápsula de Tenon *in vitro* el efecto de uno de los factores de crecimiento más potentes, el TGF y determinó la utilidad, tanto *in vitro*, como *in vivo*, de un anticuerpo específico dirigido contra el TGF β 2 (53, 58). También se ha experimentado con el anticuerpo monoclonal BCACT-AM y con oligonucleótidos antisentido del TGF β . Muy recientemente, han sido publicados los resultados del primer estudio clínico que ha utilizado el anticuerpo neutralizante del TGF β 2 (CAT-152) en pacientes con GPAA sometidos a cirugía filtrante del glaucoma. Se trata de un ensayo en fase I/IIa en el que se incluyeron 24 pacientes (16 casos y 8 controles) con un seguimiento de 12 meses. El tratamiento se realizó mediante cuatro inyecciones subconjuntivales de CAT-152, 100 μ g/100 μ l, inmediatamente antes y después de la cirugía, y en el primer día y a la semana tras la intervención. La reducción de los valores de PIO fue significativa a los 3 y 6 meses de seguimiento. Las ampollas presentaron una morfología difusa, no quística y no avascular, a diferencia de los que ocurre tras la administración de antimetabolitos, y no aparecieron complicaciones graves (309).

Wilkerson (47) ha obtenido buenos resultados utilizando la inmunotoxina como inhibidora de la proliferación de fibroblastos subconjuntivales *in vitro*. La inmunotoxina es un anticuerpo monoclonal activo frente al receptor de la transferrina humana. Este receptor se expresa en mayor cuantía en las células que presentan altos índices de replicación. La

inmunotoxina (10 ng/ml) consiguió reducir significativamente la proliferación fibroblástica (por encima del 90%) de los cultivos en los que los fibroblastos no habían alcanzado la confluencia y, por lo tanto, continuaban su proliferación. Este efecto antiproliferativo no fue tan significativo en monocapas confluentes de fibroblastos, cuando éstos alcanzan la inhibición de proliferación por contacto. Por lo tanto, la inmunotoxina ha demostrado una selectividad de su efecto sobre las células proliferantes *in vitro*.

Algunos fármacos ICC, como la trifluoperazina (TFP) (310-312), el diltiazem (DTZ) (42), el verapamilo (VPM) (313), algunas dihidropiridinas (42) y el mibefradil (MBF) (238) han demostrado su potencial antiproliferativo e inmunomodulador. Esta capacidad ha sido estudiada en diferentes estirpes celulares, incluidas algunas células oculares, tanto *in vitro*, como *in vivo*, en diferentes modelos experimentales de reparación tisular en animales, incluida la cirugía filtrante del glaucoma (313).

La utilización de D-penicilamina o BAPN como inhibidores de la síntesis de colágeno, ha evolucionado hacia nuevas estrategias que tratan de modular aspectos diversos del metabolismo de la MEC por diferentes mecanismos:

-Factores inhibidores de las metaloproteinasas de la MEC (enzimas implicadas en la formación y remodelación de la MEC) como el ilomastat (314).

-Anticuerpos específicos dirigidos contra las integrinas de membrana (237).

-Análogos no peptídicos de la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), que interfieren el reconocimiento de las integrinas de la membrana del fibroblasto por las proteínas de la MEC (55).

-Inhibidores de la contracción del colágeno, como la staurosporina (65).

-Agentes que regulan la transcripción genética de proteínas de la MEC, como el IF γ recombinante, que reduce la síntesis de colágeno mediante la modulación de su transcripción genética (51).

-Agentes que interfieren la síntesis de colágeno por su inhibición sobre diferentes enzimas implicadas en su síntesis (prolil-4-hidroxilasa, lisilhidroxilasa, etc), como el minoxidil (67), la mimosina, el etil-3,5-dihidroxibenzoato (64), la decorina (48), la suramina (48, 315), la pentoxifilina, la pentifilina (50), la fibrostatina C (49), el α,α -dipiridil, la 2,4-piridina dicarboxilato (69), la cis-prolina, etc.

-Inhibidores de la angiogénesis (232), como la angiostatina y la endostatina.

De forma similar a la terapia fotodinámica, se han realizado estudios con fármacos fotodinámicos o fotosensibilizantes, como el S-nitroglutation, sobre fibroblastos V79-4 de pulmón de hamster y sobre fibroblastos humanos de cápsula de Tenon *in vitro* (316).

En los últimos años, han surgido varios estudios que analizan la utilidad de los implantes de colágeno (317) o de ácido hialurónico reticulado (318) en la cirugía filtrante no perforante del glaucoma. Estos implantes pueden impregnarse previamente con sustancias antiproliferativas o su utilización puede combinarse con la aplicación de antimetabólicos.

Recientemente se han producido importantes avances en terapia molecular y biología celular, de tal forma que están apareciendo posibilidades nuevas realmente prometedoras para modular la respuesta cicatricial (152, 261, 319, 320). En un estudio reciente, Perkins utilizó terapia génica en un modelo experimental de cirugía filtrante en el conejo, aplicando intraoperatoriamente una solución con adenovirus en cuyo genoma había insertado el gen humano p-21 (rAd.p21). La proteína humana p21, codificada por este gen, inhibe la progresión del ciclo celular. Al valorar los resultados, no se detectaron diferencias significativas entre este novedoso procedimiento y la aplicación intraoperatoria de MMC (0,5 mg/ml) en cuanto a la proliferación fibrosa presente en las muestras histológicas postquirúrgicas. En este mismo estudio, el tratamiento *in vitro* de fibroblastos de cápsula de Tenon con rAd.p21 indujo una reducción dosis dependiente de la síntesis de ADN y del crecimiento celular (247). En una experiencia similar, Akimoto (321) utilizó el virus japonés de la hemaglutinación para introducir en el genoma de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon un señuelo del factor E2F. Este factor es el regulador de la expresión de múltiples genes implicados en el crecimiento celular. Con esta técnica se redujo la síntesis de ADN en el cultivo en un 29,9% y sólo un 42,7% de las células pasaron a la fase S del ciclo celular.

Estas nuevas estrategias terapéuticas nos ofrecen el potencial de una mayor seguridad, especificidad focal y mejor dosificación, ampliando así los horizontes de su aplicación clínica. Sin embargo, todavía no se conoce el valor relativo de la mayoría de estas alternativas respecto al tratamiento con MMC o 5-FU.

F.- EL CALCIO. LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO.

1.- HOMEOSTASIS DEL CALCIO. EL CALCIO EXTRACELULAR. BALANCE DEL CALCIO.

El calcio (Ca^{++}) es el cation más abundante en los vertebrados (20-30 g/kg de peso en los seres humanos) lo que supone que un organismo adulto contiene, por término medio, de 1 a 2 kg de Ca^{++} , del cual más del 98% se localiza en el hueso. El calcio de la fase mineral contenido en la superficie de los cristales óseos de hidroxiapatita ($(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$) está en equilibrio con el líquido extracelular, pero sólo una pequeña proporción del calcio total (aproximadamente el 0,5%) es intercambiable. El calcio del líquido extracelular resulta esencial para diversas funciones orgánicas y se mantiene relativamente constante. La concentración plasmática en el adulto normal es de 2,2-2,6 mM/l (8,8-10,4 mg/dl). El calcio plasmático se encuentra en tres formas diferentes: como ion libre, unido a las proteínas plasmáticas y, en menor medida, como complejos difusibles. La concentración de los iones de Ca^{++} libres es por término medio de 1,2 mM/l (4,8 mg/dl), e influye sobre muchas funciones celulares; esta concentración depende de un control hormonal riguroso, sobre todo a través de la hormona paratiroidea (PTH). La concentración de las proteínas séricas es un factor importante que determina la concentración del Ca^{++} iónico que, en su mayor parte, se encuentra unido a la albúmina.

La concentración de los iones Ca^{++} del líquido extracelular se mantiene constante por la interacción de diversos procesos que incorporan y eliminan, respectivamente, el Ca^{++} al líquido extracelular mediante su secreción al aparato gastrointestinal (100-200 mg/día), la excreción urinaria (50-300 mg/día), el depósito en forma de mineral óseo y las pérdidas por el sudor (hasta 100 mg/día). Existe una estrecha relación entre resorción y formación óseas, de forma que cada día entran y salen del esqueleto aproximadamente 12 mM (500 mg) de calcio (322).

La ingesta dietética media diaria de calcio de un adulto normal es de unos 15 a 20 mM/día (0,6-0,8 g/día). Menos de la mitad del calcio dietético del adulto se absorbe por el aparato gastrointestinal. La absorción de calcio aumenta en las fases de crecimiento rápido de los niños, durante el embarazo y la lactancia, y disminuye con la edad. La mayor parte del calcio se absorbe por el intestino delgado proximal, mientras que la absorción disminuye en los segmentos más distales del intestino. Se ha descrito tanto un proceso de absorción por transporte activo, como otro limitado de difusión; el transporte activo predomina en la parte superior del intestino, mientras que la difusión pasiva es más importante en las porciones inferiores. En cualquier caso, ambas son reguladas por la

vitamina D a través del efecto de su metabolito activo (1,25-dihidroxicolecalciferol o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). No todas las formas de calcio de la dieta se absorben por igual; probablemente, el cloruro cálcico es la sal que se absorbe con mayor eficacia (322).

El calcio se segrega a la luz del aparato gastrointestinal. Si se administran isótopos de calcio radioactivo por vía intravenosa, se detecta radiactividad en las heces, lo que permite realizar el cálculo del calcio endógeno fecal. La secreción de calcio a la luz intestinal es constante e independiente de la absorción. La eliminación urinaria de calcio en el adulto normal es, por término medio, de 2,5-10 mM/día (100-400 mg/día). Si la ingesta dietética de calcio es inferior a 5 mM/día (200 mg/día), la eliminación urinaria suele descender por debajo de 5 mM/día (200 mg/día). Sin embargo, la ingesta dietética apenas influye en la eliminación urinaria de calcio en la mayoría de los sujetos normales, dentro de unos límites bastante amplios. Por consiguiente, los sujetos que siguen dietas pobres en calcio tienden a desarrollar un balance negativo de calcio, a menos que la absorción sea absolutamente eficaz, debido a la ineficacia relativa del riñón para conservar este ion. La cantidad de calcio eliminada por la orina es diminuta, si se compara con la que filtra el glomérulo, aproximadamente 150-250 mM/día (6-10 g/día). La tasa de reabsorción del calcio filtrado es elevada. La reabsorción ocurre fundamentalmente en el túbulo proximal (aproximadamente el 60%) y en el asa de Henle (aproximadamente el 25%) y en una pequeña proporción en el túbulo distal. Se desconoce si las formas de calcio no iónicas, no unidas a proteínas (por ejemplo citrato cálcico) se eliminan con un ritmo diferente. No obstante, la eliminación urinaria de calcio se modifica por la eliminación de otros electrólitos. Así, por ejemplo, el calcio urinario suele ser proporcional al sodio urinario y el sulfuro también aumenta la eliminación de calcio (322).

El mantenimiento del equilibrio del calcio depende de la absorción intestinal. El déficit de PTH o vitamina D, las enfermedades intestinales y la carencia grave de calcio en la dieta ponen en peligro la homeostasis de calcio, que no se puede compensar adecuadamente a través de una conservación renal, observándose un balance de calcio negativo. El aumento de la resorción ósea constituye un mecanismo de protección frente al descenso del calcio en el líquido extracelular, incluidos los estados de balance negativo crónico de calcio, pero sólo a expensas de una pérdida de hueso progresiva.

2.- TRANSPORTE DE CALCIO EN LAS MEMBRANAS CELULARES.

2.1.- SISTEMAS DE TRANSPORTE DE IONES EN LAS MEMBRANAS.

Puesto que la membrana celular es esencialmente impermeable al agua y a la mayor parte de las moléculas hidrosolubles y los iones (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{++} , etc), son necesarias proteínas situadas en la membrana para transportarlas. Cada tipo de célula del organismo dispone de un grupo de proteínas transportadoras ajustado a sus necesidades de intercambio iónico y metabólico. Los tipos más importantes son los siguientes (323):

a)Proteínas canales: Transportan agua e iones específicos a favor de su gradiente electroquímico. Los canales iónicos o ionóforos son macromoléculas proteicas que abarcan todo el grosor de la membrana. Pequeños cambios de conformación de la proteína mantienen abierto o cerrado el canal, pero a abertura permite que el paso de iones sea masivo (hasta 10^8 iones/seg), lo que demuestra su elevado grado de eficiencia (324).

b)Proteínas transportadoras: Facilitan el movimiento de pequeñas moléculas: iones, aminoácidos y azúcares, sin recurrir a la utilización del ATP. A diferencia de las proteínas canales, sólo pueden fijar una o unas pocas moléculas al mismo tiempo; eso hace que la conformación del transportador se modifique y transfiera las moléculas fijadas al otro lado de la membrana con una velocidad de transporte mucho más lenta que la del canal (10^2 - 10^4 moléculas/seg). Se han identificado tres tipos de transportadores (323):

-El unitransportador transfiere una sola molécula o ion a favor de su gradiente.

-El cotransportador cataliza el movimiento de un ion o molécula contra un gradiente de concentración, en acoplamiento con el movimiento de otro ion o molécula que se mueve a favor de su gradiente de concentración y en el mismo sentido.

-El antitransportador cataliza el movimiento de un ion o molécula contra un gradiente de concentración, en acoplamiento con el movimiento de otro ion o molécula que se mueve a favor de su gradiente de concentración pero en dirección contraria.

c)Bombas asociadas a ATP: Son ATPasas que utilizan la energía liberada en la hidrólisis del ATP en ADP y fósforo inorgánico (P_i) para trasladar iones a través de la membrana en contra de su gradiente electroquímico.

El paso de Ca^{++} a través de la membrana citoplasmática y de las membranas intracelulares puede realizarse por estos tres mecanismos de transporte (323, 325, 326) (figura 7):

1) La entrada de Ca^{++} al citoplasma se realiza por:

- Canales voltaje-dependientes.
- Canales receptor-dependientes.
- Canales asociados a los depósitos intracelulares.
- Antitransportador $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (bidireccional).

2) La salida de Ca^{++} desde citoplasma se realiza por:

- Antitransportador $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (bidireccional).
- La bomba de Ca^{++} dependiente de ATP (ATPasa- Ca^{++}).

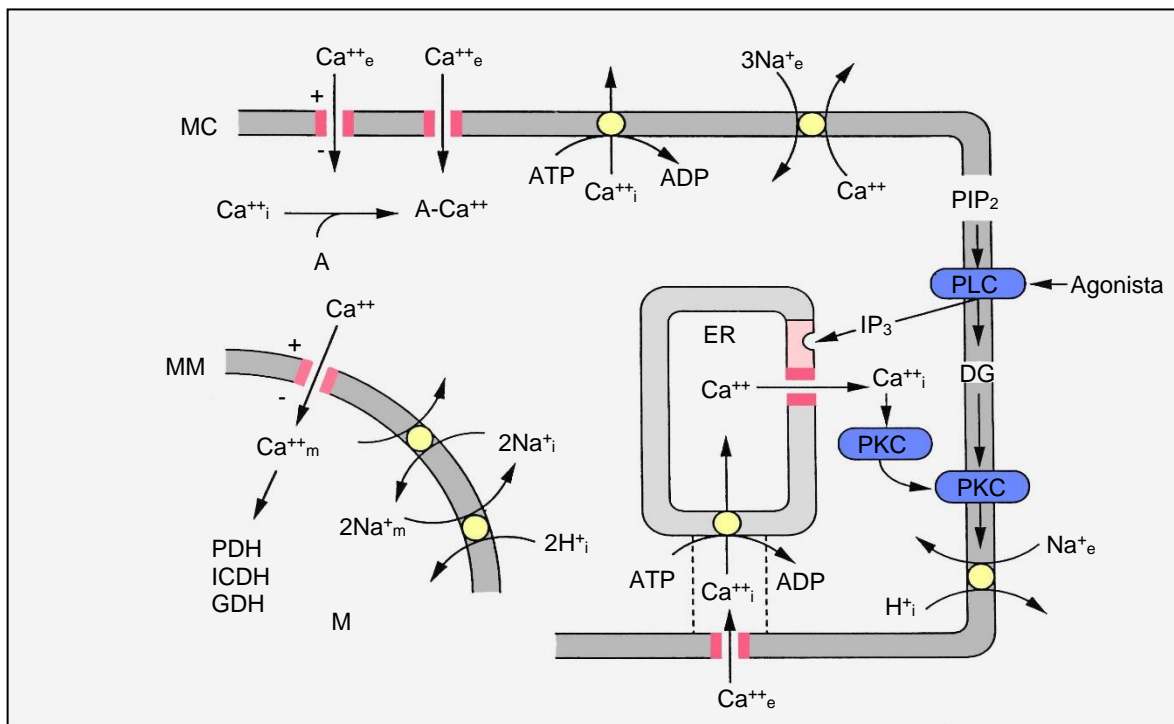


Figura 7. Homeostasis del calcio intracelular. MC: Membrana citoplasmática. M: Mitocondria. MM: Membrana mitocondrial. RE: Retículo endoplasmático. Ca^{++}_i : Calcio intracelular. Ca^{++}_e : Calcio extracelular. Ca^{++}_m : Calcio mitocondrial. Na^+_i : Sodio intracelular. Na^+_e : Sodio extracelular. H^+_i : Hidrógeno intracelular. IP_3 : Inositol trifosfato. ATP: Adenosín trifosfato. ADP: Adenosín difosfato. A: Proteínas fijadoras de calcio. PDH: Piruvato deshidrogenasa. ICDH: Isocitrato deshidrogenasa. GDH: Glutarato deshidrogenasa. PLC: Fosfolipasa C. PKC: Fosfoquinasa C. PIP_2 : Fosfolípidos de membrana.

Existen otras formas de entrada y salida de Ca^{++} a través de la membrana plasmática, cuantitativamente poco importantes y de comportamiento no bien conocido, como son:

-Los canales de Ca^{++} activados por el estiramiento mecánico o "canales de estrés" (de entrada), descritos en la membrana plasmática de fibroblastos (60).

-Las denominadas vías de filtración (*leak pathways*) de Ca^{++} (de entrada).

-Difusión pasiva de Ca^{++} a través de la membrana citoplasmática (bidireccional). Esta modalidad de entrada y salida de Ca^{++} está modulada por el potencial de membrana generado tras la apertura de determinados canales iónicos, principalmente canales de K^+ . El potencial generado es negativo y arrastra al Ca^{++} hacia el citosol. En la regulación de estos canales de K^+ pueden intervenir varios mecanismos, entre ellos las concentraciones intracelulares de otros iones. Por ejemplo, el canal de K^+ activado por Ca^{++} , también denominado canal de K^+ Ca^{++} -dependiente, se caracteriza porque su activación o apertura depende muy estrictamente de la concentración de Ca^{++} ; se activa por despolarización, pero sólo si la concentración intracelular de Ca^{++} alcanza un valor umbral (323, 326).

2.2.- CANALES DE TRANSPORTE DEL CALCIO EN LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA. LOS CANALES IÓNICOS.

Los canales iónicos permiten el flujo pasivo de iones a favor de su gradiente de concentración química, pero al estar cargados eléctricamente, también deben hacerlo a favor del gradiente eléctrico (gradiente electroquímico). Pueden clasificarse en función del ion para el que muestran permeabilidad selectiva o bien en función de los mecanismos que provocan su apertura. Un canal puede estar abierto de forma permanente, de manera que únicamente el gradiente electroquímico condiciona el paso de su ion específico, pero con mayor frecuencia los canales están cerrados y son abiertos o activados en respuesta a señales específicas:

-La despolarización o modificación del potencial transmembrana (canales dependientes del voltaje).

-La unión de ligandos extracelulares que interactúan con dominios específicos de la molécula que conforma el canal, la cual se comporta como auténtico transportador.

-La unión a elementos intracelulares generados previamente por la acción de ligandos sobre sus receptores o por el propio metabolismo de la célula, como es el caso de los segundos mensajeros, subunidades de proteínas G, ATP, etc.

-Las fuerzas mecánicas que tensionan o distienden la molécula que conforma el canal.

Los canales iónicos, además, se encuentran sometidos a influencias reguladoras que, al modificar su conformación, los mantienen en uno de estos tres estados (327) (figura 8):

-Cerrado y disponible para ser activado o canal en reposo.

-Abierto o canal activo.

-Cerrado, pero sin poder ser activado o canal inactivado o refractario.

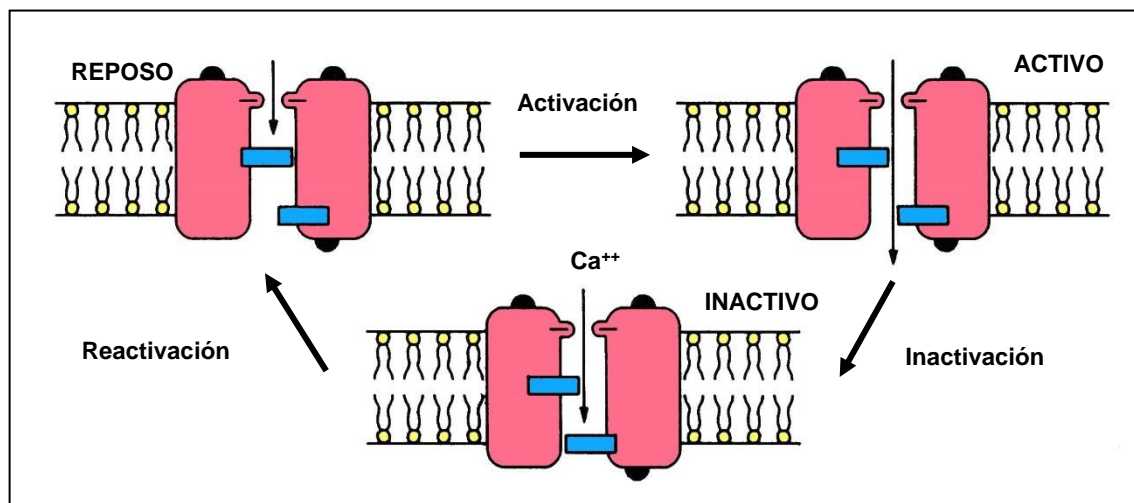


Figura 8. Estados conformacionales de los canales del calcio voltaje dependientes. Modificada de Tamargo J, Delpón E (39).

El estado refractario se debe a distintos procesos, según el tipo de canal. En el canal dependiente del receptor, el estado refractario se provoca tras exposición prolongada del receptor al ligando, proceso conocido como desensibilización. En el canal dependiente del voltaje, el estado refractario se denomina inactivación y puede estar relacionado con cambios conformacionales controlados por una subunidad o región del canal distinta de la que controla el proceso de activación o con modificaciones causadas tras el paso del ion (fijación de Ca^{++} al propio canal, desfosforilación de la proteína provocada por Ca^{++} , etc).

La selectividad del canal implica varios conceptos (323, 324):

-El tipo de estímulo que lo activa (si es un ligando, un cambio de voltaje, etc) y dentro de un determinado estímulo, qué tipo de ligandos o qué intensidad de voltaje lo abren.

-El tipo de iones que deja pasar a su través, lo cual dependerá tanto de las características del ion (carga eléctrica, tamaño y grado de hidratación) como de las del canal (estructura, tamaño y composición que condiciona la carga eléctrica de las paredes del poro).

Es necesario conocer los múltiples tipos de canales de Ca^{++} por los que el catión accede al interior de la célula para comprender cómo las células utilizan la entrada de Ca^{++} para regular las distintas funciones biológicas en las que este mensajero intracelular está implicado (326). Ello debe servir, además, para desarrollar nuevas moléculas con potencialidad terapéutica, cuyo mecanismo de acción implique la regulación de la entrada de Ca^{++} por sus distintas vías de acceso, en situaciones patológicas en las que exista una sobrecarga intracelular del catión, o en las que una reducción del Ca^{++} comporte un efecto beneficioso.

Los canales que el Ca^{++} va a utilizar para su entrada en la célula a través de la membrana citoplasmática son:

- Los canales voltaje-dependientes.
- Los canales receptor-dependientes, incluidos los canales asociados a nucleótidos cíclicos.
- Los canales asociados a los depósitos de Ca^{++} intracelulares están regulados por el nivel de relleno de los depósitos intracelulares de Ca^{++} (325, 326).

2.3.- LOS CANALES DEL CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES.

2.3.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CANALES DEL CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES.

Los canales del Ca^{++} voltaje-dependientes (CCVD) constituyen un grupo dentro de la superfamilia de canales voltaje-dependientes que también incluye a los canales del Na^+ y K^+ . Estos canales sirven para propagar potenciales de acción en células eléctricamente excitables, al tiempo que regulan el potencial de membrana y los cambios transitorios en la concentración de Ca^{++} intracelular de casi todas las células. Son canales muy selectivos para cada ion (los canales de Ca^{++} son 1000 veces más selectivos para el Ca^{++} que para otros cationes), si bien un solo canal ofrece una elevada conductancia (10^7 iones/seg). Su activación depende muy estrechamente del potencial o, lo que es lo mismo, son muy sensibles al nivel de potencial específico para cada canal (322).

2.3.2.- CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DEL CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES.

Las técnicas utilizadas para la identificación y el análisis de canales iónicos han sido muy diversas: radioligandos específicos, trasiegos de iones marcados, sondas fluorescentes, estudios funcionales y biología molecular. Nowycky, en 1985, describió tres tipos de CCVD (T, L y N) en las neuronas ganglionares de la espina dorsal del pollo (329). Actualmente mediante técnicas electrofisiológicas de *patch-clamp*, se han identificado hasta seis subtipos de CCVD: T (*transient*), L (*long lasting*), N (*neither T nor L*), P (Purkinje), Q y R, con estructuras moleculares y propiedades electrofisiológicas (cinética de apertura y cierre) y farmacológicas diferentes (tabla 1) (329-331).

Los CCVD se encuentran en la membrana celular y en membranas intracelulares de múltiples tejidos: músculo cardíaco, músculo esquelético (túbulos transversos), músculo liso, células endocrinas, células nerviosas, células gliales y, por supuesto, los fibroblastos. Los diferentes subtipos de CCVD están distribuidos de forma variable según la estirpe celular y su localización en el organismo. Los T y L se distribuyen de forma general (neuronas centrales y sensoriales, cardiomiocitos, células musculares lisas, células endocrinas, fibroblastos, etc), los N y P predominan en neuronas y células secretoras y los R se localizan exclusivamente en neuronas centrales (330).

Sus funciones y sus cinéticas de abertura y cierre son distintas, como lo es también la selectividad con que permiten la asociación de determinadas moléculas -fármacos y toxinas- que en su mayor parte bloquean el canal.

Los CCVD-T presentan unas características electrofisiológicas muy diferentes a las expresadas por el resto de CCVD. Los CCVD-T se conocen como canales de umbral bajo de activación, ya que se abren en respuesta a pequeñas despolarizaciones desde potenciales de membrana hiperpolarizados o fuertemente negativos (más allá de los -50 mV). Se inactivan rápidamente mostrando aperturas transitorias tras aplicar pulsos despolarizantes (hasta -20 mV) desde un potencial de membrana fuertemente negativo (entre -80 y -100 mV) y se reactivan lentamente. Estos canales parecen regular la actividad automática celular (nodos cardíacos y células de Purkinje) y la liberación de neurotransmisores.

Tabla 1. Clasificación y características electrofisiológicas y farmacológicas de los canales del calcio voltaje dependientes.

CANAL	L	T	N	P	Q	R
Propiedades electrofisiológicas						
Subunidades clonadas (gen cromosómico)	α_{1S} (1q31-32) α_{1C} (12p13.3) α_{1D} (3p14.3) α_{1F} (Xp11.23)	α_{1G} (17q22) α_{1H} (16p13.3) α_{1I} (22q12.3-13-2)	α_{1B} (9q34)	α_{1A} (19p13)	α_{1A} (19p13)	α_{1E} (1q25-31)
Conductancia (pS)	15-25	7-9	10-20	9-19	16	–
Umbral de activación	Alto	Bajo	Alto	Alto	Alto	Alto
Velocidad de reactivación	Rápida	Lenta	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida
Velocidad de inactivación (ms)	Muy lenta (>500)	Rápida (20-50)	Moderada (50-80)	Muy lenta	Moderada	Rápida
Rango de activación (mV)	Positivo a -10	Positivo a -70	Positivo a -10			
Rango de inactivación (mV)	-60 a -10	-100 a -40	-100 a -60			
Permeabilidad	Ba ⁺⁺ > Ca ⁺⁺	Ba ⁺⁺ = Ca ⁺⁺	Ba ⁺⁺ > Ca ⁺⁺	Ba ⁺⁺ > Ca ⁺⁺	Ba ⁺⁺ > Ca ⁺⁺	Ba ⁺⁺ = Ca ⁺⁺
Localización celular	General	General	Sobre todo neuronal	Sobre todo neuronal	Sobre todo neuronal	Sobre todo neuronal
Propiedades farmacológicas						
Activadores Isoprenalina Histamina Angiotensina II	Sensible	Insensible	Insensible			
1,4-dihidropiridinas (Nifedipino)	Sensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible
Fenilalquilaminas (Verapamilo)	Sensible	Insensible	Insensible	Insensible	–	Insensible
Benzotiazepinas (Diltiazem)	Sensible	Insensible	Insensible	Insensible	–	Insensible
Benzimidazoles (Mibefradil)	Sensible	Sensible	–	–	–	–
ω-conotoxina ω -conotoxina GVIA ω -conotoxina MVIIC	Insensible Insensible	Insensible Insensible	Sensible Sensible	Insensible Sensible	Insensible Sensible	Insensible Insensible
ω-agatoxina ω -agatoxina IVA ω -agatoxina IIIA	Insensible Sensible	Insensible Insensible	Insensible Sensible	Sensible Insensible	Sensible Sensible	Insensible Sensible
Taicatoxina	Sensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible
Calciseptina	Sensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible
Calcicludina	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Bloqueo inorgánico Cadmio Niquel	Potente Débil	Débil Potente	Potente Débil	Potente Intermedio	Potente –	Potente Potente

En contraposición, los restantes tipos de CCVD requieren mayores despolarizaciones para ser activados por lo que se les conoce como canales de alto umbral de activación, y se reactivan rápidamente. Los CCVD-L se inactivan lentamente y muestran aperturas de larga duración. Se activan cuando a una membrana que está fuertemente despolarizada (-30 mV) se aplican pulsos despolarizantes (hasta +10 ó +20 mV). Estos canales regulan el acoplamiento electromecánico vascular y cardíaco, la duración del potencial de acción, la despolarización de los nodos cardíacos y la expresión de protooncogenes (c-myc, c-fos, c-ras). Los CCVD-N se activan por potentes despolarizaciones y, al igual que los CCVD-T, requieren un potencial de membrana muy electronegativo para activarse (-80 mV). Los canales N, P y Q controlan la entrada de Ca⁺⁺ en las neuronas y regulan la liberación de neurotransmisores cerebrales y la frecuencia de las descargas neuronales.

El mejor método para diferenciar los diferentes subtipos de canales de alto umbral de activación es el estudio de sus propiedades farmacológicas. Los CCVD-L se caracterizan por su unión a pequeños ligandos sintéticos como las dihidropiridinas, el VPM y DTZ, que interactúan con el canal siguiendo un mecanismo voltaje-dependiente. Los CCVD-L en estado abierto y en estado inactivado muestran gran afinidad por estos ligandos. Estos ligandos inactivan los CCVD-L, mientras que las catecolaminas activan los CCVD-L pero no los CCVD-T o N. Los CCVD-T se bloquean por amilorida y flunarizina (39, 41, 330, 332).

Los CCVD son sensibles a diferentes cationes divalentes y a toxinas procedentes de moluscos y serpientes. La ω -conotoxina, es una toxina obtenida del veneno del caracol marino *Conus geographicus*. La ω -conotoxina GVIA bloquea los CCVD-N, pero no los T, L, P, Q o R. La ω -conotoxina MVIIC bloquea los CCVD-N, P y Q, pero no los T, L o R. La ω -agatoxina, se obtiene del veneno de la araña *Agelenopsis aptera*. La ω -agatoxina IVA bloquea los CCVD-P y Q, pero no los T, L, N o R. La ω -agatoxina IIIA bloquea los CCVD-L, N, Q y R, pero no los T o P. La taicotoxina, obtenida del veneno de la serpiente australiana *Oxyranus s. scutellatus*, y la calciseptina, obtenida del veneno de la serpiente mamba negra *Dendroaspis polylepis polylepis* bloquean únicamente los CCVD-L. La calcicludina, obtenida del veneno de la serpiente mamba verde *Dendroaspis angusticeps* bloquea todos los CCVD (333, 334).

2.3.3.- ESTRUCTURA MOLECULAR DEL LOS CCVD.

Existe un alto grado de homología entre los canales voltaje dependientes del Ca^{++} , Na^+ y K^+ , lo que sugiere que estos canales han evolucionado a partir de una proteína ancestral común (324, 328). Puesto que los canales de K^+ son los más sencillos y aparecen ya en levaduras y otros procariontes, se los considera los canales originarios. A partir de ellos surgirán los canales de Ca^{++} , que aparecen en protozoos más evolucionados, y los de Na^+ , que sólo están presentes en organismos multicelulares. Todos ellos están conformados por varias unidades proteicas que se asocian formando un complejo que abarca todo el grosor de la membrana e incluso protruye por fuera y por dentro de ella.

Los CCVD-L son heterómeros formados por glicoproteínas con un peso molecular total de 466 kD y constan de cinco subunidades denominadas α_1 , α_2 , β , γ y δ . (39, 41, 335, 336) (figura 9).

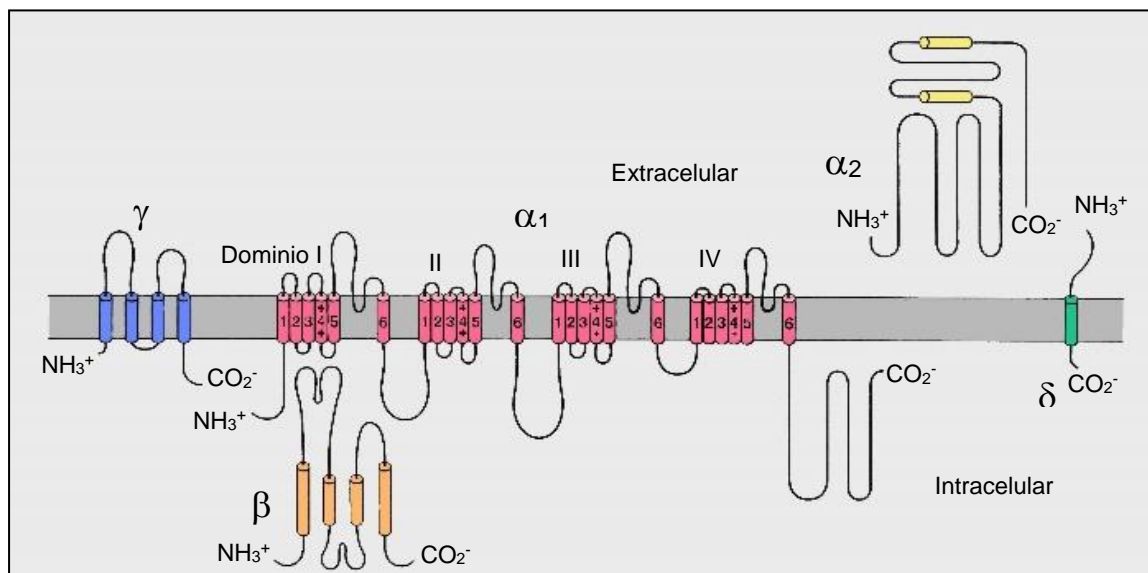


Figura 9. Canal del Ca^{++} dependiente de voltaje. La subunidad α_1 muestra los cuatro dominios o unidades básicas (I, II, III y IV). Se aprecia la colocación aproximada de las demás subunidades α_2 , β , γ y δ . Modificada de Flórez J (323).

La subunidad α_1 es una proteína glucosilada (190-250 kD) que presenta gran homología con la subunidad α del canal de Na^+ . Es la más grande e importante, y está dispuesta de tal manera que su secuencia de aminoácidos atraviesa la membrana varias veces y conforma en su interior el canal por el cual pasa el ion. Al ser transmembranal, una parte sustancial de la proteína, de carácter hidrófobo, se encuentra en la membrana en el ambiente de la bicapa lipídica, otra porción es extracelular y está ampliamente

glucosilada, y otra es citoplásmica, pudiendo sufrir modificaciones bioquímicas (por ejemplo, fosforilación por diversas cinasas) que van a regular la actividad del canal.

La subunidad α_1 presenta cuatro dominios (I-IV), cada uno de los cuales es homólogo al de los canales de Na^+ , y cada dominio, a su vez, tiene seis segmentos hidrófobos transmembranales (S1-S6), que se disponen en estructura α -helicoidal. Los segmentos S1 y S2, S3 y S4, S5 y S6 de un mismo dominio están conectados por lazos extracelulares (segmentos cortos de asociación a la membrana o SS) y los segmentos S2 y S3, S4 y S5 de un mismo dominio están conectados por segmentos intracelulares. Los segmentos IS6 y IIS1, IIS6 y IIIS1, IIIS6 y IVS1 están conectados por lazos intracelulares (figura 10). Los extremos $-\text{NH}_2$ y $-\text{COOH}$ de la molécula se encuentran a nivel intracelular. Los cuatro dominios están colocados en la membrana de tal forma que algunos de sus segmentos transmembrana miran hacia dentro y conforman la pared del canal; de este modo, cada dominio aporta un cuarto del canal. Los segmentos S5 y S6 de cada dominio están colocados alrededor del poro como las tablas o duelas de un barril. Entre los segmentos S5 y S6 se encuentra una cadena de aminoácidos hidrofóbicos, que presenta tramos extracelulares e intramembranales (SS1 y SS2), denominada asa P o H5, que se proyecta hacia la zona externa del poro conductor del canal lleno de agua y lo tapiza (figuras 10, 11 y 12) (324, 328). La subunidad α_1 contiene el poro transportador de iones, el sensor de voltaje, el aparato de activación y varios dominios para la unión de segundos mensajeros, fármacos y toxinas que intervienen en su regulación.

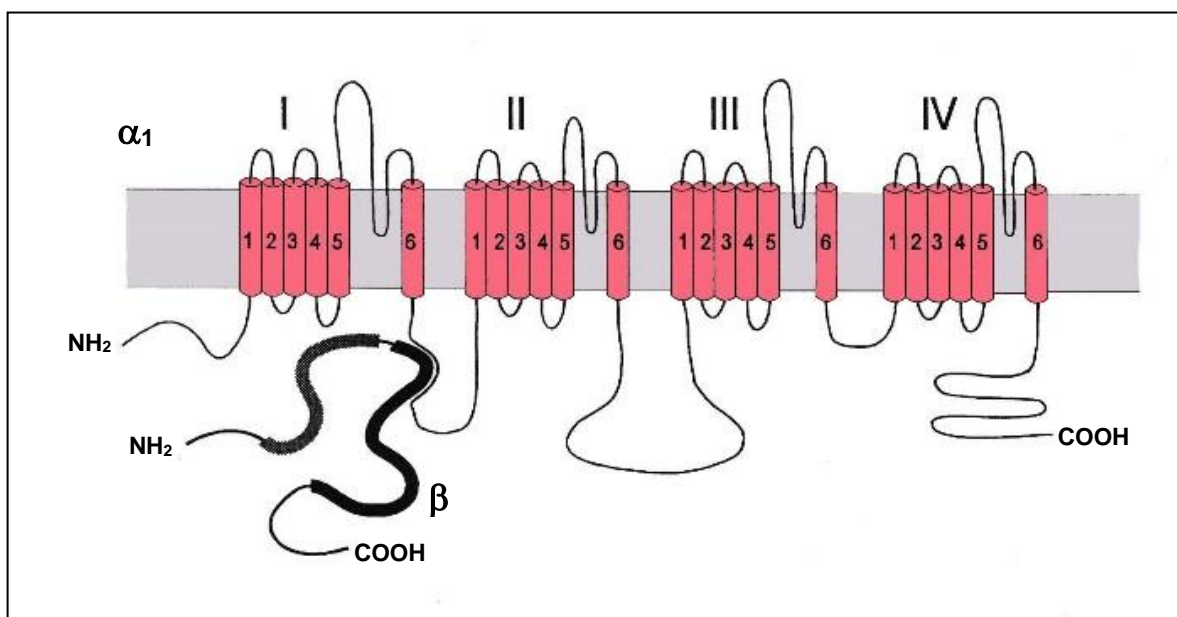


Figura 10. Canal del Ca^{++} dependiente de voltaje. Dominios de las subunidad α_1 y relación con la subunidad β . Modificada de Catterall W (324).

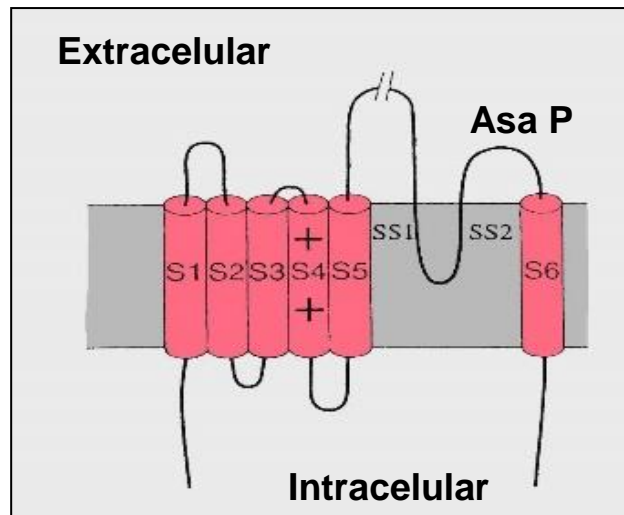


Figura 11. Canal del Ca^{++} dependiente de voltaje. Dominio de la subunidad α_1 . Segmentos S5 y S6 colocados alrededor del poro del canal y unidos por el asa P o H5. Modificada de Catterall W (324).

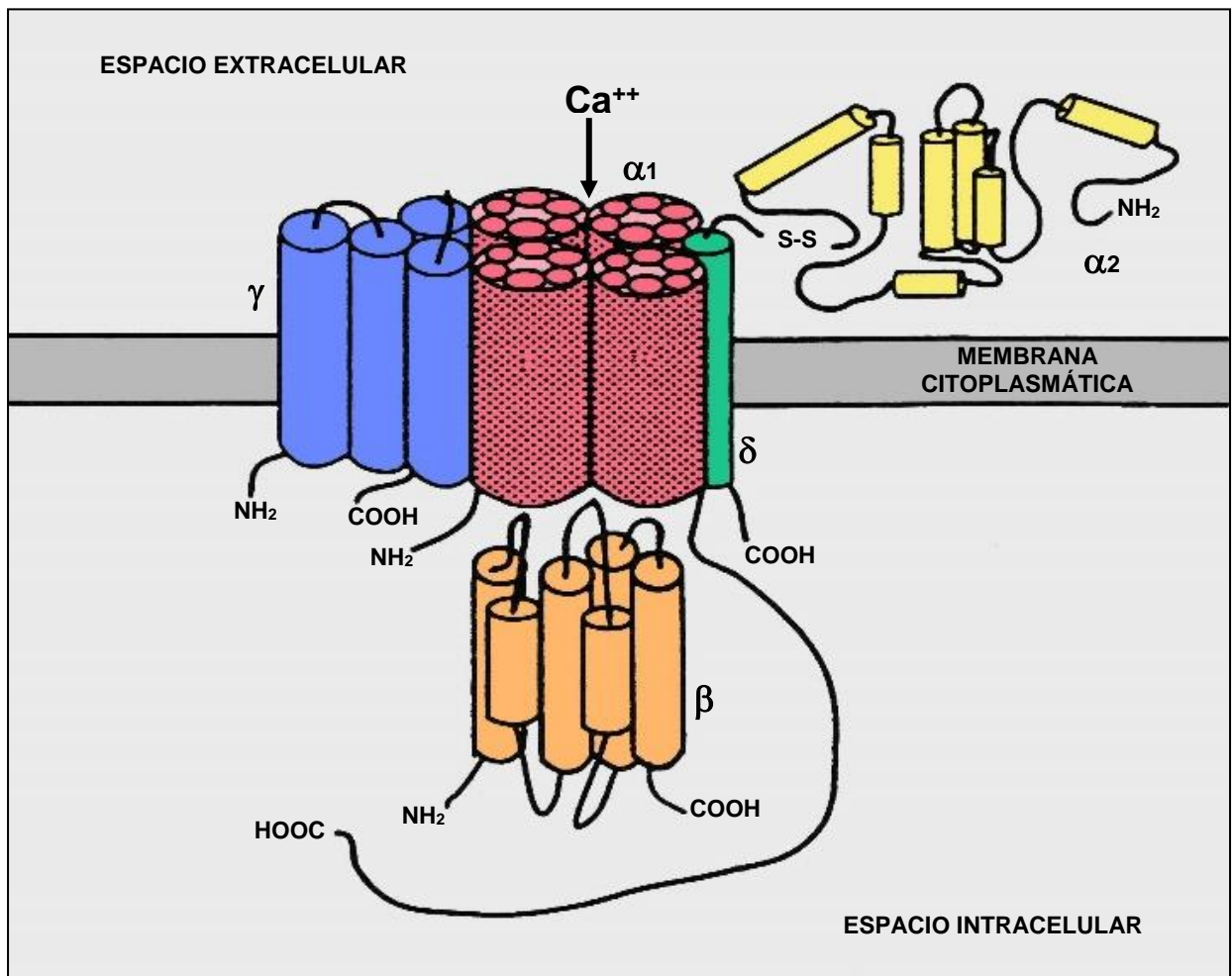


Figura 12. Canal del Ca^{++} dependiente de voltaje. Esquema de la conformación tridimensional de sus subunidades. Se aprecia la localización del poro del canal en la subunidad α_1 . Modificada de Krizanova O, Lory P, Schwartz A (339).

Han sido clonados al menos 10 genes localizados en 9 cromosomas, responsables de la codificación de 10 variantes de subunidades α_1 , que se agrupan en tres familias: la primera incluye las subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} ; la segunda incluye las subunidades α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} ; y la tercera incluye las subunidades α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} ; cada una forma parte de un subtipo de CCVD al que caracterizan funcionalmente y dentro de cada subtipo a una isoforma concreta de CCVD (331) (tabla 1).

La subunidad α_1 está unida a la subunidad α_2 (143 kD) y a la δ (27 kD), ambas también glucosiladas, por puentes disulfuro. La subunidad β (54 kD), situada en el citosol, ni está glicosilada ni tiene dominios hidrófobos y tiene puntos de fosforilación para distintas proteíncinasas. La subunidad γ (30 kD) es hidrófoba y está muy glicosilada. Las subunidades α_2 y δ están codificadas por el mismo gen. Existe similitud entre la subunidad β_1 del canal de Na^+ y la γ del canal de Ca^{++} , tanto por su tamaño como por su grado de hidrofobia y de glucosilación. Mediante técnicas de reconstitución se ha comprobado que, para que el canal funcione, basta el ensamblaje de las subunidades α_1 , β , y γ ; las otras subunidades pueden actuar como reguladoras (336).

2.3.4.- FUNCIONAMIENTO DE LOS CCVD.

Desde un punto de vista funcional los canales de Ca^{++} pueden ser considerados como poros de membrana, cada uno de los cuales posee (figura 8):

- Filtros de selectividad que permiten la entrada exclusiva del Ca^{++} .
- Dos compuertas, una de activación y otra de cierre o inactivación.
- Un sensor de voltaje que modula la cinética de las compuertas según el nivel del potencial de membrana, de forma que la despolarización de la membrana facilita la apertura del CCVD-L.
- Lugares de unión específicos para diferentes ligandos, tanto en la porción extra como intracitoplasmática.

La actividad del CCVD es controlada a escala de milisegundos por dos procesos separables:

- La activación, que controla la dependencia del tiempo y el potencial bajo la cual está sometida la abertura del canal iónico en respuesta a los cambios del potencial de membrana.
- La inactivación, que controla la velocidad y la intensidad con que el canal se cierra

durante una despolarización mantenida.

Estos dos procesos aseguran que la activación de los canales iónicos sea rápida, pero pasajera.

Diversos experimentos confirman que la subunidad α_1 es la porción central del canal, ya que contiene tanto el poro del canal, como los puntos de unión para muchos de los fármacos que lo inhiben. El ARNm que codifica la subunidad α_1 cardíaca (α_{1c}) se genera en el brazo corto del cromosoma 12 (12p13.3). La inyección de este ARNm en oocitos de *Xenopus* produce un canal funcional que contiene los puntos de unión para VPM, DTZ y dihidropiridinas. Más aún, tras inyectar el ADN de la subunidad α_1 procedente de músculo cardíaco o esquelético en el núcleo de los miotúbulos del ratón disgénico *mdg*, que no expresan la subunidad α_1 y carecen de CCVD-L, se recupera la capacidad para generar la corriente de entrada de Ca^{++} . Sin embargo, es necesaria su coexpresión con las otras subunidades para constituir un canal funcional y generar una corriente de entrada de Ca^{++} con características electrofisiológicas normales (337).

Para que la proteína que forma la subunidad α_1 pueda responder a las alteraciones del potencial de membrana debe contener dentro de su campo eléctrico (es decir, dentro de la membrana) unos residuos de aminoácidos que estén cargados o que se comporten como un dipolo. En el CCVD el segmento S4 de cada dominio presenta, cada tres o cuatro aminoácidos, residuos cargados positivamente (la mayoría de arginina y también lisina) separados por residuos hidrófobos que constituyen el sensor de voltaje del canal. Cuando el potencial cambia, el campo eléctrico crea una fuerza en el sensor que le obliga a modificar físicamente su disposición y abrir el canal (324, 328).

Una vez activado el canal, la duración de su abertura está controlada por la compuerta de inactivación situada en la salida citoplásmica del poro. La estructura de esta compuerta, que pertenece a la subunidad α_1 , difiere según el tipo de canal; puede ser un pequeño segmento que une los dominios III y IV. Las compuertas son estructuras con una carga eléctrica, la cual será modificada por los cambios de voltaje producidos por la despolarización de la membrana. Según la posición de las compuertas el CCVD-L puede adoptar tres grados de actividad o estados: reposo (canal cerrado y disponible para la activación), activo-abierto (permite el paso de Ca^{++}), e inactivo o refractario (canal cerrado y no disponible para activación). Los estados de reposo e inactivo no permiten la entrada de Ca^{++} y para que un canal que se encuentra en estado inactivo se active de nuevo es preciso que antes vuelva al estado de reposo, es decir, que se reactive (figura 8). En oocitos de *Xenopus* la coexpresión de la subunidad α_1 con las subunidades α_2 , δ y β , pero no de cada subunidad por separado, desplaza la curva de activación hacia valores más

negativos y aumenta la pendiente de la curva de inactivación y la amplitud de la corriente de entrada de Ca^{++} . La coexpresión de la subunidad α_1 con las subunidades α_2 y δ aumenta marcadamente la corriente de entrada de Ca^{++} , acelera su activación y desplaza su dependencia de voltaje a niveles más negativos de potencial de membrana. La coexpresión de las subunidades α_1 y β incrementa marcadamente el número de puntos de unión para las dihidropiridinas y la amplitud de la corriente de entrada de Ca^{++} y acelera la inactivación del canal (328, 338, 339).

La actividad de estos canales también está regulada, en una escala de tiempo algo mayor, por la activación de receptores asociados a determinadas proteínas G que tienen como elemento efector al propio canal iónico. Se trata de un proceso que ocurre estrictamente en la membrana y es independiente de la producción de segundos mensajeros citoplásmicos. Por este mecanismo dependiente de proteína G pueden ser activados algunos canales de Ca^{++} sensibles a dihidropiridinas y ciertos canales de K^+ y Na^+ .

Los segundos y terceros mensajeros generados en el citoplasma tras la activación de ciertos receptores pueden influir sobre los CCVD, como ocurre con la formación de AMPc en respuesta a la activación de los β -adrenoreceptores. El AMPc es un elemento facilitador de algunos CCVD, porque la proteinkinasa AMPc-dependiente fosforila alguna proteína relacionada con la actividad de los canales.

Los CCVD pueden ser obstruidos específicamente por sustancias que presentan una afinidad selectiva por ellos. En primer lugar, los cationes Mn^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} , Sr^{++} , Gd^{+++} y Li^{+++} , pero otras moléculas complejas, entre las que se encuentran diversos derivados de la dihidropiridina, VPM y DTZ, muestran afinidad por sitios específicos de los CCVD-L y son denominadas “antagonistas del Ca^{++} ” o “bloqueantes del canal lento del Ca^{++} ” (340). Para algunos autores, estos bloqueantes son capaces de inhibir la actividad tanto de los CCVD como de los canales receptor-dependientes. Es importante el hecho de que un derivado de dihidropiridina (BayK8644), en lugar de bloquear la entrada de Ca^{++} como antes se ha dicho, la estimule (promotor del Ca^{++}); esto significa que un posible grupo específico perteneciente al canal puede ser afectado ambivalentemente (341).

Recientemente ha sido demostrada la capacidad de fijación al CCVD-L de los bloqueantes β -adrenérgicos, utilizados en el tratamiento del glaucoma. De todos los fármacos estudiados, fue el betaxolol el que mostró mayor potencia para fijarse y bloquear el canal (342).

Una importante propiedad de los CCVD-L es su plasticidad, aumentando su número en diversas situaciones fisiológicas (por ejemplo, con la edad) o patológicas (HTA,

cardiomiopatías), así como tras la ingesta de sal o la administración de fármacos (opiáceos, alcohol, neurolépticos, fenciclidina, o fármacos que aumentan los niveles celulares de AMPc). El número de CCVD-L disminuye tras la administración de difenilhidantoína, ICC y bloqueadores β (39).

2.3.5.- EFECTOS SOBRE LA DINÁMICA DEL CALCIO DE LOS CANALES DEL CALCIO VOLTAJE DEPENDIENTES.

La función de estos canales es considerable si se piensa en la importancia que el Ca^{++} tiene para desencadenar múltiples procesos intracelulares. Los CCVD son la principal vía de transporte de Ca^{++} a través de las membranas citoplasmáticas de múltiples tipos celulares. El flujo de entrada de Ca^{++} a través de los CCVD es responsable del acoplamiento excitación-contracción de la musculatura lisa, cardíaca y esquelética, la síntesis y liberación de neurotransmisores, sustancias vasoactivas y factores del crecimiento, la excitabilidad celular y, en particular, la despolarización de las células de los nodos cardíacos, la activación de múltiples enzimas, la quimiotaxis y motilidad de diversos tipos de células, la expresión de genes, el crecimiento y diferenciación celular y la regulación de ambos procesos y la lesión y muerte celulares (343-345).

El metabolismo óseo, la agregación plaquetaria y la coagulación son procesos Ca^{++} -dependientes, pero en estas estructuras no se conoce con exactitud el papel que juega la entrada de Ca^{++} a través de los CCVD.

2.4.- CANALES DEL CALCIO ASOCIADOS A RECEPTORES.

Son canales iónicos cuya abertura o cierre se asocia específica y directamente a la interacción de un ligando con un receptor situado en la membrana de la célula. Se distinguen dos tipos:

-Canales iónicos en los que el receptor y el canal forman parte de una misma proteína; lógicamente, el dominio receptor está situado en la porción extracelular de la molécula, en un lugar de fácil acceso para el ligando.

-Canales iónicos en los que el receptor y el canal forman parte de proteínas diferentes, si bien ambas se encuentran acopladas por diversos elementos transductores, entre los cuales destacan las proteínas fijadoras de GTP (proteínas G) y los segundos mensajeros citoplásmicos provocados tras la activación por ligandos (323).

Los canales receptor dependientes muestran algunas características comunes,

independientemente del ligando que lo active y del ion para el cual esté especializado, por lo que se puede hablar de una superfamilia de proteínas. Son proteínas grandes compuestas por cinco subunidades proteicas muy heterogéneas (de forma homomérica o heteromérica) situadas dentro de la membrana. Cada subunidad tiene un extremo N-terminal extracelular y otro C-terminal intracelular. Entre ambos se dispone la cadena de aminoácidos que da lugar a cuatro segmentos transmembrana (M_1 - M_4), de los cuales el segmento M_2 al parecer, forma la pared del canal. Algunos de estos canales poseen en sus subunidades proteicas dominios específicos que, al ser ocupados por determinados compuestos, modulan la funcionalidad del conjunto, como ocurre con el receptor glutamatergico N-metil-D-aspartato (NDMA). Algunas de las subunidades pueden ser fosforiladas, lo que modificará la funcionalidad del canal.

Debido a la estrecha relación entre activación del receptor y abertura del canal, la latencia entre ambas es muy corta (milisegundos). Igualmente, la disociación del ligando de su receptor provoca el cierre inmediato del canal, de ahí que estos receptores sirvan para emitir señales que exigen una rápida respuesta, especialmente en el sistema nervioso. Por último, estos receptores sufren también procesos de rápida desensibilización cuando permanecen expuestos de forma continuada a su ligando, lo que limita y, en cierto modo, protege la intensidad de la respuesta. La activación del receptor despolarizará o hiperpolarizará la membrana en la que se encuentra, según sea el movimiento iónico que genere. Son despolarizantes los receptores ionotropos del glutamato asociados a canales de Na^+ y K^+ (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxiazolpropiónico (AMPA) y kainato), y a canales de Na^+ y Ca^{++} (NMDA).

Los CCRD pueden activarse por su unión a múltiples ligandos agonistas: glutamato, noradrenalina, 5-HT, angiotensina, tromboxano, $PGF_{2\alpha}$, etc (tabla 2). De esta manera es posible explicar cómo, incluso en tejidos totalmente despolarizados, ciertas sustancias pueden facilitar la entrada de Ca^{++} . Generalmente, los CCRD son menos sensibles a los antagonistas del Ca^{++} que los CCVD. En las membranas intracelulares los canales de Ca^{++} más importantes son los asociados a receptores de inositol trifosfato (IP_3) y de ryanodina (Ry) (219, 346).

Tabla 2. Receptores de la membrana plasmática que incrementan el calcio intracelular.

Vía fosfolipasa β 1 (PLC β 1)	Vía fosfolipasa γ 1 (PLC γ 1)	Directamente
Adrenérgico- α 1 Muscarínicos m1, m3, m5 Purinérgicos P2y, P2u, P2t Serotoninérgico 5HT1C Histamínico H1 GnRH TRH PTH Glucagón Oxitocina Angiotensina II Trombina Tromboxanos Factor activador de las plaquetas Endotelina Vasopresina V-1a, V-1b Colecistoquinina Bombesina Péptido intestinal vasoactivo (VIP) Bradiquinina Tachikinina Sustancia P Neuropeptido Y Neuromedina F-Met-Leu-Fen BoPCAR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas Receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos ErbB2 Receptor de antígenos de linfocitos T	Canales nicotínicos de la acetilcolina Familia de los canales iónicos asociados al receptor de glutamato

Uno de los principales CCRD es el canal de NMDA dependiente de glutamato. El glutamato, es un aminoácido neurotransmisor excitador del sistema nervioso central. Tres de sus receptores son de carácter ionotrope, es decir, incorporan canales iónicos dentro del complejo molecular del receptor, y un cuarto es de carácter metabotropo, porque su activación se asocia a la activación de una fosfolipasa C (PLC) mediante un mecanismo asociado a la proteína G. Los receptores de carácter ionotrope se denominan según su agonista más específico: el NMDA, el AMPA, antes denominado ciscualato, y el kainato, por fijar ácido kaínico.

El receptor AMPA es un canal de cationes permeable al Na^+ , H^+ y K^+ , pero no al Ca^{++} . El receptor NMDA está asociado a un canal que permite el flujo de Na^+ , K^+ y Ca^{++} , por lo que su activación desencadenará respuestas derivadas del incremento de Ca^{++} intracelular. Debido a las peculiaridades del canal receptor NMDA, su cinética es más compleja. Se abren y se cierran más lentamente en respuesta a la activación por glutamato. Una vez activado el canal y dado que permite la entrada de Ca^{++} , se activarán muchos mecanismos dependientes de Ca^{++} intracelulares, que amplificarán y complicarán la respuesta a través de segundos y terceros mensajeros. La entrada de Ca^{++} por el canal de NMDA favorece la activación del CCVD (347).

Los receptores metabotropos están asociados a proteínas G y, a través de ellas, a gran número de sistemas efectores a los que activan o inhiben según sea la naturaleza del mecanismo mediador. Son denominados mGluR_1 a mGluR_5 , y en función de su homología estructural, se agrupan en tres grupos fundamentales (I-III). Algunos de los sistemas efectores influyen sobre la actividad de diversos canales iónicos, especialmente de K^+ y de Ca^{++} (323).

2.5.- CANALES DEL CALCIO ASOCIADOS A LOS DEPÓSITOS INTRACELULARES DE CALCIO.

La existencia de estos canales fue demostrada en 1993 por los grupos de investigación de Yao, Lupu-Meiri y Petersen mediante técnicas electrofisiológicas, usando los oocitos de *Xenopus laevis* (348-350), pero hasta el momento ninguno de estos canales ha sido clonado, su naturaleza no ha sido claramente definida y sus mecanismos exactos de funcionamiento son actualmente discutidos (351). Se han propuesto varias vías o "corrientes" de Ca^{++} , cada una de ellas con diferentes propiedades electrofisiológicas y mecanismos de activación/modulación distintos (tabla 3) (352).

Su regulación, independiente de los fenómenos bioeléctricos de la membrana plasmática, viene determinada por el estado de relleno de los depósitos intracelulares de Ca^{++} , bien por un factor bioquímico (segundo mensajero) no conocido, o bien siguiendo un modelo de interacción directa entre estos canales y los depósitos de Ca^{++} . El principal candidato propuesto como segundo mensajero es el denominado factor de influjo de Ca^{++} (CIF o *Ca⁺⁺ influx factor*), generado por el retículo endoplásmico y cuya actividad ha podido ser demostrada en macrófagos, células de astrocitoma y líneas celulares de fibroblastos (353). Otros modelos establecen que el receptor de IP_3 contacta directamente con el receptor en la membrana plasmática, induciendo en este último los cambios conformacionales que permitirán la entrada de Ca^{++} desde el exterior celular (325, 326).

Tabla 3. Corrientes de entrada de calcio de la membrana plasmática dependientes de los depósitos intracelulares de calcio.

Corriente	Conductancia a 22°C	Tiempo de apertura (ms)	Selectividad	Mecanismo de apertura
I_{CRAC}, I_{DAC}	0,02 pS (110 Ca ⁺⁺)	Desconocido	Ca ⁺⁺ >Ba ⁺⁺ >Mn ⁺⁺	Ionomicina, InsP ₃ /BAPTA/0 Ca ⁺⁺ , thapsigargina
I_{DC}	2 pS (160 Ca ⁺⁺) 20 pS (160 Ba ⁺⁺)	8 16	Ba ⁺⁺ >>Ca ⁺⁺ ≈ Mn ⁺⁺	BAPTA/0 Ca ⁺⁺ , thapsigargina
I_{Ca}.InsP₃	7 pS (100 Ba ⁺⁺) 8 pS (110 Ca ⁺⁺)	2 20,200	Ca ⁺⁺ =Ba ⁺⁺ Ca ⁺⁺ >Ba ⁺⁺ >Na ⁺	InsP ₃ InsP ₃
I_{Ca}.InsP₄	2 pS (100 Mn ⁺⁺)	200	Ca ⁺⁺ =Ba ⁺⁺ =Mn ⁺⁺	Ca ⁺⁺ intracelular, InsP ₄
I_{Ca}.ATP	5 pS (130 Ca ⁺⁺)		Ca ⁺⁺ =Ba ⁺⁺ >Na ⁺	Receptor de ATP
I_{Ca}.Ca	5 pS (90 Ca ⁺⁺) 20 pS (90 Ca ⁺⁺)		Ca ⁺⁺ =Na ⁺ =K ⁺	Ca ⁺⁺ intracelular

2.6.- OTRAS VÍAS DE TRANSPORTE DE CALCIO.

2.6.1.- CANALES DE CALCIO ASOCIADOS A NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS.

Existen ciertos canales catiónicos (incluidos los canales de Ca⁺⁺) situados en los fotorreceptores de conos y bastones sensibles al GMPc y en los cilios de neuronas olfativas sensibles al AMPc, que son activados directamente por nucleótidos cíclicos (323). En estos casos los nucleótidos no actúan mediante mecanismos intermedios, como la fosforilación de proteínas, sino de manera directa mediante fijación de la molécula nucleotídica a un dominio citoplásmico del canal. Se trata de canales activados por ligandos y no por voltaje, pero debido a su estructura y sus características son más parecidos a los canales dependientes del voltaje.

2.6.2.- EL ANTITRANSPORTADOR Na⁺/Ca⁺⁺.

El sistema de transporte activo de iones mejor conocido es la bomba de Na⁺, que mantiene el gradiente de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana celular. Su importancia es fundamental como elemento generador de la energía necesaria para provocar el potencial de acción en las células nerviosas. El enzima responsable del mantenimiento de este transporte activo es la ATPasa-Na⁺/K⁺, que por cada molécula de ATP hidrolizado bombea 3 iones de Na⁺ al exterior de la célula y permite la entrada de 2 iones de K⁺ al citoplasma celular; al ser desigual el intercambio, la bomba es electrogénica.

En algunas membranas celulares, entre las que destaca el sarcolema de la célula miocárdica, la bomba de Na^+/K^+ y el gradiente iónico que genera están asociados a un sistema antitransportador de Na^+ y Ca^{++} (figura 7). Este sistema funciona de manera bidireccional, de forma que el aumento de Na^+ extracelular facilita la salida de Ca^{++} , y el aumento de Na^+ intracelular facilita la entrada de Ca^{++} . Inicialmente se consideró que el transportador intercambiaba dos iones de Na^+ por uno de Ca^{++} , por lo que el resultado neto era neutro (intercambio no electrogénico). Sin embargo, se ha comprobado que el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ es electrogénico y que probablemente el intercambio es de 3 iones de Na^+ por uno de Ca^{++} . Pequeños cambios en el nivel de Na^+ intracelular pueden promover efectos notables sobre el movimiento del transportador y el intercambio correspondiente. Aunque no se conoce ningún fármaco que altere directamente el funcionamiento de este transportador, la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ -dependiente puede influir indirectamente sobre él. Existen otros mecanismos de antitransporte de Ca^{++} con cationes monovalentes, principalmente H^+ .

2.6.3.- LA BOMBA DE CALCIO DEPENDIENTE DE ATP (ATPasa- Ca^{++}).

Las denominadas bombas de protones intervienen en numerosos procesos de transporte activo, tanto a través de la membrana celular como a través de las membranas intracelulares que conforman vacuolas, vesículas, cisternas, retículos, etc. El elemento intermediario común de alta energía es la fuerza protomotriz y las enzimas que intervienen son las denominadas protón-ATPasas. Las ATPasas poseen uno o más sitios para fijar el ATP en la cara citosólica de la membrana. El sistema se encuentra acoplado firmemente de tal forma que no se puede disipar la energía almacenada en el enlace fosfoanhídrido del ATP. La proteína recoge la energía liberada por la hidrólisis del ATP a ADP y P_i y la utiliza para transportar el ion en contra del gradiente de concentración o potencial. Se conocen tres clases de ATPasas, denominadas P, V y F, y una cuarta denominada proteína de multitransporte de fármacos o P170.

La ATPasa- Ca^{++} es una bomba de Ca^{++} perteneciente a la familia de las ATPasas tipo P (junto con la ATPasa- Na^+/K^+ y la ATPasa- H^+/K^+) que está presente en abundancia en la membrana celular y del retículo sarco/endoplásmico. Es una proteína de 110 kD con secuencia similar a la de la subunidad α de la ATPasa- Na^+/K^+ ; por cada ATP hidrolizado se transportan dos Ca^{++} . La alta afinidad de la ATPasa por el Ca^{++} ($K \approx 10^{-7}$) permite su bombeo desde el citosol hasta el interior del retículo sarco/endoplásmico o hasta el exterior de la célula contra su gradiente electroquímico. La ATPasa- Ca^{++} es sensible a la Cm y puede ser fosforilada por un mecanismo dependiente de Ca^{++} (323, 343).

3.- EL CALCIO INTRACELULAR.

3.1.- FUNCIONES DEL CALCIO INTRACELULAR.

El ion Ca^{++} es uno de los principales reguladores de los sucesos intracelulares y actúa como mensajero intracelular, invadiendo y participando de forma permanente en múltiples procesos vitales de la célula (219, 352). El Ca^{++} desempeña un importante papel en los fenómenos de transporte y transmisión de señales a través de las membranas biológicas y a nivel intracelular. De hecho, el Ca^{++} es responsable de (330, 344, 345, 354-358):

- El acoplamiento excitación-contracción.
- La despolarización de las células de los nodos cardíacos.
- El acoplamiento excitación-secreción de neurotransmisores, factores de crecimiento y hormonas.
- El transporte axoplásmico y la excitabilidad neuronal.
- El ensamblaje/desensamblaje del sistema microtubular intracelular.
- La activación y expresión de diversos genes que inducen la proliferación y diferenciación celular.
- La progresión del ciclo celular.
- La fecundación del ovocito por el espermatozoide y el desarrollo embrionario.
- La activación y modulación de canales iónicos.
- La regulación de los procesos de endocitosis y exocitosis en la membrana citoplasmática.
- La activación y modulación de enzimas.
- La coagulación y activación plaquetaria.
- La quimiotaxis y los fenómenos de motilidad y adherencia celular.
- El envejecimiento y la muerte celular programada o apoptosis.

El Ca^{++} ionizado es el elemento de traducción de señales más utilizado desde las bacterias más primitivas a las neuronas más especializadas. A pesar de que las células se encuentran sumergidas en elevadas concentraciones de Ca^{++} (10^{-3} M/l), los niveles de Ca^{++} libre dentro de las células en reposo, que son decisivos para su regulación funcional, son muy bajos, de aproximadamente $0,1 \mu\text{M/l}$ (10^{-7} M/l); por consiguiente, el gradiente químico entre el Ca^{++} libre plasmático e intracelular es de aproximadamente 10.000 a 1. Por otro

lado, el interior de la célula es electronegativo (entre -85 y -55 mV), es decir, existe un gradiente eléctrico que atrae al Ca^{++} al interior de la célula. Este gradiente electroquímico se halla regulado de forma muy rigurosa (325, 326).

Las membranas celulares son barreras bilipídicas que no permiten el paso de moléculas eléctricamente cargadas. La presencia de un estímulo adecuado permite la apertura de los canales en las membranas para generar rápidos aumentos del Ca^{++} citosólico. Durante la activación celular la concentración de Ca^{++} intracelular aumenta hasta 100 veces ($10 \mu\text{M/l}$) debido a la entrada de Ca^{++} extracelular y a la liberación del Ca^{++} almacenado en los depósitos intracelulares. Estos rápidos incrementos de Ca^{++} citosólico o "pulsos de Ca^{++} " constituyen las unidades elementales de la señalización del Ca^{++} (359). La función de los canales del Ca^{++} situados en la membrana plasmática y a nivel intracelular es considerable si se piensa en la importancia de este cation para desencadenar múltiples procesos intracelulares (322).

Numerosas señales que actúan sobre las células ejercen su acción específica como consecuencia del incremento del Ca^{++} intracelular. Por ello el Ca^{++} debe ser considerado como un segundo mensajero. La dirección en que se mueva el Ca^{++} , es decir, de fuera a dentro de la célula o viceversa, dependerá no sólo del tipo de estímulo sino también de la especialización evolutiva de la célula. Un mismo mediador fisiológico, como es la noradrenalina, puede facilitar la entrada de Ca^{++} en algunas células musculares y provocar su contracción, y promover en otras la salida o el secuestro intracelular de Ca^{++} con la consiguiente relajación. En un gran número de células, el Ca^{++} necesario para llevar a cabo sus funciones depende estrictamente de la cantidad que penetre desde el exterior; en otros casos el Ca^{++} es liberado a partir de estructuras intracelulares; y en otros, el Ca^{++} exógeno que penetra en la célula sirve para movilizar el Ca^{++} almacenado en los depósitos endocelulares (325).

La baja concentración intracelular del Ca^{++} citosólico que caracteriza a todas las células eucarióticas se mantiene por el transporte activo de Ca^{++} hacia el espacio extracelular y hacia sus depósitos intracelulares, y por su unión a proteínas del citosol.

3.2.- DEPÓSITOS ENDOCELULARES DE CALCIO.

La mayor parte del Ca^{++} intracelular se encuentra unido a macromoléculas, principalmente proteínas y fosfolípidos. Sólo un 10-20% se localiza en el citosol, mayoritariamente unido a proteínas citosólicas y a la superficie de diferentes membranas (360, 361). El resto se almacena en sus depósitos intracelulares, principalmente el retículo

sarco/endoplásmico (362) y las mitocondrias (363). Otros espacios intracelulares donde se almacena o concentra Ca^{++} son el núcleo celular, el aparato de Golgi, los gránulos de secreción, las vesículas citoplasmáticas, las vesículas sinápticas, los endosomas, los lisosomas, etc (360, 362).

3.2.1.- EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO. RECEPTORES DE INOSITOL-TRIFOSFATO (IP_3) Y RYANODINA (Ry).

El retículo endoplásmico (retículo sarcoplásmico de las células musculares) es la principal organela almacenadora de Ca^{++} y tiene especial importancia ya que es la fracción de Ca^{++} intracelular (30-40% del Ca^{++} intracelular) que puede movilizarse con mayor rapidez manteniéndose constantemente en equilibrio dinámico con el Ca^{++} citosólico (362). El resto de las organelas almacenadoras de Ca^{++} pertenecen al denominado "pool lento de Ca^{++} ".

El transporte de Ca^{++} desde el citosol hasta el interior del retículo sarco/endoplásmico se realiza, principalmente, por un mecanismo dependiente de energía realizado por la bomba de tipo P o ATPasa- Ca^{++} (110 kD) del retículo sarco/endoplásmico o SERCAs (*sarco/endoplasmic reticulum Ca^{++} -ATP-ases*), de la que se conocen cuatro isoformas: SERCA 1 (del músculo liso de contracción rápida), SERCA 2a (miocárdica y del músculo liso de contracción lenta), SERCA 2b (neuronal) y SERCA 3 (de células no musculares). Las SERCAs son reguladas por el Ca^{++} e inhibidas por la thapsigargina, el ácido ciclopiazónico, la 2,5 - di - (tert - butil) - 1,4 - benzohidroquinona y la 4 - aminopiridina, calmidazolium, flunarizina, clorpromazina y TFP, produciendo variaciones rápidas en la concentración del Ca^{++} citosólico (43).

Los dos principales tipos de familias de canales de Ca^{++} responsables de la movilización del Ca^{++} desde el retículo endoplásmico hacia el citosol son los canales dependientes de receptores de IP_3 y de Ry (346, 364, 365). Ambas familias de receptores establecen relaciones funcionales con los canales de Ca^{++} de la membrana citoplasmática y están implicadas en el proceso conocido como "liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++} ", responsable de la generación de las espículas y ondas de Ca^{++} citosólico. Adicionalmente, existen otros tipos de canales, menos importantes y en menor número, implicados en la movilización de Ca^{++} desde el retículo endoplásmico que son activados por el NAADP o la esfingosina-1-fosfato, y posiblemente por otros mediadores que actúan sobre receptores todavía no bien definidos (366).

Los receptores de IP₃ y Ry comparten características estructurales y funcionales comunes (tabla 4).

Tabla 4. Características de los receptores de inositol trifosfato y de ryanodina.

RECEPTOR	Inositol trifosfato	Ryanodina		
Estructura	Tetrámero (4x313 Kd)	Tetrámero (4x560 Kd)		
Subtipos	IP ₃ R1: 2695 AA IP ₃ R2: 2701 AA IP ₃ R3: 2671 AA	RyR1 o α o esquelético	RyR2 o cardíaco	RyR3 o β o cerebral
Distribución predominante	La mayoría de las células expresan todas las isoformas	Músculo esquelético y cualquier célula	Corazón, cerebro, músculo liso y cualquier célula	Cerebro, músculo liso y cualquier célula
Conductancia de Ca⁺⁺	~50 pS	~100-150 pS	~100-150 pS	~100-150 pS
Tiempo medio apertura (ms)	~4 ms	~20 ms	~20 ms	~20 ms
Permeabilidad	Ba ⁺⁺ >Sr ⁺⁺ >Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ >Mn ⁺⁺ $P_{Ba}/P_K = 6,3$	Ba ⁺⁺ >Sr ⁺⁺ >Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ $P_{Ba}/P_K = 4-8$	Ba ⁺⁺ >Sr ⁺⁺ >Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ $P_{Ba}/P_K = 4-8$	Ba ⁺⁺ >Sr ⁺⁺ >Ca ⁺⁺ >Mg ⁺⁺ $P_{Ba}/P_K = 4-8$
Agonistas farmacológicos	Inositol-1,4,5-trifosfato (nM) o IP ₃ (1,4,5) Compuestos relacionados: IP ₃ (2,4,5) e IP ₂ (4,5)	Ryanodina (nM- μ M) Cafeína (mM) Heparina (μ g/ml)	Ryanodina (nM- μ M) Cafeína (mM) Heparina (μ g/ml)	Ryanodina (nM- μ M) Cafeína (mM) Heparina (μ g/ml)
Antagonistas farmacológicos	Heparina (μ g/ml) Decavadato (μ M) Cafeína (mM) Xestospongina (< μ M)	Rutenio rojo (μ M) Ryanodina (>10 μ M)	Rutenio rojo (μ M) Ryanodina (>10 μ M) 8-amino-ribosa-ADPc	Rutenio rojo (μ M) Ryanodina (>10 μ M)
Estimuladores fisiológicos	Ca ⁺⁺ citosólico (< μ M) ATP (μ M)	Ca ⁺⁺ citosólico (μ M) ATP (mM) Calmodulina	Ca ⁺⁺ citosólico (μ M) ATP (mM) Calmodulina Ribosa-ADPc	Ca ⁺⁺ citosólico (μ M) ATP (mM) Calmodulina
Inhibidores fisiológicos	Ca ⁺⁺ citosólico (> μ M) Calmodulina (IP ₃ R1)	Ca ⁺⁺ citosólico (mM) Calmodulina (μ M)	Ca ⁺⁺ citosólico (mM) Calmodulina (μ M)	Ca ⁺⁺ citosólico (mM) Calmodulina (μ M)
Radioligandos de elección	[³ H]-Inositol 1,4,5-trifosfato	[³ H]-Ryanodina [¹²⁵ I]-Calmodulina	[³ H]-Ryanodina [³ H]-Ribosa-ADPc [¹²⁵ I]-Calmodulina	[³ H]-Ryanodina [¹²⁵ I]-Calmodulina

La distribución de los receptores de IP₃ es universal, mientras que los receptores de Ry se encuentran, principalmente, en las células musculares (367). Todos los miembros de estas familias de receptores son tetrámeros (todos los receptores de Ry son homotetrámeros, mientras que los repetores de IP₃ pueden ser homotetrámeros o heterotetrámeros) formados por grandes subunidades proteicas (310 kD los de IP₃ y 560 kD los de Ry). Cada tetrámero presenta dos dominios, externo e interno. Ambas familias de receptores presentan una gran homología en el dominio interno que se extiende desde el extremo COOH- terminal por el interior de la membrana del retículo endoplásmico y que participa en la unión entre el receptor y el canal. La región N-terminal, es de gran tamaño, se proyecta hacia el citosol y no presenta homología. El dominio citosólico de ambos tipos

de receptores contiene lugares de fijación para múltiples ligandos intracelulares, como proteínas (Cm), proteíncinasas que lo fosforilan, regulando su actividad, y varios segundos mensajeros (el principal de ellos es el Ca^{++}). Los dos tipos de canales asociados a estos receptores presentan una geometría “en pétalos de flor” (en proyección lateral) o “en roseta” (en proyección frontal), aproximadamente de la misma anchura (20 nm), pero de diferente altura (10 y 18 nm para IP_3 y Ry respectivamente) (362, 368).

Existen al menos cuatro tipos de receptores de IP_3 , cada uno de ellos formado por dos dominios (368). El dominio externo contiene los lugares de unión con el agonista (al menos cuatro), mientras que el dominio adyacente a la membrana del retículo endoplásmico experimenta, tras la unión del agonista, cambios en su conformación molecular que facilitan la apertura del canal. Este mecanismo puede aumentar la concentración de Ca^{++} desde ≈ 100 nM hasta ≈ 1 μM . El receptor de IP_3 responde ante la unión del agonista adecuado aumentando la frecuencia de apertura de su canal. No existe unanimidad sobre si solamente se precisa la unión de una sola molécula de IP_3 a una de las subunidades del receptor para su activación o si, por el contrario, es precisa la unión de IP_3 a las cuatro subunidades del receptor. Los receptores de IP_3 tipo 3 establecen relaciones entre el retículo endoplásmico y los canales de Ca^{++} dependientes de depósitos de Ca^{++} de la membrana plasmática, favoreciendo la entrada de Ca^{++} desde el exterior celular (325).

La función del receptor IP_3 está regulada por un mecanismo de fosforilación realizado por proteíncinasas dependientes de AMPc, del CaCm y por las proteíncinasas A (PKA) y PKC. El propio ion Ca^{++} es el principal modulador del receptor de IP_3 por un mecanismo bifásico. Los niveles de Ca^{++} muy bajos insensibilizan al receptor. La concentración de Ca^{++} citosólico entre 0,5-1 μM incrementa la respuesta del receptor al IP_3 . Cuando la concentración de Ca^{++} citosólico supera esos valores se produce un descenso de la respuesta seguido de una inhibición completa del receptor, fenómeno conocido como desensibilización del receptor (352). Una pequeña proteína denominada calmedina parece inhibir, siguiendo una dinámica Ca^{++} dependiente, la unión de IP_3 a su receptor (369).

Existen al menos tres tipos de receptores de Ry (tabla 4). El dominio más externo presenta lugares específicos para su unión al Ca^{++} , la Cm y el ATP. El dominio situado en la porción transmembrana contiene las regiones reguladoras del canal. El receptor de Ry tipo 1 establece relaciones funcionales y estructurales entre el retículo sarcoplásmico y el receptor de dihidropiridinas de los CCVD-L a través de una proteína denominada triadina, y el sistema tubular T intracelular (325, 346).

El receptor de Ry puede ser activado por su unión a un agonista adecuado y a la Ry (un alcaloide vegetal procedente de la planta *Ryania speciosa*), por rápidos incrementos de la concentración de Ca^{++} citosólico (proceso conocido como liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++}) o por un mecanismo dependiente de voltaje por su asociación al CCVD-L (325, 362, 364). La concentración de Ca^{++} del retículo endoplásmico, posiblemente por una interacción con la calsecuestrina, va a modular la actividad de los receptores de Ry. La proximidad entre la calsecuestrina y el receptor de Ry es fundamental para la función calcioreguladora del retículo endoplásmico. La cafeína, el Mg^{++} , el IP_3 , la rapamicina y la ribosa-ADPc también son moduladores del receptor de Ry (346, 365, 370).

La velocidad de la movilización del Ca^{++} intracelular varía según el órgano de depósito considerado. El Ca^{++} no puede permanecer libre en la luz del retículo endoplásmico y requiere mecanismos específicos de almacenaje. Se ha descrito un amplio y heterogéneo grupo de proteínas situadas en la luz del retículo endoplásmico capaces de unirse al Ca^{++} . De todas ellas las más importantes son las familias de las calsecuestrinas y de las calreticulinas (371). Otras reticuloplasminas con capacidad para unirse al Ca^{++} son la calnexina, el chaperón principal de la luz del retículo endoplásmico BiP, la proteína-disulfido-isomerasa y la reticulocalbina. La elevada cinética de intercambio de Ca^{++} entre el retículo endoplásmico y el citosol depende principalmente de las familias de las calsecuestrinas y de las calreticulinas. Estas proteínas combinan la capacidad de unión a grandes cantidades de Ca^{++} ($\approx 25\text{-}50$ mol/mol) y una baja afinidad por el mismo (K_d en el rango milimolar), dos propiedades fundamentales que hacen que el intercambio de Ca^{++} entre el retículo endoplásmico y el citosol presente un gran dinamismo.

El retículo endoplásmico es una organela que manifiesta un compartimento heterogéneo respecto a la expresividad de los receptores de IP_3 y la captación, almacenaje y liberación de Ca^{++} ; estas funciones estarían delimitadas a zonas concretas del retículo endoplásmico. Por lo tanto, actualmente se establece el concepto de "calciosoma" como un subcompartimento especializado del retículo endoplásmico donde se concentran las funciones relacionadas con la dinámica del Ca^{++} (361).

3.2.2.- LA MITOCONDRIA Y EL CALCIO.

La mitocondria posee un elaborado sistema para facilitar el transporte de Ca^{++} a través de su membrana interna. Además de Ca^{++} , la mitocondria secuestra Sr^{++} , Mn^{++} y Ba^{++} con la siguiente selectividad: $\text{Ca}^{++} > \text{Sr}^{++} > \text{Mn}^{++} > \text{Ba}^{++}$, y también Fe^{++} y Pb^{++} . El Ca^{++} penetra en la matriz mitocondrial por un unitransportador a favor del gradiente electroquímico (negativo en el interior de la mitocondria) generado tanto por la bomba de

protones (ATPasas de tipo F) asociadas a la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial interna, como por la H⁺-ATPasa, hasta alcanzar niveles de 0,5 mM/l (362, 363). El Ca⁺⁺ es eliminado desde la mitocondria hacia el citosol por un mecanismo antitransportador que intercambia 2Na⁺/Ca⁺⁺ (no electrogénico) cuya energía es generada por el gradiente de Na⁺ intramitocondrial; este gradiente es posteriormente restaurado por un mecanismo antitransportador que intercambia 2Na⁺/2H⁺ (363, 372). Este mecanismo de intercambio es bloqueado por algunos fármacos como el DTZ y el VPM, a concentraciones superiores a las que inhiben los CCVD de membrana (373). La membrana interna mitocondrial puede, bajo determinadas circunstancias (principalmente la pérdida del potencial de membrana), experimentar cambios de permeabilidad que permitan la salida de Ca⁺⁺, K⁺, Mg⁺⁺ y otros pequeños iones y moléculas (363).

El Ca⁺⁺ intramitocondrial sirve para regular la actividad de múltiples enzimas como la piruvato deshidrogenasa, α -glutarato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, etc, implicadas en la síntesis de ATP (372). La importancia de la mitocondria como organela acumuladora de Ca⁺⁺ es limitada. Si la concentración de Ca⁺⁺ citosólico supera 0,5-1 μ M/l, la mitocondria puede acumular grandes cantidades de Ca⁺⁺, pero la acumulación de Ca⁺⁺ es una alternativa a la síntesis de ATP y, por lo tanto, es potencialmente dañina para la célula.

3.3.- PROTEÍNAS FIJADORAS DE CALCIO. LA CALMODULINA Y EL COMPLEJO CALCIO-CALMODULINA.

El ion Ca⁺⁺ es capaz de reunir 4-12 átomos de oxígeno en su esfera de coordinación primaria, aunque lo más frecuente es encontrarlo rodeado de 6-8 átomos de oxígeno. Las proteínas que se unen al Ca⁺⁺ lo hacen a través de 6 átomos de oxígeno aportados por residuos de glutamato y aspartato. Los lugares de unión al Ca⁺⁺ contienen un armazón interno de átomos de oxígeno agrupados a 2,1-2,7 Å del ion Ca⁺⁺, un segundo armazón formado mayoritariamente por átomos de carbono que mantiene los átomos de oxígeno del armazón interno, y un tercer armazón situado a 4-5 Å del ion Ca⁺⁺ que contiene átomos de nitrógeno.

El Ca⁺⁺ difunde en los líquidos biológicos mucho más lentamente de lo esperado tanto con su radio iónico (1 Å, coeficiente de difusión (D) = 1000 μ m²/s), como con su radio hidratado (D = 800 μ m²/s). Según la concentración de proteínas fijadoras la difusión de Ca⁺⁺ varía entre 15-65 μ m²/s. Se estima que el ion Ca⁺⁺ libre no puede migrar más de 0,1-0,5 μ m, permaneciendo así solo 50 μ s antes de unirse a una proteína fijadora (con una

fijación de 10^8 M/s con una concentración de proteína fijadora de $300 \mu\text{M/l}$).

Las proteínas capaces de unirse al Ca^{++} pueden clasificarse en dos grupos (352) (tabla 5):

-Proteínas que se activan con la unión al Ca^{++} o *trigger proteins* (por ejemplo la Cm); cambian su conformación (son activadas) al unirse al Ca^{++} y, posteriormente, modulan la actividad de moléculas (enzimas, sistemas de regulación celular, etc) y canales iónicos.

-Proteínas tamponadoras de Ca^{++} o *buffering proteins* (por ejemplo la calsecuestrina); simplemente se unen al Ca^{++} o poseen otras funciones desconocidas.

En el citoplasma existen proteínas de pequeño tamaño (12-28 kD) con constantes de afinidad por el Ca^{++} dentro del intervalo apropiado ($0,1-10 \mu\text{M}$), que contribuyen a tamponarlo. Cabe señalar el fosfolambano, la troponina C, la parvalbúmina, la calbindina, la calretinina y sobre todo la Cm (323).

La calmodulina (Cm) de células eucariotas es una proteína de 16,68 kD que posee 148 aminoácidos, es de carácter ácido y termoestable, carece de especificidad y no posee por sí misma actividad enzimática, pero es imprescindible para la regulación de la actividad de diversas enzimas. La molécula de Cm puede ser subdividida en cuatro dominios que presentan una secuencia homóloga: el primer dominio (aminoácidos 8 a 40) está alineado con el tercer dominio (aminoácidos 81 a 113), y el segundo dominio (aminoácidos 44 a 76) está alineado con el cuarto dominio (aminoácidos 117 a 148) (374). Estos cuatro dominios de la Cm corresponden a cuatro sitios de fijación para el Ca^{++} , por el cual tiene especial afinidad cuando alcanza la concentración μM (375). La fijación del Ca^{++} a la Cm provoca cambios conformacionales que permiten su unión e interacción con las enzimas cuya actividad regula (323) (figura 13).

El CaCm regula la actividad de gran número de proteínas de carácter enzimático y de naturaleza estructural. Entre las enzimas se encuentran varias proteíncinasas (quinasas dependientes del CaCm), adenilciclasas y fosfodiesterasas (fosfodiesteras de nucleótidos cíclicos), la óxido nítrico-sintasa, la ATPasa- Ca^{++} , la PLA₂, la glucógeno-sintasa, etc (352). Los efectos del CaCm en sus enzimas diana pueden ser bloqueados por determinados fármacos fenotiazínicos como la TFP (43, 376). Entre las proteínas de carácter estructural, algunas conforman el citoesqueleto celular (tubulina, proteína τ , fodrina, etc) (352).

Tabla 5. Proteínas fijadoras y/o activadas por calcio.

Proteína	Función
Troponina C, T e I	Contracción muscular
Factores de la coagulación	Coagulación
Calmodulina	Modulador universal de proteínasas y otras enzimas (MLCK, CaM-kinasa II, adenilciclase I, etc)
Calretinina, retinina, visinina	Activadoras de la guanilciclase
Calcineurina B	Fosfatasa
Calpaína	Proteasa
Proteínlipasa C dependiente de inositol-fosfolípidos	Generadora de IP ₃ y DG
α-Actinina	Proteína fijadora de actina
Annexina	Endo y exocitosis. Inhibición de la PLA ₂ . Actividad sobre canales iónicos?
Fosfolipasa A	Producción de ácido araquidónico
Proteínasas C	Proteínasas de localización ubicua
Gesolina	Proteína fijadora de actina
Canal del K ⁺ dependiente de Ca ⁺⁺	Hiperpolarización de la membrana plasmática
Receptor de IP ₃	Liberación de Ca ⁺⁺ de los depósitos intracelulares
Receptor de Ry	Liberación de Ca ⁺⁺ de los depósitos intracelulares
Antitransportador Na ⁺ /Ca ⁺⁺	Intercambio bidireccional de Na ⁺ y Ca ⁺⁺ en la membrana plasmática
ATPasa dependiente de Ca ⁺⁺	Bomba de transporte de Ca ⁺⁺ a través de las membranas
Antitransportador de Ca ⁺⁺	Intercambiador de Ca ⁺⁺ por iones monovalentes
Proteínas fijadoras de vitamina D y K	Transporte intestinal de vitamina D. Síntesis de precursores de protrombina
BoPCAR	Proteína G asociada a un receptor sensible al Ca ⁺⁺
Caldesmon	Regulador de la contracción muscular
Villina	Organizador de la actina
Arrestina	Respuesta de fotorreceptores
S100β, aequorina	Desconocida
Espasmina	
Proteín-disulfido-isomerasa	Isomerasa
Cromogranina A	Formación de vesículas de secreción
Calreticulinas	Tamponadoras de Ca ⁺⁺ . Moduladoras de los receptores intranucleares
Parvalbúmina	Tamponadora de Ca ⁺⁺
Calbindina	Tamponadora de Ca ⁺⁺
Calsecuestrias	Tamponadoras de Ca ⁺⁺
Calnexina	Tamponadora de Ca ⁺⁺
Reticulocalbina	Tamponadora de Ca ⁺⁺
Chaperón BiP del retículo endoplásmico	Tamponadora de Ca ⁺⁺
Fosfolambano	Tamponadora de Ca ⁺⁺
Ciclo (Pro-Gly) ₃	Tamponadora de Ca ⁺⁺
Arsenazo III, Fluo 3, Fluo 3-AM, FURA 2, FURA 2-AM, FURA PE-3 AM, Indo 1, Indi1-AM, Quin 2, Quin 2-AM	Proteínas sintéticas fijadoras de Ca ⁺⁺ para la determinación de cantidades micromolares de Ca ⁺⁺

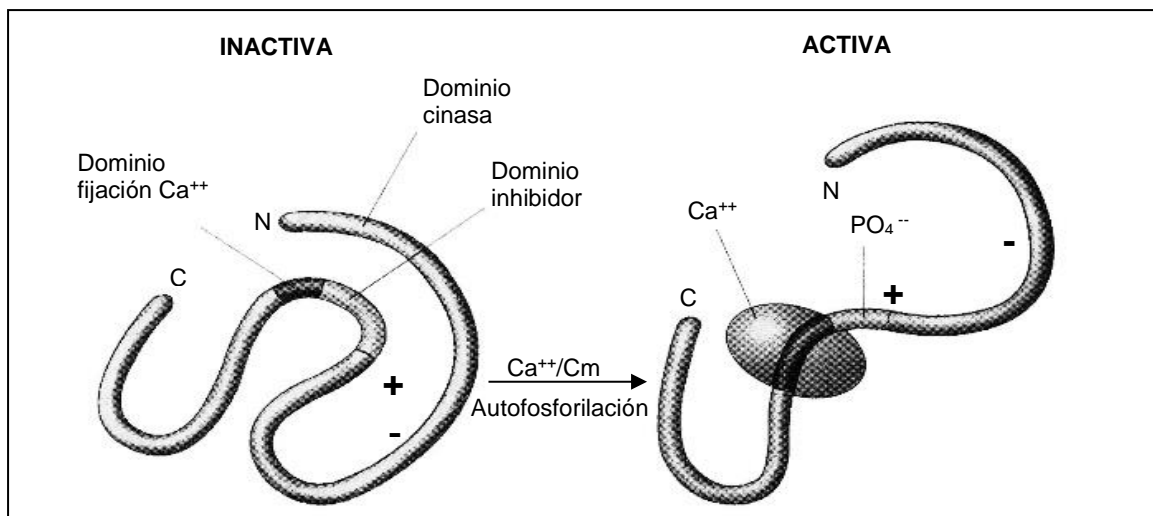


Figura 13. Calmodulina. Modificada de Flórez J (323).

Las proteíncinasas estimuladas por el CaCm son al menos cinco, la más importante de las cuales es la proteíncinasa II dependiente del CaCm, también llamada multifuncional porque fosforila un amplio número de sustratos: enzimas como la tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, PLA₂, calcineurina (proteínofosfatasa 2B), la fosfodiesterasa, las CAM-cinasas I, II y III, receptores como el GABA_A, proteínas estructurales como la sinapsina 1, proteína activada por mitógenos 2 (MAP-2) y diversos neurofilamentos. Algunas de las proteínas fosforiladas por las cinasas CaCm-dependientes son idénticas a las fosforiladas por la PKA y PKC, pero el sitio o los sitios de fosforilación son diferentes y el resultado final puede ser sinérgico o antagónico. El CaCm controla los niveles intracelulares de AMPc y GMPc. La adenilato-ciclasa estimulada por el CaCm aumentará los niveles de AMPc y, a su vez, el AMPc estimulará las proteíncinasas AMPc dependientes. El CaCm estimula la guanilato-ciclasa, productora de GMPc, y la fosfodiesterasa que degrada el AMPc y el GMPc. El CaCm también interviene en los mecanismos de contracción por estimulación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina y en la regulación energética celular mediante la activación de la fosforilasacinasa y la inhibición de la glucógenosintasa (a través de proteíncinasas dependientes de AMPc) y la por activación de la nicotinamida-adenín-dinucleótido-cinasa (NAD-cinasa).

El CaCm actúa en los depósitos intracelulares de Ca²⁺, ya que media en la activación del receptor de Ry dependiente de ribosa-ADPc y de la ATPasa-Ca²⁺, y en la fosforilación del fosfolambano del retículo endoplásmico. El CaCm también interviene en la fosforilación

de membranas, en la liberación de neurotransmisores y modula los procesos de ensamblaje-desensamblaje de los microtúbulos *in vitro* (312, 343).

El CaCm no sólo interviene en los procesos metabólicos que acontecen en el citosol, sino que también está implicado en los sucesos que acontecen en el núcleo celular, como veremos posteriormente (343). La presencia de la Cm en el interior del núcleo ha sido demostrada mediante anticuerpos específicos anti-Cm (377).

Teniendo en cuenta todos los procesos metabólicos en los que está implicado el CaCm, podemos comprender el potencial antiproliferativo demostrado por algunos inhibidores del CaCm.

3.4.- SISTEMAS DE MOVILIZACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR.

3.4.1.- SISTEMA DE LAS PROTEÍNAS G.

Numerosos ligandos endógenos ejercen su acción celular mediante la interacción con receptores de membrana que están asociados a diversos tipos de proteínas fijadoras de GTP, que se denominan proteínas G, que a su vez están acopladas a un sistema efector.

El sistema formado por la secuencia receptor - proteína G - sistema efector es enormemente versátil. Actualmente se conocen más de un centenar de receptores que utilizan este sistema. Numerosos ligandos (acetilcolina, catecolaminas, histamina, serotonina, eicosanoides, glutamato, cannabinoides, GABA_B, nucleósidos y nucleótidos, hormonas peptídicas, neuropéptidos, etc) pueden activar el sistema mediante receptores específicos con la particularidad de que un mismo ligando puede hacerlo por varios subtipos de receptores.

Las proteínas G pertenecen a la superfamilia de proteínas GTPasas (su actividad se encuentra regulada, en parte, por la asociación con GTP y con GDP) y median la acción entre el receptor y el sistema efector. La estructura de las proteínas G consta de tres subunidades proteicas llamadas α , β y γ . La subunidad α es la mayor (39-52 kD), contiene el sitio al que se fija el GTP, posee la actividad GTPasa y desempeña un papel decisivo en la especificidad de todo el complejo. Se conocen al menos 20 formas distintas de subunidades α que se agrupan en cuatro familias (α_s , $\alpha_{i/o}$, α_q y α_{12}) de acuerdo con la homología de secuencias de aminoácidos y dan nombre a la proteína G. Las proteínas G_s y G_i activan e inhiben, respectivamente, la adenilciclase. La G_q estimula la PLC; la G_t o

transducina activa la GMPc-fosfodiesterasa en conos y bastones de la retina, y la G_o influye de diverso modo sobre canales iónicos (las proteínas G que contienen la subunidad α_{o1} inhiben los canales de Ca^{++} y activan los canales de K^+).

Los principales sistemas efectores de proteínas G son los sistemas de la adenilciclase (que catalizan la formación de AMPc), la PLC (que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol), la PLA_2 (que cataliza la hidrólisis por la que se libera el ácido araquidónico), la fosfolipasa D, la fosfodiesterasa (en células retinianas) y ciertos canales iónicos, incluidos los canales del Ca^{++} (323, 352).

3.4.2.- LOS SISTEMAS DE LAS ADENILCICLASAS.

Las enzimas adenilciclasas son glucoproteínas localizadas en las membranas de todo el organismo que generan AMPc a partir del ATP si hay Mg^{++} . Se han identificado hasta ocho isoformas de adenilciclasas que se agrupan en tres subfamilias. El Ca^{++} y las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G son los principales elementos reguladores de las adenilciclasas (323, 352).

La acción del AMPc consiste en la activación de diferentes proteíncinasas entre ellas una proteíncinasa específica llamada proteíncinasa dependiente de AMPc o PKA. Los sustratos de la fosforilación por la proteíncinasa dependiente de AMPc son un grupo numeroso de proteínas, unas son de carácter enzimático y su fosforilación significa, según los casos, el paso a un estado de actividad o de inhibición, otras son de carácter estructural y su fosforilación provoca modificaciones funcionales de actividad. La distribución de estas proteínas en la célula es enormemente variable de acuerdo con la naturaleza y especialidad de la célula en cuestión. Por ello, las consecuencias de su fosforilación son múltiples y se manifiestan de modo diverso:

-Modificaciones de canales iónicos, que originan trasiego iónico y fenómenos de despolarización o hiperpolarización, y otros fenómenos consiguientes al incremento en la concentración de un determinado ion (Ca^{++}).

-Activación o desactivación de enzimas reguladoras del metabolismo de los principios inmediatos.

-Cambios en el estado fisicoquímico de proteínas tisulares fibrilares que, en cooperación con el movimiento de Ca^{++} , configuran su estado de contracción o relajación.

-Alteración en la síntesis de determinados neurotransmisores.

-Modificaciones en los movimientos de Ca^{++} intracelular, con la consiguiente repercusión

sobre muchos otros procesos celulares, como la exocitosis, la transmisión, la contracción, etc.

-Modificaciones sobre la expresión de genes, a nivel postranscripcional o postranslacional.

3.4.3.- EL SISTEMA DE FOSFOINOSÍTIDOS.

Numerosos mediadores endógenos ejercen sus acciones mediante sistemas de segundos mensajeros en los que el complejo receptor - proteína G - sistema efector estimula el metabolismo y el recambio de fosfoinosítidos, unos fosfolípidos de membrana que contienen inositol. La proteína G es una G_q (presumiblemente también otras familias de proteínas G), con expresión generalizada en todo el organismo, y el sistema efector es una PLC isozima β_1 , enzima que hidroliza el enlace éster-fosfato de los fosfolípidos; en este caso, el fosfolípido sustrato es el fosfatidilinositol-4,5-bi-fosfato (PIP_2) y los productos resultantes de la hidrólisis en la membrana son el inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DG). Cada uno de ellos ejerce una función distinta como segundo mensajero. Actualmente se conocen al menos cuarenta receptores asociados a proteínas G que promueven la liberación de Ca^{++} a través de la activación de la $PLC\beta_1$ (352) (tabla 2). El sistema receptorial de la tirosinasa estimula también a la PLC isozima γ_1 originando igualmente IP_3 y DG; este sistema va a incrementar los niveles de Ca^{++} citosólico más lentamente que la vía de la $PLC\beta_1$, pero de manera más prolongada (323, 352, 356).

Por su fuerte carga eléctrica, el IP_3 abandona la membrana celular y emigra al citoplasma donde activa alguno de los cuatro tipos de receptores específicos de IP_3 situados en la membrana del retículo endoplásmico. Estos receptores funcionan como canales de Ca^{++} y al abrirse permiten la salida masiva de Ca^{++} al citoplasma, produciendo rápidos e intensos aumentos en su concentración. El Ca^{++} actuará entonces como tercer mensajero, uniéndose a la Cm. El $CaCm$ generado por la liberación intracelular de Ca^{++} puede promover secundariamente su penetración desde el espacio extracelular hasta el interior de la célula a través de los canales de la membrana citoplasmática (323, 325).

La acción movilizadora del IP_3 es potenciada por la existencia de su metabolito tetrafosforilado o inositol-1,3,4,5-tetrafosfato (IP_4), e incluso en algunas células la entrada posterior de Ca^{++} desde el exterior sólo se realiza si hay IP_4 . Pero, a su vez, el IP_4 no es activo si no es en presencia de su precursor. Ambos, pues, pueden considerarse segundos mensajeros con acción sinérgica en una misma dirección. En membranas de

retículo endoplásmico se han detectado receptores específicos para cada uno de los dos inositoles.

El otro producto resultante que actúa como segundo mensajero es el DG que permanece en la membrana, donde estimula la actividad de la PKC. La PKC representa a una familia de enzimas fosforilantes activadas por ciertos lípidos de membrana. Algunas de sus isozimas (α , β y γ) son también dependientes de Ca^{++} . Antes de su activación, la PKC se encuentra en el citoplasma en forma inactiva, pero cuando aumenta la concentración intracelular de Ca^{++} por el efecto movilizador del IP_3 , antes explicado, la PKC es transferida a la membrana celular. Allí es activada al fijarse a los fosfolípidos, fijación que es reforzada o estimulada por el DG, razón por la cual se le considera indispensable para la plena activación de la enzima. Hay, pues, una acción sinérgica entre $\text{IP}_3/\text{Ca}^{++}$ y DG, rasgo peculiar de este sistema de segundos mensajeros.

Los sustratos de la PKC son proteínas muy diversas: canales iónicos, receptores de diversos mediadores, enzimas, la neuromodulina GAP-43, etc. El resultado es enormemente amplio y abarca fenómenos relacionados con la secreción celular, activación de plaquetas, regulación de la expresión de genes, crecimiento celular, diferenciación, metabolismo, potenciación de la transmisión nerviosa, etc. La PKC también puede fosforilar el factor de transcripción CREB en el núcleo y de ese modo iniciar la transcripción genética y por tanto la proliferación celular. La actividad de la PKC termina con el metabolismo del IP_3 y posterior resíntesis del PIP_2 .

3.4.4.- EL SISTEMA DE LA FOSFOLIPASA A_2 .

El metabolismo del DG puede originar ácido araquidónico y la consiguiente síntesis de eicosanoides, pero el ácido araquidónico también puede ser liberado a partir de otros fosfolípidos de membrana, como la fosfatidilcolina mediante la acción de la enzima PLA_2 . Esta enzima es activada, una vez más, tras la acción sobre receptores específicos y la implicación de proteínas G. Se trata, pues, de otra vía de señalización en la que el sistema efector está constituido por el ácido araquidónico y sus derivados eicosanoides. El ácido araquidónico puede comportarse como un segundo mensajero, ya que por sí mismo consigue activar la PKC y la PLC, puede incrementar la concentración de Ca^{++} y modular la actividad de varios canales iónicos, entre ellos los canales del Ca^{++} , sin necesidad de recurrir al sistema de fosfoinosítidos.

3.5.- PAPEL DEL CALCIO EN LOS PROCESOS REPARATIVOS CICATRICIALES.

El Ca^{++} es esencial para el crecimiento, diferenciación, proliferación y supervivencia celular y juega un papel central en muchos de los procesos intracelulares implicados en la reparación cicatricial. A nivel celular, el Ca^{++} actúa como un mensajero intracelular y como efector en múltiples e importantes aspectos del metabolismo de diferentes células, entre ellas los fibroblastos (352). El hecho de que la concentración de Ca^{++} intranuclear aumenta de forma dramática tras la estimulación mitogénica, sugiere claramente que el Ca^{++} también actúa en el interior del núcleo (378).

El CaM va a ser el principal mediador de los efectos metabólicos del Ca^{++} en relación con el proceso cicatricial. El CaM regula la actividad de gran número de proteínas de carácter enzimático (adenilciclasas, proteíncinasas, fosfodiesterasas, fosfolipasas, etc) y de naturaleza estructural necesarias para la proliferación celular (42).

El CaM estimula la adenilatociclasa que aumentará los niveles de AMPc; el AMPc estimulará las proteíncinasas AMPc dependientes, las cuales fosforilarán las proteínas necesarias para la síntesis de ADN (375). Tanto el AMPc, como en propio Ca^{++} , son segundos mensajeros encargados de la transmisión de señales necesarias para que en el núcleo celular se activen los procesos de expresión genética (379). Estas señales convergen en varios sistemas de activación genética; los dos mejor conocidos son el CREB y el SRE (figura 14).

Los genes inducidos por ligandos que inicialmente activan la vía del AMPc poseen una secuencia de ADN denominada CRE (*cAMP response element*) o elemento de respuesta al AMPc. El CRE no es más que una parte del promotor (secuencia inicial del ADN de un gen implicada en la facilitación e iniciación de su transcripción). Los ligandos que generan la formación de AMPc activan la PKA; esta cinasa penetra en el núcleo donde fosforila la serina 133 de una proteína nuclear denominada CREB (*CRE binding*), denominada así porque, al ser fosforilada, se fija a la secuencia CRE de un gen particular y estimula el proceso de transcripción genética. Esta proteína CREB es también activada por proteíncinasas dependientes del CaM, la PKC, etc (380).

El Ca^{++} también puede activar la expresión genética a través del SRE (*serum response element*), una proteína que se encuentra fijada a una secuencia de ADN reguladora de las transcripción de múltiples genes (344, 345).

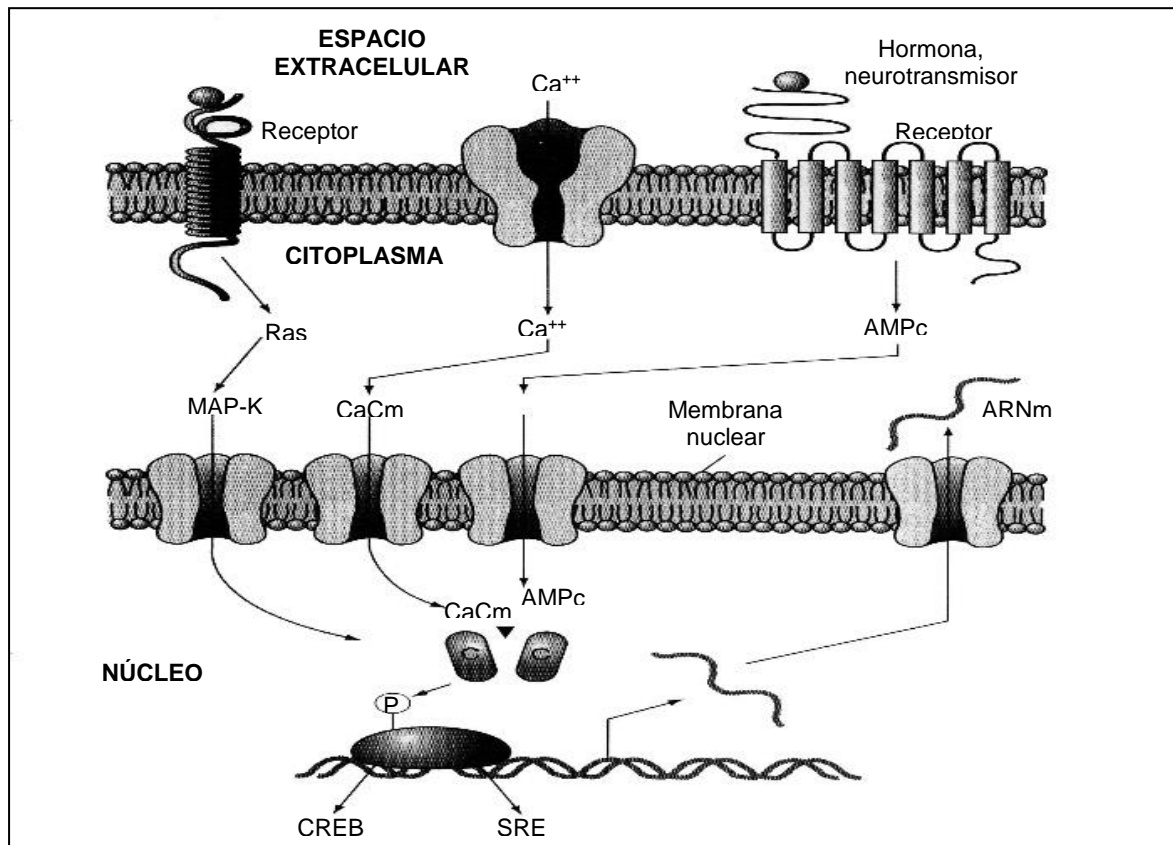


Figura 14. Acciones del Ca^{++} , $CaCm$ y AMPc como segundos mensajeros para la transmisión de señales al núcleo celular y activación de los sistemas CREB y SRE. Modificada de Flórez J (323).

En la actualidad se conocen más de 100 genes en cuya transcripción están implicados el Ca^{++} y el AMPc a través del CREB o del SRE. Estos genes corresponden a (344):

- Factores de crecimiento: FGF6, TGF β 3, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), proteína del crecimiento de respuesta temprana (Krox-24), proteína humana del crecimiento de respuesta temprana (EGR2).
- Factores inmunorreguladores: IL-2, IL-6, factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF), la ciclooxigenasa 2 (COX-2) o el receptor α de los linfocitos T (TRA α).
- Factores de transcripción genética: los propios CRE y SRE, factor activador de la transcripción 3 (ATF3), factor de respuesta de la fase aguda para la transcripción 3 (Stat3), etc.

-Factores implicados en el ciclo celular, la supervivencia celular y la reparación del ADN: Ciclinas A1 y D1, antígeno nuclear de la proliferación celular (PCNA) y múltiples genes tumorales.

-Neurotransmisores y neuropéptidos: Vasopresina, glucagón, somatostatina, receptor de la sustancia P, etc.

-Proteínas implicadas en la regulación del Ca^{++} : Calmodulina 1, calreticulina, calbindina 1, 2 y 3, etc.

El CaM también está directamente implicado en los procesos de mitosis y movilización cromosómica. La presencia de la Cm en el interior del núcleo de células en división mitótica *in vitro*, ha sido demostrada mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos antiCm (377).

La concentración de Ca^{++} intracelular y la vía de entrada de Ca^{++} al citosol se correlacionan con el grado de expresión de factores de transcripción genética en células aisladas en cultivo (381). En los fibroblastos, la entrada de Ca^{++} desde el exterior está controlada principalmente por los CCVD-T y -L (382). La entrada de Ca^{++} a través de los canales de NMDA y CCVD-L inicia la transcripción genética activando diferentes elementos reguladores del ADN (383). La reducción del flujo de entrada de Ca^{++} en la célula, bien por una reducción de la concentración extracelular de Ca^{++} o por la acción de un bloqueador de sus canales de membrana (384), se traduce en una marcada reducción del crecimiento celular.

El Ca^{++} también regula la proliferación fibroblástica por su interacción directa con el ARN. El Ca^{++} al unirse a la doble hebra de ARN (dsARN), poly(dA) y poly(dT) de ARN de bajo peso molecular induce la proliferación fibroblástica y los complejos Ca^{++} -dsARN inducen la síntesis de proteínas que estimulan la diferenciación fibroblástica. Este hecho puede ser sustentado por el hallazgo de que estos complejos estimulan la transcripción de los genes c-fos y c-jun en fibroblastos. El Ca^{++} contribuye a la translocación desde el citoplasma al núcleo de diferentes factores de transcripción genética (NF-AT y NF-IL2A entre otros). El Ca^{++} va a activar la MAP2-cinasa que forma parte de la cascada de fosforilación que culmina con la activación de varios factores promotores de la síntesis de ADN (385).

El Ca^{++} puede afectar al ciclo celular de diferentes formas. La depleción de los depósitos de Ca^{++} a través de la activación de los receptores de IP_3 puede bloquear el ciclo celular en fase G0/G1 y S. La transición entre las fases G0 y G1 en células eucariotas y levaduras requiere la acción de la calcineurina (o fofatasa 2B) dependiente de Ca^{++} (386). Además la Cm ha demostrado ser necesaria durante la fase G1 del ciclo celular y, durante

esta fase, juega un importante papel en la estimulación de los factores promotores de la síntesis de ADN (387).

La calreticulina, inicialmente considerada como una proteína tamponadora de Ca^{++} , también regula la actividad de los receptores nucleares de glucocorticoides (388).

El Ca^{++} estimula, al menos, cinco tipos de proteíncinasas, la más importante de las cuales es la proteíncinasa II o proteíncinasa dependiente del Ca^{++} , también llamada multifuncional porque fosforila un amplio número de sustratos: enzimas como la tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, PLA_2 , calcineurina (proteínfosfatasa 2B) y fosfodiesterasas implicadas en la síntesis proteica, y proteínas estructurales como la sinapsina 1, MAP-2 y diversos neurofilamentos. La proteíncinasa II aumenta la actividad de la PLA_2 , para facilitar la formación de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática (323).

La PKC es otra de las proteíncinasas dependientes de AMPc. Sus isoenzimas α , β y γ son dependientes de Ca^{++} (son directamente activadas por el Ca^{++}), tienen un papel vital en la proliferación celular como hemos visto anteriormente (42). La inhibición de la PKC puede ser uno de los principales mecanismos por los que los inhibidores de los canales del Ca^{++} inhiben la proliferación fibroblástica. Los fibroblastos deficientes en PKC o tratados con el inhibidor de la PKC, H-7, presentan un defecto en su proliferación tras ser estimulados con el FGF y el activador del plasminógeno, factores éstos con importante poder mitogénico. Los ICC han mostrado capacidad de inhibición en la expresión del gen del enzima hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA-R) en fibroblastos cutáneos, estimulados con el isómero BB del PDGF. La HMG-CoA-R y sus productos, que incluyen el isopentanolil ARN-t, dolicol, lamin B, H-ras y proteínas G, juegan un importante papel en la proliferación celular. El isómero BB del PDGF estimula específicamente la expresión del gen de la enzima HMG-CoA-R presumiblemente mediante el incremento en los niveles de IP_3 que producen un incremento en la concentración de Ca^{++} intracelular y activación de la PKC. A su vez, la PKC ha demostrado controlar la expresión de la HMG-CoA-R. El efecto mitogénico del PDGF puede ser explicado por su acción activadora de la PKC y el incremento en la expresión del gen de la HMG-CoA-R. Los ICC pueden inhibir la proliferación celular al disminuir la activación de la PKC y consecuentemente por la disminución de la expresión de la HMG-CoA-R.

El Ca^{++} también estimula la tromboxano sintetasa e inhibe la oxidación de las prostaglandinas. Estas dos últimas acciones junto con la estimulación de la PLA_2 incrementan los niveles de prostaglandinas bioactivas, las cuales estimulan la adhesión y proliferación fibroblástica, así como a la cicatrización en general. El ácido araquidónico es

el precursor de las prostaglandinas y leucotrienos, los dos mayores mediadores de la respuesta inflamatoria. Las prostaglandinas afectan al flujo sanguíneo local y a la agregación plaquetaria. Los leucotrienos atraen leucocitos, facilitan su adhesión al endotelio vascular y aumentan la permeabilidad vascular. El tromboxano A_2 se une a un receptor de la membrana citoplasmática de las plaquetas, estimulando la activación plaquetaria y la liberación de varios factores que amplifican la respuesta cicatricial.

La PLC cataliza el metabolismo del fosfatidilinositol trifosfato para formar IP_3 y DG. El IP_3 promueve la liberación del Ca^{++} intracelular desde el retículo endoplásmico al citoplasma y el paso de Ca^{++} extracelular a través de los canales de Ca^{++} de la membrana citoplasmática. El DG estimula la PKC la cual, a su vez, activa las proteínas necesarias para la proliferación celular.

El Ca^{++} también está implicado en otros procesos relacionados con la cicatrización y que indirectamente estimulan la proliferación fibroblástica, como es la activación plaquetaria. Tras producirse la lesión tisular, las plaquetas son activadas para liberar el contenido de sus gránulos intracitoplasmáticos que contienen fibronectina, serotonina y PDGF. Todos estos mediadores actúan sobre los fibroblastos y por diferentes mecanismos contribuyen al proceso de cicatrización. La fibronectina favorece la adhesión del fibroblasto al tejido dañado. La serotonina aumenta la permeabilidad vascular. El PDGF estimula la proliferación fibroblástica y la producción de tejido conectivo.

El estudio de los ICC ha ayudado a aclarar el notable papel que juega el Ca^{++} en la activación plaquetaria. Existen tres mecanismos principales por los cuales estos fármacos pueden inhibir la activación plaquetaria: por bloqueo del flujo de Ca^{++} a través de la membrana citoplasmática, inhibiendo la síntesis de tromboxano A_2 que es el principal factor estimulador de la activación plaquetaria y tromboxano B_2 , o inhibiendo la actividad de la PKC. Numerosos estudios han demostrado que algunos bloqueadores de los canales del Ca^{++} , como VPM, DTZ, nifedipino (NIF), nisoldipino (NIS) o amlodipino inhiben la activación plaquetaria (389). El VPM ($DI_{50} = 0,75$ mM) y el DTZ (300 mM causan $45 \pm 8\%$ de inhibición de la agregación) inhiben la agregación plaquetaria inducida por la serotonina (390). El VPM puede inhibir la agregación plaquetaria tanto por un mecanismo Ca^{++} -independiente, como a través del bloqueo del Ca^{++} (391-393). Por la inhibición de la activación plaquetaria, un hecho precoz y fundamental en el proceso de reparación cicatricial, los ICC, de forma indirecta, inhiben la proliferación fibroblástica.

El CaM está íntimamente asociado con las proteínas fijadoras de actina y activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina; estas dos proteínas están implicadas en control de los mecanismos de contracción y motilidad celular que se producen durante la

cicatrización (311). Algunos bloqueadores inorgánicos de los canales del Ca^{++} como el Sr^{++} , son capaces de inhibir los procesos de migración celular de queratinocitos *in vitro* (394).

Los procesos inflamatorios e inmunitarios implicados en la regulación del proceso cicatricial están modulados directa o indirectamente por el Ca^{++} . Como hemos visto anteriormente varios genes de citoquinas (IL-2 e IL-6) inician su transcripción por la estimulación del CaCm. Ha sido demostrada una relación directa entre la concentración intracelular de Ca^{++} e IL-1, y entre la liberación de $\text{IF}\gamma$ por los linfocitos y macrófagos peritoneales con la proliferación fibroblástica peritoneal *in vivo*. IL-1 e $\text{IF}\gamma$ son dos importantes mediadores de la respuesta inmune y ambos estimulan la proliferación fibroblástica y, por lo tanto, la cicatrización. Tras la estimulación mitogénica los linfocitos presentan incrementos transitorios y repetitivos de los niveles de Ca^{++} intracelular e intranuclear. La estimulación antigénica del linfocito, promueve la activación del sistema de fosfoinosítidos- Ca^{++} que contribuye a la transcripción genética en la fase G1 (378).

Diferentes estudios han demostrado que el Ca^{++} es necesario para la reanudación de los procesos meióticos en los oocitos de diferentes especies; las ondas bioeléctricas producidas por la liberación de Ca^{++} favorecen la reanudación de la meiosis y el inicio de la mitosis. En los oocitos de *Xenopus laevis*, la reanudación de la meiosis está directamente mediada por la acción de la proteínkinasa $\text{II}\alpha$ dependiente del CaCm (395). La presencia de Ca^{++} intracelular liberado a través de la mediación de IP_3 , es también necesaria para la división mitótica que sigue a la fertilización (396).

El sistema de fosfoinosítidos- Ca^{++} es activado por múltiples estímulos mitogénicos externos y contribuye a la transmisión de estas señales desde la membrana citoplasmática al núcleo y a los cambios necesarios que preceden a la síntesis de ADN. Además, el núcleo celular contiene un sistema autónomo de señalización de fosfoinosítidos tan complejo como el situado en la membrana plasmática. El núcleo contiene las cinasas necesarias para fosforilar el inositol-4-monofosfato y el inositol-4,5-difosfato presentes en la membrana nuclear y en la matriz nuclear, que también contiene $\text{PLC}\beta$ (365). Este sistema puede estar implicado en la liberación del Ca^{++} almacenado en el espacio comprendido entre la doble membrana nuclear.

Algunos datos experimentales demuestran el papel del sistema de fosfoinosítidos- Ca^{++} en los procesos de proliferación celular. La toxina de *Pasteurella multocida* es una gran estimuladora del sistema de fosfoinosítidos y, a su vez, es un potente mitógeno (397). Además, la proliferación fibroblástica puede ser inhibida por anticuerpos dirigidos contra el

inositol-4,5-difosfato o contra la PLC, mientras que la inyección intracelular de PLC β o PLC γ estimula la síntesis de ADN (398).

El incremento del Ca⁺⁺ intranuclear no sólo inicia la expresión genética y estimula la progresión del ciclo celular, sino que también puede activar los procesos degradativos implicados en la muerte celular programada o apoptosis. Cuando los altos niveles de Ca⁺⁺ intranuclear se mantienen en el tiempo se estimula la actividad de las endonucleasas que digieren el ADN e, indirectamente, la activación de proteasas, fosfatasas y fosfolipasas dependientes de Ca⁺⁺, desemboca en la pérdida de la integridad estructural de la cromatina (399).

Dado que el Ca⁺⁺ juega un papel vital en los mecanismos de proliferación celular, parece lógico pensar que la inhibición del flujo de Ca⁺⁺, mediante un agente que bloquea los canales específicos para este ion pueda inhibir estos procesos.

4.- FÁRMACOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO.

4.1.- CONCEPTO, CLASIFICACIÓN E INDICACIONES DE LOS ANTAGONISTAS DEL CALCIO.

Los antagonistas del Ca⁺⁺ son un amplio y heterogéneo grupo de fármacos cuya acción primaria es la de interferir directamente la acción del Ca⁺⁺, e impedir en último término que el Ca⁺⁺ llegue a cumplir su papel fisiológico. Los ICC son un grupo de fármacos sobre los que se dispone una prolongada experiencia en el tratamiento de diversos procesos, principalmente del aparato cardiovascular.

El mecanismo de actuación fundamental de estos fármacos es inhibir el flujo de entrada de Ca⁺⁺ a través del llamado canal lento de Ca⁺⁺ (CCVD-L). Por eso estos fármacos son denominados “bloqueantes del canal lento del calcio” o “bloqueantes de la entrada de calcio”. Aunque la mayoría de los fármacos incluidos en este grupo comparten esta acción fundamental, difieren en varios aspectos: potencia, selectividad por el tejido o célula, mecanismo por el que actúan, y otros posibles efectos independientes de su acción sobre el CCVD-L. En este sentido, existen fármacos que actúan regulando los niveles de Ca⁺⁺ citoplasmático, sin que su mecanismo de actuación principal interfiera con el transporte de Ca⁺⁺ en los CCVD-L. Estos fármacos controlan la movilización del Ca⁺⁺ desde los depósitos intracelulares y se denominan “moduladores del calcio”. Algunos ICC, como el NIF o el VPM, han sido capaces de reducir la entrada de Ca⁺⁺ por un posible bloqueo de los canales de Ca⁺⁺ de la membrana sensibles al estiramiento (60).

Atendiendo a las clasificaciones realizadas por Spedding, Ebadi y Lüscher, podemos considerar tres grandes grupos de inhibidores del calcio (332, 400, 401) (tabla 6):

-Clase 1: Agentes selectivos de los CCVD-L: Incluye tres subgrupos:

- a. Dihidropiridinas.
- b. Benzotiazepinas.
- c. Fenilalquilaminas.

-Clase 2: Agentes que actúan frente a otros canales del calcio o agentes no selectivos.

-Clase 3: Moduladores del calcio.

Existen marcadas diferencias entre los antagonistas del Ca^{++} para ejercer sus efectos en los diversos tejidos y territorios. Esto puede depender del número de canales de Ca^{++} y de receptores o sitios de fijación que haya en un lugar determinado, y de su afinidad por cada fármaco, de la capacidad de bloqueo que cada fármaco tenga, de la importancia que dicho bloqueo tenga en relación con la función de la célula y de las propiedades farmacocinéticas del fármaco que condicionan su acceso a un determinado territorio. Ocurre, además, que algunos de ellos pueden ejercer acciones complementarias a determinadas dosis, como por ejemplo, inhibición de los canales rápidos de Na^+ o antagonismo sobre otros tipos de receptores.

Tabla 6. Clasificación de los antagonistas y moduladores del calcio.

CLASE 1: BLOQUEADORES SELECTIVOS DE LOS CANALES DEL CALCIO TIPO L

a) Derivados de la papaverina o fenilalquilaminas (grupo I de la OMS):

Verapamil	Gallopamil	Tiapamil	Anipamil
Devapamil	Emopamil	Desmetoxiverapamil	Ronipamil
Falipamil	Levemopamil		

b) Derivados de la dihidropiridina (grupo II de la OMS):

Nifedipina	Nicardipina	Felodipina	Riosidine
Isradipina	Nitrendipina	Nisoldipina	Pranidipina
Nimodipina	Nilvadipina	Manidipina	Barnidipina
Amlodipina	Lacidipina	Niludipina	Flordipina
Darodipina	Nivadipina	Oxodipina	Iodipina
Mesudipina	Amiodipina	Dazodipina	Lercanidipina
Niguldipina	Riodipina	Azodipina	Cilnipidino (L y N)
Azelnidipino	Clevidipino	Benidipino	

c) Derivados de la benzotiacepina (grupo III de la OMS):

Diltiazem	Fostedilo	Clentiazem
-----------	-----------	------------

CLASE 2: BLOQUEADORES NO SELECTIVOS DE LOS CANALES DEL CALCIO

a) Derivados piperacínicos o difenilalquilaminas (grupo IV de la OMS):

Flunarizina (T)	Cinaricina	Lidoflacin
Urapidil	Trifluoperazina	Clorpromazina
Lomerizina	Dotarizina	

b) Tipo prenilamina (grupo V de la OMS)

Prenilamina	Fendilina	Terodilina
-------------	-----------	------------

c) Miscelánea; otros inhibidores y moduladores de los canales del calcio (grupo VI de la OMS):

-Tipo fenilalquilamina/benzoimidazol: Mibefradil

-Inhibidores no selectivos de los canales del Ca⁺⁺ que actúan sobre el canal del Na⁺:

Bepidilo	Caroverina	Proadifen
Etafenona	Perhexilina	Amilorida (T)

-Inhibidores no selectivos de los canales del Ca⁺⁺ con otras acciones primarias:

Sobre canales de Na⁺: Anestésicos locales y Fenitoína

Sobre receptores de benzodiazepinas: Diazepam y Flurazepam

Sobre receptores opiáceos: Loperamida y Fluperamida

Sobre fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos: Amrinona, Cromoglicato y Papaverina

Sobre receptores de catecolaminas: Benextramina, Nicergolida, Fenoxibenzamida, Pimozida, Propranolol, Fenotiazinas, derivados de la yohimbina

-Otros:

	Fantofarone	
Lantano (no selectivo)	Monatepil	Molsidomina
Amiodarona (no selectivo)	Neomicina sulfato (no selectivo)	Floretin (L)
1-Octanol (T)	Reserpina	Ciproheptadina
Indometazina	Barbitúricos	Troglitazone (T y L)
Sensit	Tetrandina	Baclofén (L y N)

Tabla 6. Clasificación de los antagonistas y moduladores del calcio (continuación).

CLASE 3: MODULADORES DEL CALCIO

a) Reguladores de los depósitos y niveles de calcio intracelular:

Diltiazem	Amiodarona (no selectivo)	Ryanodina (Ry)
Thapsigargin (moviliza Ca ⁺⁺)	Thapsigargin (moviliza Ca ⁺⁺)	Xestospongina
Heparina	Decavanadato	Cafeína
ADP-ribosa		

b) Antagonistas de la calmodulina:

Fenotiacinas (Trifluoperazina, Flufenazina, Clorpromazina)
Antagonistas dopaminérgicos neurolepticos (Pimozida, Haloperidol)
Difenilalquilaminas (Flunarizina)
Anestésicos locales (Dibucaína)
Sulfonamidas (W-7, N-Dansylcadaverina, N-TIPS-Cadaverina)
Otros: Tamoxifeno, Prenilamina, Bepridilo, Calmidazolium, Melittin, Ophiobolin A, Enniatina, Ionomicin, Quinacrina

c) Toxinas y venenos de animales:

ω -Agatoxina IVA (P)	ω -Agatoxina TK (P, Q)	Ochratoxina A
ω -Conotoxina MVIIA (N)	ω -Conotoxina SVIIB (N)	Taicatoxina (L)
Calciseptina (L)	Imperatoxina A (Ry)	Calciclutina I y II (L, N, P)
Melittin	ω -Conotoxina GVIA (neurona, no musc)	
ω -Conotoxina MVIIC (Q)	Maitotoxina	

d) Inhibidores del intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺:

Amilorida (inhibe liberación de Ca⁺⁺ del retículo sarcoplásmico y los CCVD-T)
Dantroleno y Azumoleno (inhibe liberación de Ca⁺⁺ del retículo sarcoplásmico)
Rutenio rojo (mitocondria)
Acido ciclopiazónico (moviliza Ca⁺⁺; inhibe ATPasa de los retículos sarcoplásmico y endoplásmico)
Bepridilo

e) Anticuerpos monoclonales específicos:

-Anticuerpos monoclonales específicos de los canales del calcio:

Ac anti subunidad α_1 , α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} , β .

-Anticuerpos monoclonales específicos de receptores:

Ac anti receptor de DHP, anti receptor IP3 tipo I, anti receptor de Ryanodina

-Anticuerpos monoclonales específicos de proteínas fijadoras del calcio:

Ac anti Calmodulina, anti Calbindina, anti Calcineurina (subunidad α y subunidad β), anti Parvalbúmina

-Otros:

Ac anti ATPasa Na⁺/Ca⁺⁺

f) Quelantes del Ca⁺⁺:

Ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA)
Ácido amino-fenoxietano-tetraacético (BAPTA)
Ácido etilen-glicolaminoetileter-tetraacético (EGTA)

g) Agonistas o promotores del Ca⁺⁺:

Dihidropiridinas (Bay K8644)	Ionóforos (Ionomicina)	Inositol-1,4,5-trifosfato (IP ₃)
FPL 64176 (activador L)	Flumazenil	

Las principales indicaciones de los ICC son las siguientes (41, 330, 400):

-Aplicaciones en el aparato cardiovascular:

- *Hipertensión arterial.
- *Cardiopatía isquémica.
- *Arritmias cardíacas.
- *Algunos casos de insuficiencia cardíaca.
- *Miocardiopatía hipertrófica.

*Aterosclerosis.

*Ciertos casos de hipertensión pulmonar primaria.

*Enfermedad de Raynaud.

*Tromboangeítis obliterante.

*Procesos cerebrovasculares: Vasoespasmo reflejo de las hemorragias subaracnoideas, accidentes cerebrovasculares isquémicos en fase aguda, profilaxis de la migraña clásica, insuficiencia cerebrovascular, vértigo, sordera, nistagmus vestibular, etc.

*Indicaciones por sus efectos renales (efecto nefroprotector): Hipertensión vascularrenal e hipertensión en pacientes que no siguen restricción en la dieta (por su efecto natriurético), antes y después del trasplante renal.

-Aplicaciones no cardiovasculares:

*Digestivas: Acalasia y espasmos esofágicos.

*Urológicas: Incontinencia urinaria, enuresis nocturna, vejiga irritable, adenoma prostático con hiperreactividad del músculo detrusor.

*Ginecológicas: Dismenorrea y amenaza de parto prematuro.

En Oftalmología los ICC han sido utilizados en el glaucoma con tres aplicaciones potenciales (402):

-Como hipotensores oculares por su capacidad para facilitar el drenaje del humor acuoso.

-Como favorecedores de la perfusión sanguínea del nervio óptico en pacientes con glaucoma normotensivo, por su efecto vasodilatador al relajar las fibras musculares lisas vasculares.

-Como neuroprotectores por su modulación en la homeostasis del Ca⁺⁺ intracelular.

Monica (403) encontró diferencias significativas en la PIO de pacientes con hipertensión arterial esencial 1 y 2 horas después de recibir una dosis oral de 20 mg de nitrendipino (NIT). Abelson (404) determinó la capacidad para reducir la PIO del VPM en instilación tópica ocular (1,25 mg/ml) en pacientes con hipertensión ocular. El potencial hipotensor ocular dosis-dependiente del DTZ en administración tópica ha sido recientemente demostrado por Melena en un modelo experimental de hipertensión ocular farmacológica con betametasona en conejos (405). La administración tópica de VPM al 0,25% también se ha mostrado eficaz para reducir la PIO y la presión venosa episcleral en sujetos normotensos oculares (406). En un estudio reciente, Siegner (407) estudió en primates el potencial hipotensor ocular de seis ICC (VPM, NIF, DTZ, flunarizina, prenilamina y perhexilina) de forma aislada o en combinación con los hipotensores oculares habituales. Todos los fármacos por separado redujeron la PIO tras su administración tópica ocular. Combinaciones de VPM con timolol y clonidina produjeron un efecto hipotensor ocular aditivo. La combinación de VPM con pilocarpina o bromuro de demecario presentó un efecto sinérgico y un efecto hipotensor ocular muy superior. Por el contrario, otros autores han detectado incrementos en la PIO en sujetos normotensos oculares tras la administración tópica de VPM (408).

La administración de VPM tópico se ha mostrado eficaz para incrementar la velocidad del flujo sanguíneo capilar en la porción anterior del nervio óptico en sujetos normotensos oculares (100). El nilvadipino por vía intravenosa incrementó la velocidad del flujo sanguíneo papilar, coroideo y retiniano en un modelo experimental en conejos y su administración oral en sujetos normotensos oculares incrementó la velocidad del flujo sanguíneo papilar (102). Nicardipino (NIC) también incrementó el flujo sanguíneo papilar en un modelo experimental en gatos, pero no mejoró el flujo sanguíneo retiniano (409). Kitazawa (101) evaluó prospectivamente la evolución del campo visual en pacientes con glaucoma normotensivo tratados con 30 mg/día de NIF por vía oral durante 6 meses. Los factores asociados a la mejoría campimétrica fueron la menor edad, una sensibilidad media de su campo visual inicial superior, unos niveles de PIO más bajos y menores descensos de la presión arterial diastólica tras la administración de NIF. Por el contrario, Rainer no encontró efectos beneficios con la administración de NIF vía oral en la progresión del campo visual y en la perfusión ocular de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (410).

4.2.- INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO DE CLASE 1.

4.2.1.- MECANISMO BÁSICO DE ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO DE CLASE 1.

La acción fundamental de los inhibidores del calcio de clase 1 es bloquear el CCVD-L que en algunas células se abre en respuesta a la despolarización de la membrana celular. Esta acción se deduce de los siguientes hechos:

- En las células del marcapasos cardíaco (nodo SA) y del nodo AV deprimen la fase inicial de despolarización, que depende principalmente de la entrada de Ca^{++} .
- En las células miocárdicas deprimen especialmente la corriente de entrada iónica de la fase 2 del potencial de acción, que se debe a la entrada de Ca^{++} . Este efecto es particularmente visible si previamente se bloquea con tetrodotoxina el canal rápido de Na^+ responsable de la fase 0.
- En las células de músculo liso deprimen la fase de respuesta contráctil, generalmente la fase tónica, que está relacionada con el Ca^{++} extracelular, y no la que pueda depender de la movilización del Ca^{++} intracelular.
- La medición de la entrada de ^{45}Ca radiactivo en determinadas células demuestra que inhiben la penetración de este ion facilitada por un mecanismo excitador.

La selectividad de los bloqueantes del Ca^{++} por el CCVD-L se demuestra al comprobar que siguen inhibiendo la penetración de Ca^{++} aun cuando los demás posibles mecanismos de transporte se encuentren bloqueados con lantano. La base molecular de la selectividad de estos fármacos reside en la capacidad que tienen para interactuar a dosis muy bajas con sitios específicos (estereoespecificidad) presentes en los canales de Ca^{++} de la membrana citoplasmática y de otras membranas celulares. Sin embargo, los numerosos grupos farmacológicos propuestos como antagonistas del Ca^{++} muestran una enorme disparidad estructural, por lo que habría que pensar que los diversos fármacos abordan el canal de Ca^{++} de forma diferente y/o en sitios diferentes. Los estudios de fijación con radioligandos (*binding*) como la $[\text{}^3\text{H}^*]\text{-4-dihidropiridina}$, han servido para demostrar, por una parte, la acción sobre sitios específicos de las membranas, y, por otra, para confirmar la existencia de al menos tres sitios de fijación para los diversos grupos de bloqueantes del CCVD-L: uno para las dihidropiridinas, otro para el VPM y otro para el DTZ (411).

Los ICC se unen específicamente a receptores acoplados a la subunidad α_1 del

canal, pero esta interacción está modulada por el estado (reposo, activo, inactivo) del mismo. Los ICC presentan, en general, mayor afinidad por el estado inactivo, no-conductor, del canal que por los estados activo o de reposo. El estado inactivo del CCVD-L predomina al despolarizar el potencial de membrana o al prolongar la duración del potencial de acción. El bloqueo de la entrada de Ca^{++} producido por VPM y DTZ, no por las dihidropiridinas, aumenta marcadamente cuando lo hace la frecuencia de estimulación, es decir, cuantas más veces se abre el canal, mayor va a ser el bloqueo (bloqueo frecuencia-dependiente o uso dependiente). Las dihidropiridinas bloquean el CCVD-L en los estados abierto y de reposo. En general, los ICC son 100-2.000 veces más efectivos cuando el potencial de membrana es de -10 mV (el 70% de los canales están inactivados) que cuando es de -80 mV (la mayoría de los canales están en reposo), por lo que el bloqueo de la entrada de Ca^{++} producido es voltaje-dependiente.

La fijación de los antagonistas del Ca^{++} al CCVD-L es estereoespecífica, saturable y reversible, existiendo una correlación entre la capacidad de fijación y la actividad farmacológica del antagonista en dicho tejido. A concentraciones elevadas, superiores generalmente a las terapéuticas, algunos bloqueantes del Ca^{++} pueden ejercer otras acciones intracelulares relacionadas con este ion e independientes de su unión con los CCVD-L, como pueden ser: la inhibición de la liberación intracelular de Ca^{++} (DTZ), la facilitación de su salida al exterior, la interacción directa con la C_m (TFP), o incluso la inhibición de una fosfodiesterasa (39).

El VPM y la mayoría de los demás bloqueantes de Ca^{++} , muestran escasa capacidad de desplazar a las dihidropiridinas de sus sitios de fijación en el CCVD-L, y el DTZ prácticamente ninguna. El orden de potencia para desplazar a la [$^3\text{H}^*$]-nifedipina es el siguiente:

Nifedipina > verapamil $^{++}$ tiapamil $^{++}$ cinaricina = fendilina = flunaricina = prenilamina

Los antagonistas del Ca^{++} son capaces de bloquear los CCVD y los CCRD, si bien las concentraciones requeridas para bloquear uno u otro varían según el tipo de bloqueante utilizado y el territorio en que se encuentre la célula. Generalmente, los CCVD son más sensibles a los ICC que los CCRD, pero entre estos últimos existen notables diferencias según el tipo de agente y el territorio del organismo que se considere.

4.2.2.- LAS DIHIDROPIRIDINAS.

El NIF es el principal miembro del grupo de los derivados de la dihidropiridina (figura 15). Este grupo de fármacos ha visto incrementado su número por la constante

introducción de nuevos miembros (dihidropiridinas de segunda y tercera generación) que ofrecen un perfil farmacocinético más favorable o una mayor selectividad vasodilatadora en determinados territorios, como el nimodipino (NIM) en el sistema nervioso central.

Las dihidropiridinas son moléculas lipofílicas que a pH fisiológico se encuentran en un 90% en forma no ionizada. Su metabolismo es fundamentalmente hepático, comenzando con una reacción de oxidación, excluyendo los sistemas de las P450 monooxigenasas (412). Sus metabolitos se eliminan por orina.

Las dihidropiridinas bloquean la corriente de entrada de Ca^{++} cuando se administran desde el exterior, siendo inefectivas cuando se aplican intracelularmente. Ello sugiere que su punto de unión se encuentra en la superficie externa de la membrana y que la forma no ionizada accede al mismo directamente o a través de la superficie lipídica de la membrana por difusión lateral. El receptor de las dihidropiridinas ha sido localizado en una región hidrofóbica cercana a la superficie externa del canal en el lado extracelular de la membrana, que incluye el lazo que une los segmentos S5-S6 del dominio III (aminoácidos 1025-1040) y el segmento S4 del dominio IV (aminoácidos 1349-1391) de la subunidad α_1 (40, 41, 340).

Las dihidropiridinas se unen a su receptor en el CCVD-L independientemente del estado en que se encuentra el canal, si bien su afinidad parece aumentar cuando el CCVD-L se encuentra en estado inactivo. Por tanto, el bloqueo producido por las dihidropiridinas es mucho menos frecuencia-dependiente que el producido por el VPM y el DTZ. La evidencia de que en los CCVD-L existe un sitio específico que, al ser abordado por una dihidropiridina, controla el movimiento de Ca^{++} queda reforzada con el hallazgo de otra dihidropiridina, el Bay K8644 que, en lugar de bloquear el canal, lo abre y facilita la entrada de Ca^{++} (41).

La unión de las dihidropiridinas a su receptor se realiza con estricta estereoselectividad y correlación entre afinidad y actividad, medida como inhibición de la contracción. Pero esta correlación no se mantiene cuando se analiza la acción miotrópica negativa en células cardíacas. Esto puede depender del estado de afinidad (alta o baja) del sitio de fijación del CCVD-L, y de que la proporción de dichos estados varíe según el tejido.

En el sistema nervioso central se han identificado abundantes sitios de fijación saturables, estereoespecíficos y de alta afinidad para las dihidropiridinas, tanto para las que bloquean como para las que favorecen la penetración de Ca^{++} en otros tejidos. Su distribución es muy heterogénea, particularmente abundante en sitios de alta densidad sináptica, no existiendo correlación alguna con la distribución de otros neurotransmisores

conocidos, ni con el flujo sanguíneo en un territorio, ni con la utilización de glucosa. Tanto el número como la afinidad de estos sitios de fijación se encuentran sometidos a cambios de incremento y disminución en función de determinados tratamientos previos con fármacos homólogos y heterólogos. Por otra parte, se sabe que la penetración de Ca^{++} en las neuronas se realiza, entre otras vías, por CCVD que, según lo observado en el miocardio y la célula muscular lisa, son sensibles a los ICC. A pesar de estos hechos, sigue sin clarificarse una nítida relación entre los sitios de fijación de los antagonistas del Ca^{++} y los mecanismos que controlan el movimiento de Ca^{++} en las neuronas; de ahí que resulte difícil encontrar claras consecuencias funcionales a la presencia de estos antagonistas en el cerebro.

4.2.3.- EL DILTIAZEM (DTZ) Y EL VERAPAMILO (VPM).

El VPM es un derivado sintético de la papaverina (figura 15). Es metabolizado por el hígado estando implicado el citocromo P450. El receptor del VPM se encuentra en el dominio IVS6 de la subunidad α_1 (aminoácidos 1339-1354, 1382-1400) y se extiende a lo largo de un residuo de 43 aminoácidos cercanos a la boca intracelular del poro del canal (aminoácidos 1349-1391). Es posible que la fijación del VPM a su receptor provoque cambios alostéricos sobre el sitio de fijación de las dihidropiridinas modificando su afinidad (328, 332).

El DTZ es un derivado de la benzotiazepina (figura 15). Su metabolismo intracelular es complejo, desarrollándose a nivel mitocondrial, donde se relaciona con el citocromo P450 IIIA. El lugar de unión del DTZ al CCVD se localiza en la subunidad α_1 y se encuentra alostéricamente ligado al receptor de las dihidropiridinas. Su mecanismo básico de acción se centra en la estimulación de la fijación de las dihidropiridinas a su receptor en el CCVD-L. De forma similar a lo que ocurre con el VPM, la unión del DTZ con su receptor determinaría cambios conformacionales en el receptor de las dihidropiridinas que aumentarían su afinidad por éstas (332). Además, el DTZ es capaz de modular los niveles de Ca^{++} intracelulares regulando su liberación desde los depósitos intracelulares.

VPM y DTZ se encuentran ionizados a pH fisiológico ($\text{pK}_a = 8,5$), siendo menos efectivos para inhibir la corriente de entrada de Ca^{++} cuando se administran en la superficie de la membrana que cuando se inyectan directamente en el citoplasma. Ello indica que deben atravesar la membrana en su forma no cargada siguiendo una vía hidrofóbica y, una vez en el citoplasma, la forma cargada alcanza su receptor en el interior del canal preferentemente cuando éste se abre-activa.

4.2.4.- EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO DE CLASE 1.

El efecto antiproliferativo de este grupo de sustancias ha sido estudiado y demostrado extensamente en células del aparato cardiovascular, aunque este efecto se extiende a otras estirpes celulares.

En el aparato cardiovascular las acciones antiproliferativas de los ICC no son consecuencia de su acción vasodilatadora, ya que aparecen incluso a dosis subpresoras, sino de la capacidad para inhibir el aumento de la concentración de Ca^{++} intracelular de las células musculares cardíacas y lisas vasculares. El aumento de la concentración de Ca^{++} intracelular regula el tono vascular y es la vía final común por la que diversos agentes vasoactivos (noradrenalina, angiotensina II, endotelinas) y factores del crecimiento (PDGF, FGF, TGF- β) ejercen sus acciones vasoconstrictoras y tróficas. De hecho, el aumento de la concentración de Ca^{++} intracelular activa la cadena de la PKC, la expresión de los genes de respuesta inmediata (*fos*, *c-myc*, *arb-1*) y la síntesis de proteínas y ADN. Además, los ICC inhiben la agregación plaquetaria y la liberación de TXA_2 y de PDGF y aumentan la de PGI_2 y la captación y la degradación de moléculas de colesterol LDL (413). Estas acciones facilitan un predominio de los factores antiagregantes, vasodilatadores y antiproliferativos (41).

Todos los ICC revierten la lesiones ateroscleróticas en animales alimentados con dietas ricas en colesterol. Esta acción antiaterogénica es independiente de los cambios de presión arterial, se asocia a una reducción en la acumulación de Ca^{++} y colesterol en la pared vascular y es más marcada cuanto menos desarrollada es la lesión. Todo ello indica que estos fármacos podrían actuar modulando aquellas funciones que en condiciones fisiológicas están reguladas por la entrada de Ca^{++} a través de los CCVD-L (41).

En cultivos de células musculares lisas vasculares, los ICC inhiben la síntesis de ADN y proteínas, su diferenciación del fenotipo de contráctil a sintético y su migración y proliferación. Algunos también inhiben la proliferación de los fibroblastos, la síntesis de glucosaminoglicanos y de colágeno, la agregación plaquetaria y la infiltración de monocitos de la íntima vascular (41, 44).

Fuera del aparato cardiovascular, los ICC han sido estudiados por su potencial antiproliferativo en diferentes tipos celulares (414-418), incluidas las células oculares del epitelio pigmentario de la retina (EPR) (419).

Los ICC han demostrado su capacidad moduladora sobre algunos de los procesos de reparación tisular. Concentraciones nanomolares de amlodipino, felodipino, manidipino,

VPM y DTZ han demostrado su capacidad para inhibir el depósito de colágeno fibrilar de tipo I y III y colágeno de tipo IV en matrices extracelulares constituidas por células musculares lisas y fibroblastos humanos *in vitro* (420) y la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares (421).

Varios modelos de experimentación quirúrgica animal han demostrado que la aplicación de ICC puede inducir la reducción de los fenómenos cicatriciales consecuentes a la intervención. Steinleitner (422) demostró la utilidad de los ICC para prevenir la formación de adherencias intraabdominales tras la cirugía experimental en el conejo.

Gupta (313) estudió el potencial antiproliferativo del VPM en inyección subconjuntival (1,25 mg en 0,5 ml) durante los 6 días posteriores a la realización de cirugía filtrante en el conejo. El VPM superó al control en los valores tensionales y redujo significativamente la cicatrización en las muestras histológicas, sin mostrar signos de toxicidad importantes. Sin embargo, según este autor, el modelo experimental de cirugía filtrante no permite establecer el mecanismo exacto por el cual el VPM modula la respuesta cicatricial.

4.3.- SISTEMAS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE DIHIDROPIRIDINAS.

Los métodos descritos en la literatura para el análisis de ICC en matrices biológicas son muy variados: inmunológicos, espectrofotométricos y, fundamentalmente, cromatográficos: cromatografía de capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) (423).

La determinación de dihidropiridinas y sus metabolitos es complicada debido a la fotolabilidad y termolabilidad de algunos de estos compuestos. El NIF y el NIT han demostrado en diferentes estudios su inestabilidad en determinadas condiciones de luz y temperatura (424). La exposición a luz ultravioleta, luz solar o luz de fluorescente convencional produce su fotodescomposición. En dichas condiciones, la vida media de NIF es de 15 minutos en disolventes orgánicos (es variable en dependencia del tipo de disolvente) y de 44 minutos en plasma (425). Teniendo en cuenta estos datos debemos tomar las medidas necesarias para evitar su descomposición durante su manipulación y análisis.

Los métodos descritos para la determinación de NIF son muy variados: fluorimetría, voltametría cíclica, métodos radioactivos, cromatografía de capa fina, ensayos de radiorreceptores, radioinmunoensayo, cromatografía de gases y HPLC. Los estudios de determinación de NIT son menos numerosos; podemos encontrar trabajos que han utilizado técnicas voltamétricas, cromatografía de gases y HPLC. La técnica más utilizada

actualmente es la HPLC y los sistemas más usados para la detección son absorbancia y electroquímica (426).

4.4.- LA TRIFLUOPERAZINA (TFP).

La TFP es un neuroléptico antipsicótico perteneciente al grupo de la fenotiazinas piperazínicas, que se caracterizan por su antagonismo competitivo con los receptores dopaminérgicos (figura 15) (427).

A mediados de los años setenta, Weiss (428) descubrió que las fenotiazinas inhibían la activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos mediada por el CaCm. La unión del Ca⁺⁺ a la Cm induce cambios conformacionales que favorecen su activación y la exposición de los dominios hidrofóbicos necesarios para la unión del CaCm a la TFP. La unión de TFP a la Cm determina su inactividad biológica (343). VPM y DTZ no presentan actividad inhibitoria sobre el CaCm. Algunas dihidropiridinas, como NIM interactúan con el CaCm, pero su afinidad por él es unas 1.000 veces menor que la que presenta por los CCVD-L (429).

La TFP ha demostrado en múltiples estudios su potencial antiproliferativo celular y la interferencia sobre la organización del sistema de microfilamentos intracelulares implicados en el mantenimiento de la morfología, adhesividad, locomoción y crecimiento celular (310-312).

4.5.- EL MIBEFRADIL (MBF).

El MBF (Ro 405967/001) o clorhidrato de (1S,2S)-2-[2-[(3-)-2-benzoimidazolil]propil]-metil-amino-etil]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-1-isopropil-2-naftil-metoxiacetato (figura 15) es el primer representante de un nuevo grupo de ICC, los fenilalquilamina-benzoimidazoles, con importantes efectos hipotensores arteriales y antiisquémicos miocárdicos (401, 430). La mayoría de sus efectos se atribuyen a su capacidad para bloquear de forma selectiva los CCVD-T (431, 432). A concentraciones 10 veces superiores, el MBF también bloquea los CCVD-L, -N, -Q y -R, y los canales de K⁺ y Cl⁻ (433-435). Paradójicamente, ha sido demostrado de forma experimental *in vitro* el incremento del Ca⁺⁺ intracelular inducido por MBF a concentraciones supratrapéuticas en fibroblastos cardíacos de rata y en plaquetas humanas.

Recientes estudios han demostrado propiedades antiproliferativas del MBF en el aparato cardiovascular (436) y en otras estirpes celulares (434, 437), incluidas células

oculares humanas (238), además de propiedades inmunomoduladoras (438) y reguladoras sobre la agregación plaquetar (439). Beck (238) comprobó como el MBF en concentraciones 10-100 μM es capaz de reducir la adhesión *in vitro* de células epiteliales procedentes del cristalino tras cirugía de catarata. Esta inhibición está relacionada con la capacidad del MBF para alterar el metabolismo de filamentos de actina y vimentina.

En resumen, podemos concluir que los inhibidores del Ca^{++} han demostrado su potencial inhibitorio en muchos de los fenómenos que constituyen o están de alguna manera implicados en el complejo proceso de la reparación tisular. Por lo tanto, resulta lógico pensar en los posibles beneficios que su aplicación podría tener en aquellas patologías oculares, donde los procesos reparativos tisulares normales o exaltados suponen un factor pronóstico negativo (cirugía del pterigium, cirugía filtrante del glaucoma, vitreoretinopatía proliferante, enfermedades mucocitilizantes, etc).

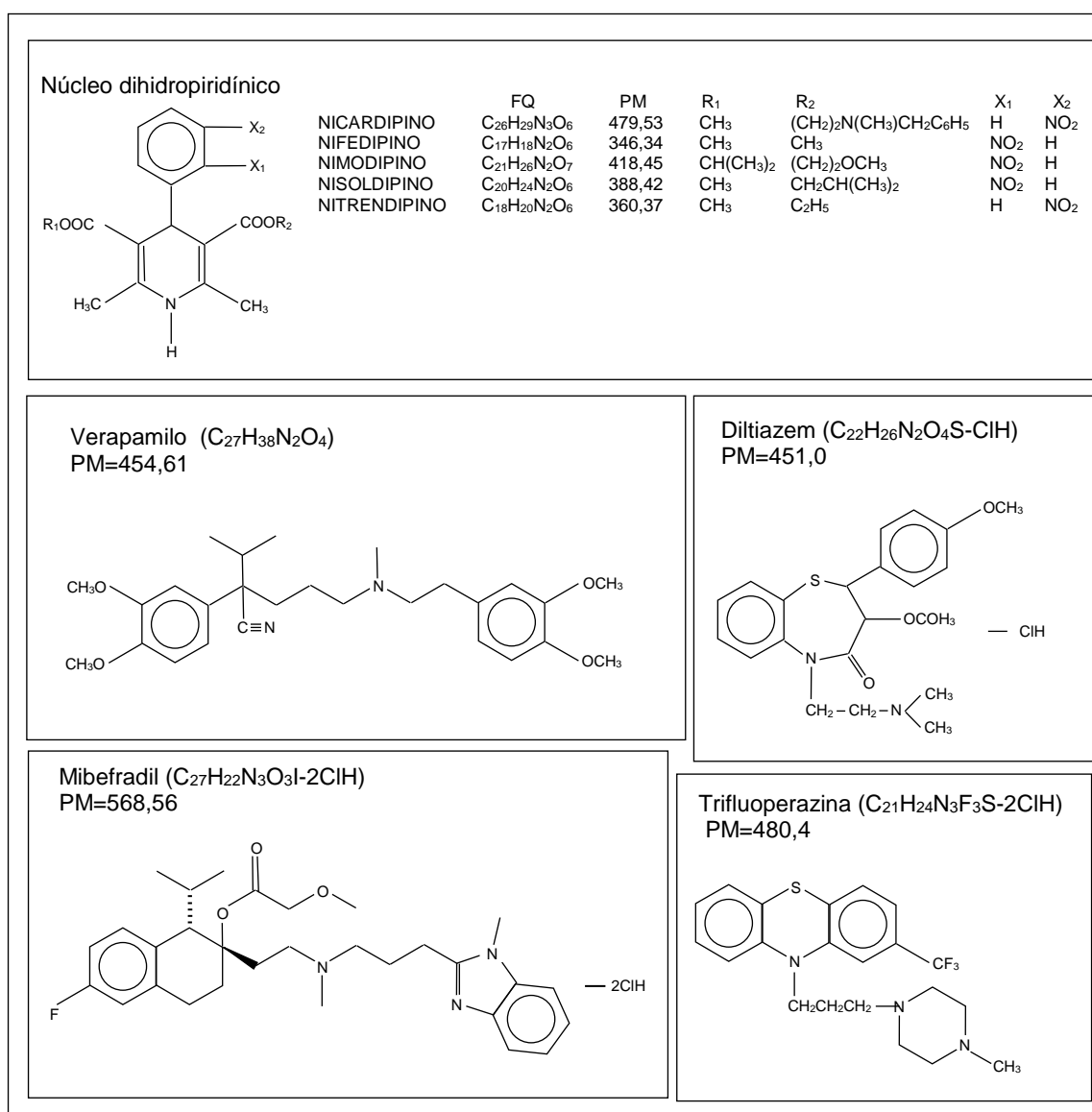


Figura 15. Fórmulas químicas de los inhibidores de los canales del calcio utilizados en el estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

A.- MATERIAL.

1.- LUGAR DE TRABAJO.

Los estudios de fotosensibilidad de las dihidropiridinas fueron realizados mediante HPLC en el Laboratorio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

Los estudios con cultivo celular se llevaron a cabo en el Laboratorio Experimental del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. Dicho laboratorio fue equipado con el material necesario para la realización de cultivos celulares, según consta en el apartado 2. Se practicaron las medidas de aislamiento necesarias para evitar la entrada de luz desde el exterior del laboratorio y fueron instalados tres sistemas de iluminación diferentes para la realización de distintas actividades (figura 16).

-La manipulación de fármacos se realizó bajo la iluminación proporcionada por una instalación de luz de vapor de sodio (Philips, Holanda), constituida por:

*Luminaria XRX 602 N.

*Lámpara SOX 55, 55W.

-El resto de actividades de cultivo celular se realizó con la iluminación de un fluorescente blanco Sylvania/GTL 36W (Alemania).

-Durante los períodos de descanso, para aumentar las condiciones de asepsia, el laboratorio y la campana de flujo laminar se sometieron a iluminación con fluorescentes de luz ultravioleta (Eye G30T8).



Figura 16. Sistemas de iluminación del laboratorio de cultivos celulares. Fluorescente de luz ultravioleta, lámpara de vapor de sodio y fluorescentes convencionales.

2.- EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS PARA EL ESTUDIO DE FOTOSENSIBILIDAD.

2.1.- MATERIAL DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE FOTOSENSIBILIDAD.

-Espectrofotómetro Hitachi U-2000 (Hitachi, Japón).

-Equipo de HPLC constituido por (figura 17):

*Inyector automático Waters 717 Autosampler (Waters Associates™, EEUU).

*Dos bombas de alta presión Waters M-45 y 501 (Waters Associates™, EEUU).

*Precolumna Guard-Pack. Nova-Pak C 18 (Waters Associates™, EEUU).

*Columna Nova-Pak C18, 4µm 60 (3,9cm x 150 mm) (Waters Associates™, EEUU).

*Detector ultravioleta de onda variable Waters 440 (Waters Associates™, EEUU).

*Ordenador Acer 486DX en el que va instalado el programa que comanda el sistema cromatográfico PC Integration Pack (Kontron Instruments).

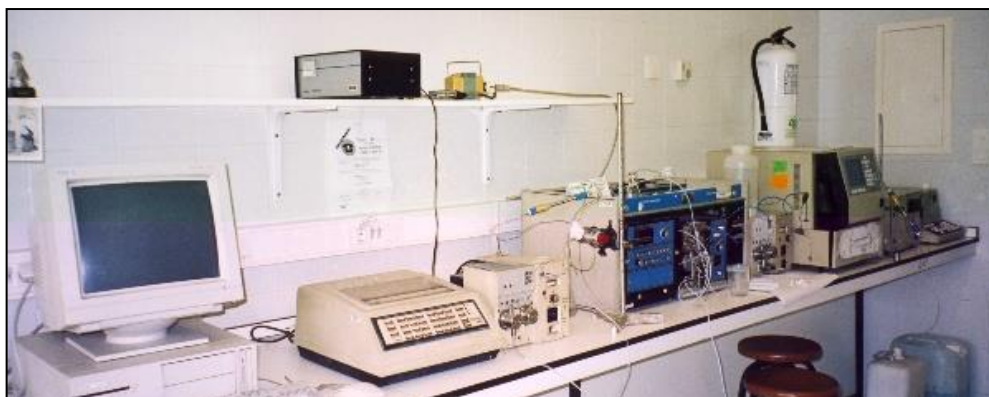


Figura 17. Sistema de cromatografía líquida de alta precisión y sistema de detección por absorción.

-Instalación de luz de vapor de sodio (Philips, Holanda) constituida por:

*Luminaria FGS 602 N2.

*Lámpara de sodio SOX-55, 55W.

*Sujección Acopla tipo poste 210.

-pH-metro digital Beckman Φ 660 pH Meter (Beckman Coulter, Inc., EEUU).

-Báscula de precisión Mettler PJ 4000 (Mettler, EEUU).

-Sistema de purificación de agua Milli-Q.

-Diverso material básico y desechable de laboratorio.

2.2.- FÁRMACOS Y REACTIVOS PARA EL ESTUDIO DE FOTOSENSIBILIDAD.

-Los fármacos estudiados (NIC, NIM y NIS) fueron suministrados por BAYER, A.G., Alemania.

-Acetonitrilo R Chromasolv® (Riedel-de Haën, Alemania).

-Hidróxido de sodio (Panreac Química S.A., España).

-Metanol (Lab-Scan Ltd, Irlanda).

-Trietilamina (Panreac Química S.A., España).

-Acetato amónico (Panreac Química S.A., España).

-Ácido acético (Panreac Química S.A., España).

3.- EQUIPO, MATERIAL, REACTIVOS Y PRODUCTOS DE CULTIVO CELULAR.

3.1.-EQUIPO DE CULTIVO CELULAR.

-Cabina de flujo laminar vertical TELSTAR AV-100 (TELSTAR S.A., España).

-Sistema de aspiración con trompa de vacío por agua PLASTIBRAND (BRAND, Alemania).

-Incubadora de CO₂ JOUAN IG150, (JOUAN S.A., Francia).

-Sistema de alimentación ininterrumpida (SAI) APC Back Plus Pro 1400 (American Power Conversion™, EEUU).

-Bombonas de CO₂ de 99,995 % de pureza (S.E. de Carburos Metálicos S.A., España).

-Agitador magnético térmico P SELECTA Penta (JP SELECTA S.A., España).

-Baño termostático P SELECTA Precistern (JP SELECTA S.A., España).

-Báscula electrónica de precisión SARTORIUS BP110 (SARTORIUS AG, Alemania).

-Báscula de precisión Mettler PJ 4000 (Mettler, EEUU).

-Vortexadora DINKO D-51 (DINKO, España).

-Fresadora (Moria, Francia).

-Microscopio de inversión de fases NIKON Diaphot 300, con objetivos 4X, 10X, 20X y 40X (Nikon Corporation, Japón) (figura 18).

-Cámara fotográfica NIKON 601-AF con conexión al microscopio (Nikon Corporation, Japón) (figura 18).

-Película de diapositivas 160 ASA de tungsteno Kodak Ektachrome 160T (Eastman Kodak Company, EEUU).

-Cámara de vídeo SONY CCD-IRIS (SONY Corporation, Japón) (figura 18).

-Espectrofotómetro de microplacas Multiskan EX (Labsystems Oy, Finlandia) (figura 18).

-Equipo informático constituido por (figura 18):

*Ordenador COMPACQ Deskpro, Pentium II 400MHz (Compacq Computer Corporation, EEUU).

*Unidad externa IOMEGA ZIP 100 (Iomega International S.A., Suiza).

*Unidad externa grabadora HP CD-Writer Plus 7500 (Hewlett Packard, EEUU).

-Programas informáticos:

*Microsoft Windows 98. Microsoft Co. 1998.

*HiJaak 2.02 Team. Inset systems Inc. 1991.

*Genesis Lite 3.03. Life Sciences UK 1993.

*Visilog for Windows 4.1.3. Noesis 1993.

*Statistical Package for the Social Sciences for Windows 8.0.0. SPSS Inc 1997.

*Microsoft Word 97. Microsoft Co. 1998.

*Live 3400. ASUS Computer Inc. 1998.

*Microsoft Power Point. Microsoft Co. 1998.



Figura 18. Sistema informático utilizado para los estudios con WST-1 y de cinética de reparación celular conectado a un microscopio de inversión de fases a través de una cámara de vídeo (derecha) y a un espectrofotómetro de microplacas (izquierda).

- Nevera (Corberó, Grupo Electrolux AB, Suecia).
- Congelador (Zanussi, Grupo Electrolux AB, Suecia).
- Pipeteador automático POWERPETTE PLUS (Jecons, Reino Unido).
- Pipeteador automático Easypet (Eppendorf, Alemania).
- Micropipetas monocanal Eppendorf Research de 10, 100 y 1.000 μ l (Eppendorf, Alemania).
- pH-metro JENWAY 3020 pHMeter (Jenway, Reino Unido).
- Instalación de luz de vapor de sodio (Philips, Holanda) constituida por:
 - *Luminaria XRX 602 N.
 - *Lámpara de SOX 55, 55 W.

3.2.- MATERIAL DE CULTIVO CELULAR.

- Unidades de filtración para medio de cultivo de 500 ml de NALGENE con filtro de nylon con tamaño de poro de 0,2 μ m (Nalge Company, EEUU).
- Cámara de recuento celular Neubauer “mejorada” (Brand, Alemania).
- Placas de cultivo de poliestireno de alta densidad (HDPE) con modificación física de la superficie de cultivo mediante el método NunclonTM Δ (irradiación- γ más descarga eléctrica de iones) para aumentar su capacidad hidrofílica (NuncTM, Dinamarca):
 - *Placas de cultivo redondas de 21,5 cm² de área de cultivo.
 - *Placas de cultivo redondas de 56,7 cm² de área de cultivo.
 - *Fracos (*flasks*) de 75 cm² de área de cultivo, cuello angulado y tapón con filtro de polietileno con tamaño de poro de 0,2 μ m.
 - *Multiplacas de 24 pocillos con área de cultivo de 1,9 cm²/pocillo.
 - *Multiplacas de 96 pocillos con área de cultivo de 0,36 cm²/pocillo.
- Pipetas de poliestireno para pipeteador automático de 2, 10 y 25 ml (SARSTEDT, Alemania).
- Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1.000 μ l (SARSTEDT, Alemania).
- Pipetas Pasteur de vidrio de punta corta (14 cm) (Eppendorf, Alemania).
- Portaobjetos (Hirschmann Laborgerate, Alemania).

- Cubreobjetos 22 x 22 mm (Hirschmann Laborgerate, Alemania).
- Tubos Eppendorf (SARSTEDT, Alemania).
- Tubos de centrifugado de policarbonato de 11 ml (Nunc Inc, Dinamarca).
- Sondas nasogástricas de 5 mm de diámetro (Pharmaplast Ltd, Reino Unido).
- Material quirúrgico estéril:
 - *Pinzas Dyson-Colibrí (Katena Products Inc, EEUU).
 - *Pinzas Helveston (Katena Products Inc, EEUU).
 - *Mango de bisturí Bard-Parker nº9 (Katena Products Inc, EEUU).
 - *Hojas de bisturí Bard-Parker nº11 (Katena Products Inc, EEUU).
 - *Esponjitas de hidrocélulosa K-sponge® (Katena Products Inc, EEUU).
 - *Agujas intramusculares Microlance® 3 de 20G x 1½ (BECTON DICKINSON, España).
 - *Guantes de látex Triflex® (Allergiance Healthcare Corporation, EEUU).
 - *Gasas 100% algodón hidrófilo 7,7 x 7,5 cm Texpol® (Textil Planas Oliveros, S.A., España).
 - *Mascarillas resistentes a fluidos Aseptex™ (3M Health Care, USA).
- Diverso material básico y desechable de laboratorio.

3.3.- PRODUCTOS, FÁRMACOS Y REACTIVOS DE CULTIVO CELULAR.

- Extracto embrionario de pollo, ultrafiltrado (60 Å) (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).
- Suero de pollo (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).
- Suero bovino fetal (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).
- Medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).
- Tripsina-EDTA (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).
- Tampón fosfato salino de Dulbecco (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).
- Solución salina balanceada (SSB) (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).

-Solución de antibióticos para cultivo celular con Penicilina G y Estreptomicina (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).

-Solución de antibióticos y antifúngicos para cultivo celular con Penicilina G, Estreptomicina y Anfotericina B (GibcoBRL™ Life Technologies™ Ltd, Reino Unido).

-4- [3- (4 - Iodofenil) - 2 - (4 - nitrofenil) - 2H - 5 - tetrazolio] - 1,3 - benzeno disulfonato (*Cell Proliferation Reagent* WST-1®, Roche, Alemania).

-Solución de azul tripán 0,4% (Sigma-Aldrich Co, EEUU).

-Vaselina Pura CUVE® (Laboratorios Pérez Giménez, España).

-Etanol (Panreac, Montplet and Esteban S.A., España).

-Fármacos proporcionados por los diferentes laboratorios farmacéuticos en forma de polvo con la sustancia pura:

*TFP (GlaxoSmithKline, Reino Unido).

*DTZ (PARKE-DAVIS, EEUU).

*VPM (Knoll GmbH, Alemania).

*MBF (Roche, Alemania).

*NIC, NIF, NIM, NIT y NIS (BAYER A.G., Alemania).

-Alcohol etílico de 70° Alcohocel® 70° (Laboratorios Pérez Giménez, España).

-Solución antiséptica para manos Sterillium® (BODE CHEMIE, Alemania).

-Anfotericina B (Fungizona Endovenosa®, BRISTOL-MYERS SQUIBB Co, EEUU).

-Agua destilada Vitulia® (Laboratorios ERNSA, España).

B.- MÉTODOS.

1.- ESTUDIO DE LA FOTOSENSIBILIDAD DE LAS DIHIDROPIRIDINAS.

Con el fin de determinar las condiciones de iluminación idóneas para el manejo de las dihidropiridinas en el laboratorio, se realizaron pruebas de fotodegradación con NIC, NIM y NIS frente a tres fuentes de iluminación distintas:

- Luz solar.
- Luz de fluorescente.
- Luz de vapor de sodio.

Para ello se utilizó como método analítico de determinación la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) junto con un sistema de detección por absorción.

Partiendo de unas condiciones analíticas preestablecidas (422), las cuales eran válidas para la determinación de otras dihidropiridinas como NIF y NIT, se optimizaron las condiciones para los compuestos objeto de estudio. Para todo ello se estudiaron y mejoraron los siguientes parámetros:

- Longitud de onda utilizada en el sistema de detección.
- Características y composición de la fase móvil en la HPLC.

1.1.- DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DEL SISTEMA DE DETECCIÓN.

Para la identificación y cuantificación de los analitos objeto del estudio, fue utilizado un detector de absorbancia con el que se determinó mediante un barrido espectroscópico aquella longitud de onda a la que se debía irradiar.

Se prepararon disoluciones stock de NIC, NIM y NIS 100 ppm (100 mg/ml) en metanol en las máximas condiciones de oscuridad que se pudieron obtener. Una vez preparadas fueron inmediatamente protegidas de la luz mediante papel de aluminio para evitar posibles degradaciones que darían lugar a interferencias espectrales. Tras su utilización fueron congeladas a -20°C.

Se realizaron los correspondientes barridos espectroscópicos utilizando, si estas fueron necesarias, las correspondientes diluciones, hasta que la absorbancia quedó comprendida en el rango 0-1, rango que se consideró lineal. Tras el análisis de los espectros se determinó la longitud de onda óptima del sistema de detección para cada uno de los compuestos.

1.2.- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

La fase estacionaria utilizada en el estudio fue fase reversa utilizando una columna C18. Por otro lado, y partiendo de una determinada fase móvil que se había mostrado capaz para otras dihidropiridinas, como NIF y NIT, compuesta por acetonitrilo, metanol, acetato amónico y trietilamina, se realizaron diversos estudios variando el pH en el rango 7-7,90 y las proporciones de los diversos componentes de la fase móvil hasta obtener unas condiciones cromatográficas óptimas (426).

Partiendo de esas condiciones cromatográficas óptimas se establecieron los tiempos de retención de cada uno de los compuestos estudiados.

1.3.- ESTUDIO DE LA FOTOSENSIBILIDAD.

A partir de las disoluciones stock, se prepararon muestras de 1 ppm (1000 ng/ml) en metanol-agua (4:6, v/v). Se estudiaron tres grupos por cada fármaco y cada grupo se sometió únicamente a iluminación por luz solar, luz de fluorescente o luz de sodio. Para estudiar la fotoestabilidad frente a la luz solar, las disoluciones se mantuvieron expuestas frente a ésta, entre las 10 y 15 horas del día, sin que sobre ellas incidiesen directamente los rayos del sol. Los experimentos fueron realizados durante el mes de Julio. Los tiempos de exposición fueron: 0, 5, 15, 25, 45, 60, 90, 120, 240 y 300 minutos. Tras este período de exposición se tomaron alícuotas que fueron inmediatamente analizadas.

2.- CULTIVO CELULAR.

2.1.- CONDICIONES DE TRABAJO EN EL LABORATORIO.

La manipulación de los cultivos, fármacos y reactivos se llevó a cabo siempre en una campana de flujo laminar, siguiendo escrupulosamente las medidas de asepsia requeridas para el manejo de cultivos celulares: limpieza de la campana de flujo laminar con alcohol etílico de 70° antes de empezar y tras finalizar el trabajo, lavado de manos con solución antiséptica, manipulación del material con guantes estériles, etc. La manipulación de azul tripán y el polvo puro de los diferentes fármacos se realizó con protección de la vía respiratoria.

Así mismo, todo el material utilizado en el cultivo celular fue esterilizado previamente en el Servicio de Esterilización del Hospital Miguel Servet, por autoclave en el caso del material de vidrio o con óxido de etileno, el material plástico.

Todas las tareas que requerían la manipulación de fármacos se realizaron bajo la única iluminación proporcionada por una lámpara de vapor de sodio, que emite una radiación luminosa con una longitud de onda superior a 450 nm, evitando de esta manera la fotodescomposición de las dihidropiridinas. El resto de las tareas se realizaron bajo la iluminación de un fluorescente convencional.

2.2.- CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO CELULAR.

2.2.1.- MEDIOS DE CULTIVO.

-Suero de pollo: Se empleó a una concentración del 50% para la siembra inicial de los fragmentos de tejido. El suero de pollo fue previamente separado en alícuotas de 0,5 ml y guardado en el congelador. Se descongeló minutos antes de la siembra y se mezcló con el extracto embrionario de pollo inmediatamente antes de ser añadido al fragmento sembrado.

-Extracto embrionario de pollo: Es un suplemento favorecedor del crecimiento celular utilizado en la siembra inicial de los fragmentos. Se administró conjuntamente con el suero de pollo en una mezcla al 50%.

-Medio de cultivo: El medio de cultivo empleado fue el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene entre otros componentes L-glutamina (580 mg/l), D-glucosa (1000 mg/l) y piruvato sódico (110 mg/l). Este medio se obtiene de la casa comercial en forma líquida y listo para usar. Su composición completa aparece en la tabla 7. La glutamina es la fuente principal de carbono para la mayoría de las células en cultivo y genera precursores para posteriores biosíntesis y para la producción de proteínas. También actúa, junto con la glucosa (y a veces el piruvato sódico), como fuente principal de energía mediante la ruta del ciclo de Krebs.

-Suero bovino fetal (SBF): En todos los experimentos realizados se utilizó un mismo lote de suero bovino con origen en Sur América (Brasil), que previamente había sido testado en las distintas líneas celulares. El suero se inactivó por calor antes de usarlo con el fin de destruir las moléculas del complemento y algunas inmunoglobulinas reactivas que pudiera contener, ya que la cascada del complemento puede conducir a la lisis y muerte de las células en cultivo. La inactivación se logró en un baño de agua a 56°C durante 30 minutos. Se empleó a una concentración del 10% para conseguir la proliferación fibroblástica tras la siembra inicial y durante las sucesivas propagaciones.

-Antibióticos y antifúngicos: Fue utilizada una preparación comercial que contiene Penicilina G sódica (10.000 Unidades/ml), Estreptomina sulfato (10.000 µg/ml) y Anfotericina B (25 µg/ml) en solución salina al 0,85%. En todos los experimentos realizados con VPM, fue utilizada una solución de antibióticos de Penicilina y Estreptomina en iguales concentraciones, pero carente de antifúngico, ya que el VPM y Anfotericina B se inactivan mutuamente al entrar en contacto.

-Solución de tripsina-EDTA: Contiene 0,5 g/l de tripsina (1:250) y 2 g/l de ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) en solución salina A modificada de Puck. Esta solución se utilizó para despegar las células de la placa de cultivo. La actividad de la tripsina (1:250) es tal que 1 g de ésta puede digerir, en condiciones experimentales, 250 g de sustrato. Las proteínas de adherencia situadas en el glicocálix necesitan calcio y magnesio, por lo que la tripsina y el EDTA se utilizan conjuntamente. La tripsina actúa produciendo la digestión de las proteínas de adherencia, y el EDTA se encarga de quelar los cationes divalentes libres. La actividad de la tripsina es inhibida por la presencia de proteínas del suero, que actúa como diana para la tripsina y que puede contener además inhibidores de la tripsina.

-Tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS): Se utilizó para lavar las células en cultivo. Su composición completa aparece en la tabla 7.

2.2.2.- PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo se preparó en la campana de flujo laminar y se filtró en una unidad de filtración Nalgene compuesta por dos vasijas separadas por un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0,2 µm. Esta unidad de filtración se conectó a un sistema de presión positiva para facilitar el flujo del medio a través del filtro.

Para preparar 500 ml de medio con SBF al 10% se filtraron conjuntamente:

-445 ml de DMEM.

-50 ml de SBF previamente inactivado.

-5 ml de la solución de antibióticos y antifúngico (antibiótico sin antifúngico para los experimentos con VPM).

De esta manera, las concentraciones finales de antibióticos y antifúngico fueron: Penicilina G 100 U/ml, Estreptomina 100 µg/ml y Anfotericina B 0,25 µg/ml. Una vez preparado, el medio de cultivo se guardó a 4°C.

Tabla 7. Composición del medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y del tampón fosfato salino (PBS).

COMPONENTES	DMEM (mg/l)	PBS (g/l)
Sales inorgánicas		
CaCl ₂ - 2H ₂ O	264,0	-
CaCl - 2H ₂ O	-	0,132
Fe(NO ₃) - 9H ₂ O	0,1	-
ClK	400,0	0,2
ClNa	6.400,0	8,0
SO ₄ Mg - 7H ₂ O	200,0	-
Cl ₂ Mg - 6H ₂ O	-	0,1
CO ₃ HNa	3.700,0	-
PO ₄ H ₂ Na - 2H ₂ O	141,0	-
PO ₄ H ₂ Na ₂	-	1,15
PO ₄ H ₂ K	-	0,2
Aminoácidos		
L-Arginina - ClH	84,0	-
L-Cistina	48,0	-
L-Glutamina	580,0	-
Glicina	30,0	-
L-Histidina ClH - H ₂ O	42,0	-
L-Isoleucina	105,0	-
L-Leucina	105,0	-
L-Lisina-ClH	146,0	-
L-Metionina	30,0	-
L-Fenilalanina	66,0	-
L-Serina	42,0	-
L-Treonina	95,0	-
L-Triptófano	16,0	-
L-Tirosina	72,0	-
L-Valina	94,0	-
Vitaminas		
D-Pantotenato cálcico	4,0	-
Cloruro de colina	4,0	-
Acido fólico	4,0	-
i-Inositol	7,2	-
Nicotinamida	4,0	-
Piridoxal ClH	4,0	-
Riboflavina	0,40	-
Tiamina ClH	4,0	-
Otros componentes		
D-Glucosa	1.000,0	-
Rojo fenol	15,0	-
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	5.958,0	-
Piruvato sódico	110,0	-

2.2.3.- CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Las células precisan para su crecimiento óptimo una temperatura de 37°C en un medio a un pH 7,0-7,4. La naturaleza de los subproductos del metabolismo celular tienden a producir una acidificación del medio de cultivo, por lo que es necesario utilizar un sistema tampón. Los sistemas tampón utilizados fueron el HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano sulfónico) y el bicarbonato/CO₂. Este último sistema requiere la existencia de bicarbonato en el medio de cultivo y de CO₂ en la incubadora. El bicarbonato que lleva incorporado el medio de cultivo captura con eficacia los iones ácidos (H⁺) del metabolismo celular, formando ácido carbónico que se equilibra con el agua y el CO₂ disuelto; de este modo, se mantiene un medio tamponado a pH 7,0-7,4. Además, la atmósfera con un elevado grado de humedad permite que el medio de cultivo sea expuesto a la atmósfera de CO₂ y al mismo tiempo se evita la evaporación.

En nuestro caso, los cultivos se incubaron en una estufa de CO₂ que controlaba tanto la temperatura interna como la mezcla de gas del interior, consiguiendo de esta manera una atmósfera húmeda de una mezcla de 5% de CO₂ y 95% aire a una temperatura de 37°C. En el estante inferior de la estufa se situó un depósito de agua en el que se disolvió el polvo de Anfoterizina B contenido en un vial de Fungizona Endovenosa[®], lo que proporcionó una elevada humedad y evitó el crecimiento de microorganismos.

2.2.4.- ORIGEN DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Para la realización de este trabajo se utilizaron seis líneas celulares, todas ellas establecidas en nuestro laboratorio a partir de biopsias humanas. Los fibroblastos se aislaron a partir de la cápsula de Tenon de adultos jóvenes (entre 29 y 40 años) y sanos sometidos a cirugía ocular, previo consentimiento informado de todos los pacientes.

Una vez obtenidas las biopsias, se recogieron en contenedores estériles con medio de cultivo y se procedió a su siembra inmediata, siempre en los 30 minutos posteriores a su obtención.

2.2.5.- SIEMBRA DE LA BIOPSIA.

La obtención de fibroblastos a partir de las biopsias de cápsula de Tenon se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Sly y Grubb (440).

La biopsia junto con el medio de cultivo fue vertida en una placa redonda estéril de 56,7 cm² de área de cultivo. Se cortó la pieza en dos trozos con la ayuda de una pinza

quirúrgica y un bisturí y, posteriormente, cada una de estas piezas se volvió a dividir en dos. Esta maniobra se repitió sucesivamente hasta obtener fragmentos con un volumen aproximado de 1 mm³.

Cada fragmento se transfirió, ayudándonos con la punta de la hoja del bisturí, al centro de una placa de cultivo redonda de 21,5 cm² de área de cultivo, de tal forma que posteriormente se pudiera encajar un cubreobjetos sobre el fragmento. El objetivo de cortar la muestra en pequeños trozos y distribuirlos en varias placas es disminuir la posibilidad de contaminación y consiguiente pérdida de la línea celular.

Cada fragmento fue cubierto con 0,2 ml de una mezcla formada al 50% por suero de pollo (descongelado inmediatamente antes de ser mezclado) y extracto embrionario de pollo, de tal manera que el líquido de la mezcla cubriese totalmente el fragmento. Seguidamente la placa permaneció en la incubadora durante una hora. Pasado ese tiempo se aspiraron con una pipeta Pasteur los restos de la mezcla que pudieron quedar junto al fragmento, que ya había quedado adherido a la superficie de cultivo. Con la ayuda de una esponjita estéril se aplicó una pequeña cantidad de vaselina estéril en cada esquina de un cubreobjetos, y con unas pinzas se colocó el cubreobjetos de manera que el fragmento de tejido quedara totalmente cubierto y en el centro. De esta forma, se aseguró que los explantes permaneciesen adheridos al fondo de la placa y no flotaran al añadir el medio de cultivo, y que el futuro crecimiento celular pudiera realizarse en los dos planos (placa de cultivo y cubreobjetos).

Seguidamente se añadieron 0,2 ml de medio con una pipeta Pasteur justo en el margen del cubreobjetos de forma que el líquido penetrara por capilaridad y desplazase el aire que había quedado bajo el cristal. Una vez que el medio ocupó el espacio situado bajo el cubreobjetos y no se observaron burbujas de aire, se añadieron 5 ml de medio de cultivo a la placa.

Finalmente se colocaron las placas en la estufa de CO₂ y se dejaron durante 7 días, al cabo de los cuales, se observaron los explantes en el microscopio de inversión de fases, evidenciando la aparición de células en los márgenes de los mismos. A partir de este momento se cambió el medio de cultivo cada 3 días, aspirando con cuidado en el extremo de las placas, reemplazándolo por medio fresco. A las 2 semanas ya se observaron fibroblastos en los márgenes creciendo fuera del explante. A las 4 ó 6 semanas los fibroblastos habían crecido fuera del cubreobjetos y estaban listos para ser propagados.

2.2.6.- PROPAGACIÓN INICIAL DE LOS FIBROBLASTOS.

Para despegar las células de la placa se retiró el medio de cultivo mediante aspiración y se añadieron 3 ml de tripsina-EDTA, teniendo especial cuidado en que la tripsina penetrara bajo los cubreobjetos, levantándolos ligeramente si era preciso con una aguja intramuscular estéril. Al cabo de 1 minuto se aspiró la tripsina-EDTA y se colocó la placa en la estufa de CO₂ a 37°C durante 5 minutos. Al examinar el cultivo con el microscopio pasado este tiempo, se observó que las células se habían redondeado y que muchas se habían desprendido de la superficie de cultivo. Unos golpes suaves aplicados a los lados de la placa son suficientes para despegar todas las células. Es importante recordar que la tripsina-EDTA es potencialmente tóxica para las células y que debe estar en contacto con éstas el tiempo mínimo necesario para desprenderlas del plástico.

Tras despegar las células se añadieron 4 ml de medio de cultivo y se mezclaron con la suspensión pipeteando suavemente varias veces, con objeto de arrastrar todas las células y hacer la mezcla homogénea. Esta suspensión de células fue transferida a un frasco (flask) de cuello angulado de 75 cm² de área de cultivo al que se añadieron 6 ml más de medio de cultivo, todo ello se homogeneizó pipeteando repetidamente y se introdujo en la incubadora. Las superficies de cultivo de los frascos no fueron recubiertas de colágeno, lo cual dificultó la adherencia de células epiteliales y, por el contrario, facilitó la adhesión rápida de los fibroblastos.

2.2.7.- SUBCULTIVO DE FIBROBLASTOS.

Los fibroblastos se pueden subcultivar propagándolos cada 7-8 días cuando han alcanzado un estado de subconfluencia. Para obtener gran cantidad de células, se propagaron en una proporción entre 1:5 y 1:8 cada semana, lo que significa que las células despegadas por tripsinización se distribuyen en placas con un área 5 u 8 veces mayor que el área original. Una siembra de fibroblastos a baja densidad (propagaciones entre 1:15 y 1:20) se sigue de un retraso en la velocidad inicial de crecimiento, siendo necesario un tiempo desproporcionadamente largo para alcanzar la confluencia. A partir de los pases 20-25, el crecimiento de las líneas celulares comienza a enlentecerse progresivamente y la morfología celular se altera, por lo que se desecha la línea celular.

Para mantener las líneas celulares en cultivo se utilizaron frascos de cuello angulado de 75 cm² de área de cultivo, que proporcionan una superficie de crecimiento adecuada para poder disponer de un número suficiente de células para realizar los distintos experimentos y, a la vez, seguir manteniendo la línea.

El procedimiento de tripsinización fue el mismo que se ha descrito previamente, con la salvedad de que el volumen de tripsina-EDTA añadido fue de 10 ml. Tras un minuto se aspiró la tripsina-EDTA y se introdujo la placa en la incubadora durante 5 minutos. Una vez despegadas las células del plástico, se añadieron 10 ml de medio de cultivo y se pipeteó suave y repetidamente para hacer la muestra homogénea. Tras realizar el recuento celular, la suspensión fue transferida a frascos de 75 cm². La repetición de estos pasos durante 2-3 pases permite eliminar del cultivo todo vestigio de célula epitelial.

Antes de propagar las células, se procedió a hacer el recuento en una cámara de Neubauer con "retícula mejorada"; para ello, se tomó una pequeña cantidad de la suspensión celular con una pipeta Pasteur y, simplemente colocando la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, la suspensión penetró en la cámara por capilaridad. La cámara de Neubauer mejorada presenta en su superficie una serie de líneas que forman una retícula. Cuando se coloca el cubreobjetos sobre la zona central de la cámara, el espacio definido entre la parte inferior del cubreobjetos y la parte superior de la retícula tiene 0,1 mm. Cada uno de los cinco cuadrados (los cuatro de las esquinas y el del centro) tiene una superficie de 1 mm². Esto supone que el volumen contenido sobre cada cuadrado es 1 mm x 1 mm x 0,1 mm, es decir, 0,1 mm³ (0,1 µl) (441). Se contaron las células contenidas en los cuatro cuadrados de las esquinas de la retícula, y se calculó la media para evitar posibles errores debido a una distribución desigual de las células en la cámara de recuento. Una vez calculada la media de células de un cuadrado, el número de células contenidas en 1 ml de suspensión es ese valor multiplicado por 10⁴. Esto multiplicado por el número de ml de suspensión nos proporciona el número total de células de que disponemos. El número de células que se propagan dependerá del área de crecimiento disponible en el frasco de cultivo en el que se vayan a subcultivar. Para realizar los experimentos se utilizaron fibroblastos entre los pases tercero y séptimo.

3.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

3.1.- MODELO DE LESIÓN *IN VITRO*.

La producción de una lesión experimental *in vitro* se basó, esencialmente, en la técnica descrita por Mikami para células epiteliales de mucosa gástrica de conejo (77). Esta lesión se efectuó mecánicamente mediante una punta rotante de material plástico de polivinilo que produjo una pérdida de sustancia de forma redondeada con un área aproximada de 0,5 mm². La capacidad de reparación se cuantificó midiendo el área libre

de fibroblastos (en mm²) y comparando estas áreas (expresadas como el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos) entre cada grupo de casos y sus controles a las 0, 18, 24 y 48 horas.

Para este tipo de experimentos se utilizaron placas Nunc de 24 pocillos. Los fibroblastos fueron sembrados con una densidad de 2×10^4 células/0,5 ml de medio de cultivo en cada pocillo. Cuando formaron una monocapa continua y alcanzaron la confluencia en aproximadamente 48 horas, se aspiró el medio de cultivo y se procedió a efectuar la lesión. Inmediatamente después se lavó dos veces con PBS con el objetivo de eliminar del pocillo las células muertas y otros detritus que pudiesen quedar sobre el área denudada. Tras añadir medio de cultivo se observó la superficie denudada mediante un microscopio de fase invertida, al cual estaba adaptada una cámara de vídeo, a su vez conectada a un sistema informático con el que se obtuvieron imágenes digitalizadas de las lesiones.

A pesar de aplicar la misma técnica para realizar la lesión sobre la monocapa confluyente de fibroblastos, la fuerza motriz ejercida por la punta rotante produjo lesiones ligeramente diferentes. Con el objeto de homogeneizar al máximo el tamaño de las lesiones, después de realizar las úlceras se seleccionaron únicamente aquellas lesiones con morfología redonda o elíptica que quedaron limpias de restos celulares y detritus, y en las que fue posible calcular el área libre de células.

Una vez obtenida la imagen digital y calculada el área de la lesión, se añadió en cada pocillo de forma aleatoria medio de cultivo (pocillos control), o medio de cultivo en el que estaba disuelta a una concentración conocida la sustancia a evaluar (pocillos caso). Fueron comprobados los posibles efectos inmediatos producidos sobre la lesión y la monocapa de fibroblastos circundantes por la adición de la disolución a cada pocillo. Posteriormente las placas fueron introducidas en la estufa de CO₂ a 37°C. Se tomaron nuevas imágenes de las úlceras a las 18, 24 y 48 horas, momento en el que finalizó el experimento.

3.2.- CÁLCULO DEL ÁREA DE LA LESIÓN.

El cálculo del área de la lesión se realizó siguiendo la metodología utilizada por Wong (232), a partir de imágenes digitalizadas tomadas inmediatamente después de producir la lesión (0 horas) y, posteriormente, de forma secuencial a las 18, 24 y 48 horas.

Las imágenes fueron obtenidas mediante una cámara de vídeo acoplada al microscopio de inversión de fases con un objetivo de 10 aumentos. Esta cámara a su vez

estaba conectada a un ordenador, y mediante el programa informático Live 3400 se obtuvieron las diferentes imágenes. Sobre la imagen se trazó a mano alzada el perímetro de la lesión que delimitaba el área libre de fibroblastos. Posteriormente con el programa informático Visilog se realizaron los cálculos de las áreas, mediante un primer proceso de erosión y filtrado binario de la imagen, tras la calibración de las áreas digitalizadas se realizó la medición en pixels y su conversión a unidades decimales (figura 19).

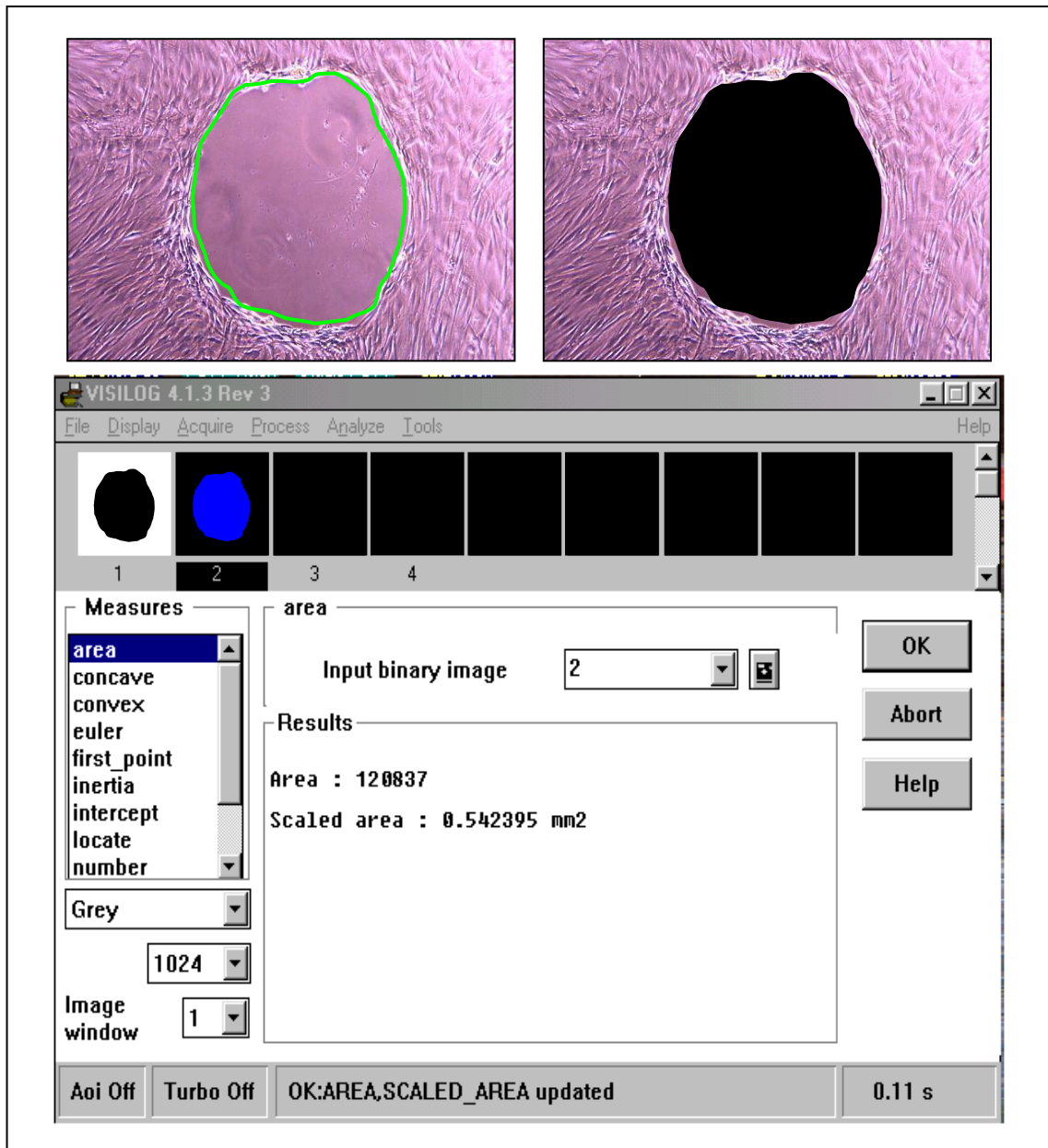


Figura 19. Imágenes superiores: Fotografía digitalizada obtenida por microscopio de inversión de fases (10X). Perímetro de la lesión (verde) que delimita el área libre de fibroblastos (negro). Imagen inferior: Cálculo del área con el programa informático Visilog.

4.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE EL REACTIVO WST-1.

4.1. CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Para este tipo de experimentos fueron utilizadas placas Nunc de 96 pocillos. Los fibroblastos fueron sembrados con una densidad de 10^4 células/100 μ l de medio de cultivo en cada pocillo, y se incubaron durante 24 horas. Pasado ese tiempo se confirmó la validez de cada pocillo mediante visualización por microscopio, comprobando la adhesión de los fibroblastos a la superficie de cultivo. En todos los pocillos válidos se aspiró el medio y se inició el experimento (0 horas) rellenando los pocillos con 100 μ l de medio de cultivo (pocillos control), o con 100 μ l de una disolución de medio de cultivo con un fármaco a una concentración conocida (pocillos caso). Se reservaron 3 pocillos por cada control y 3 pocillos por cada concentración de fármaco estudiada para obtener la absorbancia espontánea producida exclusivamente por el medio de cultivo (controles) y por cada una de las concentraciones de los fármacos estudiadas (casos). Estos pocillos fueron rellenados con 100 μ l de las soluciones correspondientes a los casos y controles, pero no recibieron células. Las placas se introdujeron en la incubadora durante 14 horas. Pasado ese tiempo se añadieron 10 μ l de WST-1 a cada pocillo y las placas se introdujeron nuevamente en la incubadora hasta el momento de su primera lectura tras 18 horas de exposición al fármaco.

4.2. CONDICIONES DE LECTURA DE LA ABSORBANCIA.

La capacidad de los distintos fármacos para inhibir la proliferación de los fibroblastos se evaluó mediante el test espectrofotométrico WST-1 (442). El formazán producido por los fibroblastos fue cuantificado midiendo la absorbancia de la solución contenida en cada pocillo mediante un espectrofotómetro (lector de ELISA) conectado al sistema informático, con un filtro de longitud de onda de 440 nanómetros (figuras 18, 20 y 21). Mediante el programa informático Genesis Lite se realizaron los protocolos de lectura de cada placa y se obtuvieron los registros de absorbancia.

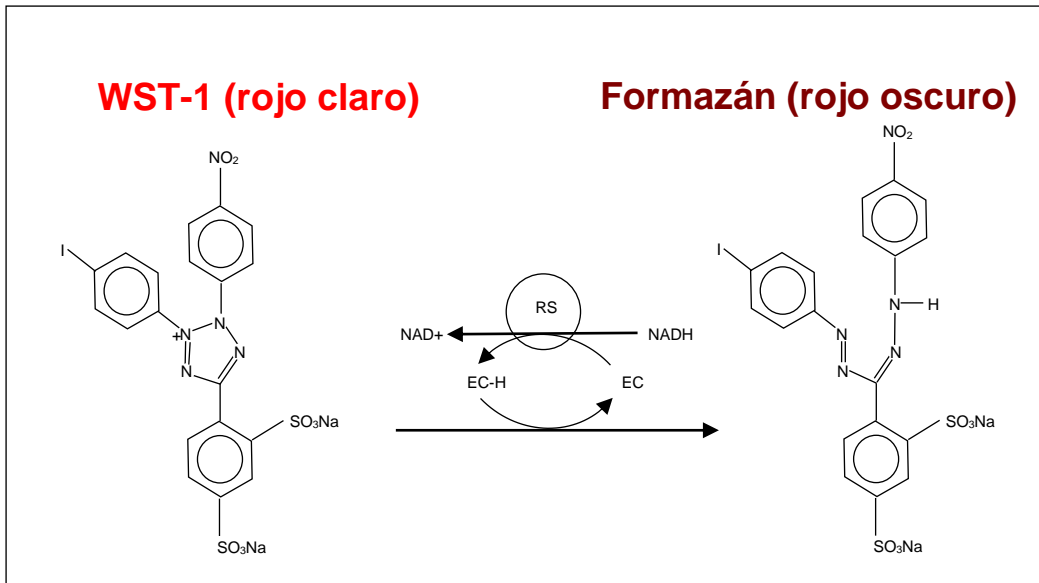


Figura 20. Test de WST-1. El WST-1 es una sal de tetrazolio metabolizada a formazán por las deshidrogenasas de la cadena respiratoria mitocondrial, activas únicamente en las células viables.

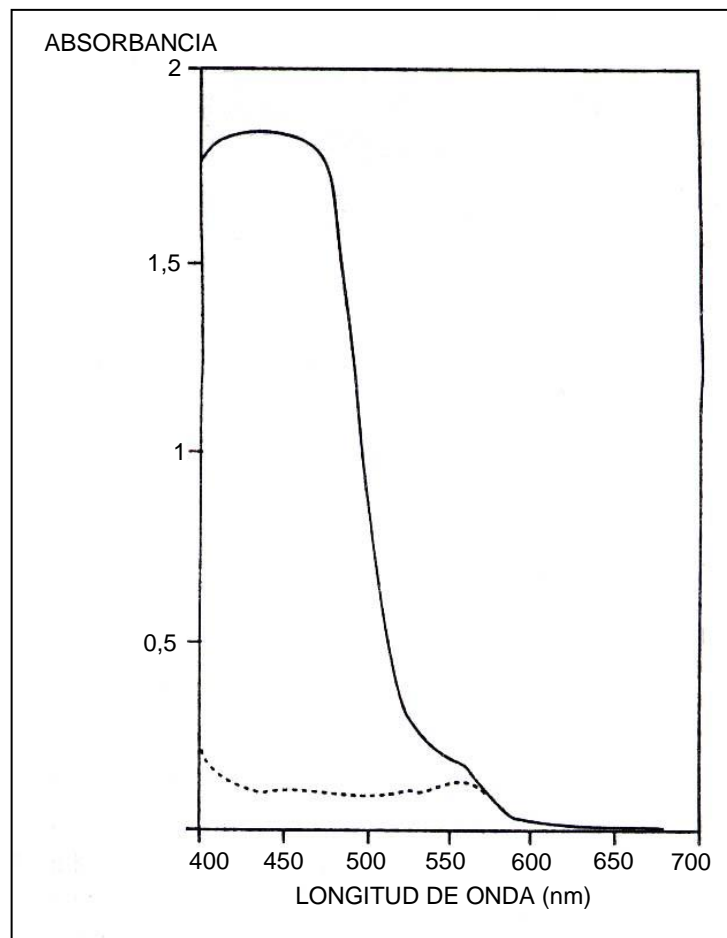


Figura 21. Perfil espectroscópico del WST-1 con una absorbancia máxima entre 420 y 480 nm.

Para cada lectura las placas se extrajeron de la incubadora, se colocaron sobre el platillo de lectura del espectrofotómetro, fueron sometidas a una agitación rotatoria durante un minuto para homogeneizar el contenido de los pocillos y, seguidamente, se procedió a su lectura. Tras la lectura la placa fue nuevamente introducida en la incubadora hasta la siguiente lectura.

Las determinaciones de absorbancia se realizaron a las 18, 24 y 48 horas, cuantificando de esta manera la proliferación fibroblástica. El valor de absorbancia final de cada pocillo se obtuvo restando del valor de absorbancia obtenido por éste, el valor medio de absorbancia obtenido por sus 3 pocillos correspondientes que contenían las soluciones con WST-1 sin células.

5.- ESTUDIO DE ADHESIVIDAD CELULAR MEDIANTE EL REACTIVO WST-1.

5.1. CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Para este tipo de experimentos fueron utilizadas placas Nunc de 96 pocillos. Los fibroblastos se sembraron con una densidad de 10^4 células/pocillo, suspendidos en 100 μ l de medio de cultivo (pocillos control), o en 100 μ l de una disolución formada por medio de cultivo y el fármaco a estudio con una concentración conocida (pocillos caso). Las placas se incubaron durante 24 horas.

Pasado ese tiempo se aspiró el contenido de cada pocillo mediante una pipeta Pasteur, eliminando el contenido líquido junto con las células no adheridas a la superficie de cultivo. Seguidamente se lavó dos veces cada pocillo con 100 μ l de PBS para completar la eliminación de las células no adherentes y se rellenaron los pocillos con 100 μ l de medio de cultivo y 10 μ l de WST-1. Al igual que en los estudios de proliferación (apartado 4.1.) se rellenaron pocillos con las soluciones a estudiar pero sin células.

5.2. CONDICIONES DE LECTURA DE LA ABSORBANCIA.

Tras 4 horas de reacción en la incubadora se procedió a realizar una única lectura de absorbancia en las mismas condiciones y realizando los mismos cálculos que se expresan en el apartado 4.2.

6.- ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR.

6.1.- ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR CON WST-1.

Para este tipo de experimentos fueron utilizadas placas Nunc de 96 pocillos con unas condiciones de incubación idénticas a las de los estudios de proliferación celular. Los fibroblastos fueron sembrados con una densidad de 10^4 células/pocillo con 100 μ l de medio de cultivo en cada pocillo, y se incubaron durante 24 horas. Tras confirmar la validez del pocillo mediante su observación con el microscopio, se aspiró el medio de cultivo y se rellenó cada pocillo con 100 μ l de medio de cultivo (pocillos control), o con 100 μ l de una disolución de medio de cultivo con un fármaco a una concentración conocida (pocillos caso). A todos los pocillos se adicionaron 10 μ l de WST-1, y las placas se introdujeron en la incubadora durante 4 horas hasta el momento de su lectura. Al igual que en los estudios de proliferación (apartado 4.1.), se rellenaron pocillos con las soluciones a estudiar pero sin células.

Se realizó una única lectura de absorbancia a las 4 horas en las mismas condiciones y realizando los mismos cálculos que se expresan en el apartado 4.2.

6.2.- ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR CON TINCIÓN DE AZUL TRIPÁN.

Para este tipo de experimentos fueron utilizadas placas Nunc de 96 pocillos. Los fibroblastos se sembraron con una densidad de 10^4 células/100 μ l de medio de cultivo en cada pocillo, y se incubaron durante 24 horas. Pasado ese tiempo se confirmó la validez de cada pocillo mediante su observación con el microscopio, comprobando la adhesión de los fibroblastos a la superficie de cultivo. En todos los pocillos válidos se aspiró el medio y se rellenaron nuevamente con 100 μ l de medio de cultivo (pocillos control), o con 100 μ l de una disolución de medio de cultivo con un fármaco a una concentración conocida (pocillos caso). Las placas se introdujeron en la incubadora durante 4 horas.

Pasado ese tiempo se aspiraron los pocillos y se rellenaron con 100 μ l de tripsina-EDTA. Tras un minuto se aspiró la tripsina-EDTA y se introdujo la placa en la incubadora durante 5 minutos. Una vez comprobado el despegamiento de las células de la superficie de cultivo con el microscopio, se añadieron 100 μ l de SSB y se pipetearon suave y repetidamente para hacer la muestra homogénea. Esta suspensión de células se transfirió a un tubo de Ependorff y se añadió SSB hasta obtener un volumen de 10 ml.

Para proceder al conteo celular mediante el microscopio de inversión de fases se colocó en una cámara de recuento celular Neubauer “mejorada” una gota de la mezcla formada por 0,5 ml de la suspensión celular y 0,5 ml de solución de azul tripán al 0,4 %. El recuento se realizó 5 minutos después de realizar la mezcla, ya que tras exposiciones superiores a 15 minutos las células viables también pueden teñirse de azul. En cada recuento se examinaron al menos 200 células de cada pocillo, diferenciando las células viables (no teñidas) de las células no viables (teñidas de azul) (443).

7.- ESTUDIO CITOPATOLÓGICO.

Se practicó, mediante microscopía de inversión de fases, un estudio citopatológico de la morfología celular, posibles atipias e influencia de cada una de las concentraciones, fármacos y tiempos empleados de forma enmascarada de manera que el observador no conocía la droga utilizada.

Las observaciones se realizaron a las 18, 24 y 48 horas en monocapas continuas de fibroblastos y sobre las úlceras. La metodología para la obtención de las monocapas y úlceras fue igual a la expuesta en el apartado 3.1.

8.- PREPARACIÓN DE LOS FÁRMACOS, DILUCIONES Y CONTROLES.

8.1.- FÁRMACOS Y DILUCIONES.

Los fármacos fueron proporcionados por sus laboratorios de origen en forma de polvo con la sustancia química en estado puro. Su manipulación para la obtención de las disoluciones madres, las posteriores diluciones realizadas hasta conseguir las concentraciones estudiadas en cultivo celular, así como su posterior adición y estudio en los cultivos celulares, se realizó en la campana de flujo laminar, y bajo la única iluminación proporcionada por una lámpara de vapor de sodio.

El polvo puro de TFP, DTZ y MBF fue disuelto en medio de cultivo y el polvo puro de VPM fue disuelto en medio de cultivo sin Anfotericina B. A partir de las disoluciones madre se realizaron diluciones sucesivas en medio de cultivo hasta conseguir concentraciones entre 10^{-3} M y 10^{-8} M de todos los fármacos. Los controles para todas las concentraciones de TFP, DTZ y MBF se realizaron con medio de cultivo con antibióticos y antifúngicos. Los controles para todas las concentraciones de VPM se realizaron con medio de cultivo con antibióticos sin Anfotericina B.

Las dihidropiridinas (NIC, NIF, NIM, NIT y NIS) son sustancias hidrófobas que precisaron la disolución inicial en etanol. A partir de la disolución madre se realizaron diluciones sucesivas en medio de cultivo hasta conseguir concentraciones entre 10^{-4} M y 10^{-8} M. Los controles para cada una de las concentraciones estudiadas de NIC, NIF, NIM, NIT y NIS se realizaron con una proporción de etanol idéntica a la de su concentración correspondiente. La cantidad de etanol máxima contenida en 10^{-4} M fue 0,1 μ l/ml (1:10.000).

Se determinó y se comprobó que el pH de todas las concentraciones y controles se encontraba en valores entre 7,0 y 7,4. Las disoluciones madres y las diluciones de todos los fármacos fueron conservadas en congelador a -20°C .

8.2.- CONCENTRACIONES ESTUDIADAS.

A partir de las disoluciones madre de los nueve fármacos incluidos en el estudio, fueron realizadas diluciones sucesivas en medio de cultivo hasta conseguir las cinco concentraciones que fueron estudiadas en todos ellos: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M.

En dependencia de los resultados obtenidos en los experimentos de reparación celular se utilizaron concentraciones superiores (hasta 10^{-3} M) o se realizaron nuevas diluciones para conseguir concentraciones intermedias a las señaladas anteriormente ($2,5 \cdot 10^{-n}$ M, $5 \cdot 10^{-n}$ M y $7,5 \cdot 10^{-n}$ M).

9.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

Los experimentos se efectuaron de manera secuencial. En primer lugar, se realizaron las pruebas de fotodegradación de NIM, NIC y NIS frente a tres fuentes de iluminación distintas (luz solar, luz de fluorescente y luz de sodio). Tras establecer los patrones de fotosensibilidad y fotoestabilidad de los tres fármacos, fueron adoptadas las medidas de aislamiento lumínico precisas y se determinaron las condiciones de iluminación adecuadas para la realización de los experimentos posteriores.

En segundo lugar, se validó el modelo de lesión *in vitro* mediante el estudio de la comparación y la correlación de las mediciones del área libre de células obtenidas por dos observadores independientes a partir de imágenes digitalizadas a las 0, 18, 24 y 48 horas. Se compararon todas las lesiones incluidas en tres grupos de lesiones, correspondientes a tres concentraciones diferentes de fármaco y sus respectivos controles. La comparación fue realizada de forma global y de forma independiente en cada uno de los tres grupos.

Posteriormente se calculó la correlación existente entre todas las mediciones obtenidas por los dos observadores en los cuatro tiempos del estudio.

En tercer lugar, y de acuerdo con el protocolo establecido en el apartado 3, se determinó la cinética de reparación fibroblástica. Fueron evaluadas las áreas de las lesiones realizadas en cultivos confluentes a distintos períodos de tiempo: 0, 18, 24 y 48 horas.

La cinética de reparación se estudió en presencia de suero bovino fetal y bajo el efecto de distintos fármacos inhibidores de los canales del Ca^{++} . Inicialmente se estudiaron los nueve fármacos en concentraciones de 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M. Tras determinar el rango de concentraciones efectivas se estudiaron las correspondientes concentraciones intermedias hasta determinar las concentraciones efectivas mínimas. Todas las concentraciones establecidas en los estudios de reparación celular fueron utilizadas secuencialmente en los experimentos de proliferación fibroblástica, adhesividad fibroblástica, viabilidad con WST-1 y, finalmente, viabilidad con tinción de azul tripán.

En cuarto lugar, tras finalizar los estudios de reparación celular, se evaluó la capacidad de los distintos fármacos para inhibir la proliferación de fibroblastos mediante el test espectrofotométrico WST-1, de acuerdo con el protocolo establecido en el apartado 4.

Posteriormente, se estudió mediante WST-1, la capacidad de los diferentes fármacos para inhibir la adhesividad de los fibroblastos a la placa de cultivo, según el protocolo establecido en el apartado 5.

Seguidamente, se evaluó la viabilidad fibroblástica en primer lugar con el test metabólico del WST-1, según el protocolo establecido en el apartado 6.1. y, finalmente, con tinción de azul tripán, según el protocolo establecido en el apartado 6.2.

Para concluir, se realizó el estudio citopatológico.

En todos los experimentos se estudió en primer lugar la TFP, seguida del DTZ, VPM, MBF, NIC, NIF, NIM, NIT y, finalmente, el NIS.

Para valorar el posible efecto del etanol sobre los experimentos, en todos los estudios (cinética de reparación, proliferación, adhesividad y viabilidad) realizados con la primera dihidropiridina (NIC), se compararon entre sí los controles de las concentraciones estudiadas en primer lugar (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M) y cada uno de ellos con un control con medio de cultivo sin etanol.

10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En todos los estudios, tanto de fotoestabilidad, como en los estudios celulares, cada experimento se repitió al menos cuatro veces. Las diferentes concentraciones analizadas se administraron por triplicado en cada experimento. Todas las concentraciones analizadas en cultivo celular fueron comparadas con sus correspondientes controles.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa informático Statistical Package for the Social Sciences 8.0.0.

En los estudios de fotoestabilidad se determinaron los coeficientes de correlación y los modelos de regresión correspondientes a cada experimento.

Para la validación del modelo de reparación celular se utilizó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney, el test de contraste de hipótesis para medias t de Student para datos no pareados y, por último, también fueron calculados los coeficientes de correlación de Pearson.

En el análisis estadístico de los experimentos de reparación, proliferación, adhesividad y viabilidad celular se aplicó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

Las dosis inhibitorias 50 (DI_{50}) se calcularon a partir de la fórmula de la curva que se obtuvo por regresión logarítmica en cada experimento (42, 54, 232).

Los resultados se expresan como la media \pm desviación típica ($X \pm DT$) tanto en valores absolutos como porcentuales. En todos los experimentos se consideró la significación estadística si ésta era menor al 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1.- ESTUDIO DE FOTSENSIBILIDAD DE DIHIDROPIRIDINAS.

1.1.- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NICARDIPINO, NIMODIPINO Y NISOLDIPINO.

1.1.1.- DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DEL SISTEMA DE DETECCIÓN.

Fueron realizados barridos espectroscópicos con diferentes diluciones de los fármacos hasta que la absorbancia quedó comprendida en el rango 0-1, rango que se consideró lineal. Los perfiles espectroscópicos y los valores de absorbancia obtenidos se expresan en las tablas 8, 9 y 10, y en las figuras 22, 23 y 24.

Al comparar los espectros de absorción se observó una gran semejanza entre los tres, presentando el punto máximo de absorbancia para todos ellos en la zona de los 240 nm. En consecuencia, la longitud de onda óptima utilizada en el sistema de detección para todos los compuestos fue 240 nm.

1.1.2.- OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL EN HPLC.

Los resultados obtenidos por las variaciones del pH en el rango 7-7,90 y de las proporciones de los diversos componentes de la fase móvil mostraron que las condiciones cromatográficas óptimas eran las siguientes:

- Fase estacionaria: Columna Nova-Pack, 4 μ m 60 (3,9 cm x 150 mm).
- Fase móvil: Acetonitrilo-metanol-acetato amónico (0,04 M)-TEA (20-40-40-0,04 v/v).
- pH = 7,7.
- Flujo: 1,2 ml/minuto.
- Longitud de onda: 240 nm.

Partiendo de estas condiciones cromatográficas óptimas se establecieron los tiempos de retención de cada uno de los compuestos estudiados:

- NIC = 12,5 minutos.
- NIM = 5,61 minutos.
- NIS = 7,25 minutos.

1.2.- PATRONES DE FOTOSENSIBILIDAD Y FOTOESTABILIDAD DE LAS DIHIDROPIRIDINAS.

Los resultados obtenidos mediante HPLC para cada uno de los compuestos estudiados tras ser expuestos a luz solar, luz de fluorescente o luz de sodio fueron los siguientes:

1.2.1.- ESTUDIO DE LA FOTOSENSIBILIDAD DEL NICARDIPINO.

El NIC resultó ser estable frente a la luz de sodio y de fluorescente en el intervalo de tiempo ensayado y sufrió fotodescomposición frente a la iluminación solar con una vida media de aproximadamente 38 minutos. Su señal resultó indetectable tras ser expuesto durante 120 o más minutos a la acción de la luz solar.

Los perfiles cromatográficos del NIC y los valores de señal obtenidos frente a las tres fuentes de iluminación pueden observarse en las figuras 25, 26 y 27, y en la tabla 11 respectivamente. En la figura 28 se muestra la cinética de fotodegradación del NIC.

1.2.2.- ESTUDIO DE LA FOTOSENSIBILIDAD DEL NIMODIPINO.

El NIM se degradó al ser expuesto a la luz solar, presentado una vida media de aproximadamente 104 minutos. Sin embargo, demostró ser fotoestable frente a la luz de sodio y de fluorescente durante el tiempo estudiado.

Los perfiles cromatográficos del NIM frente a las tres fuentes de iluminación y los valores de señal en HPLC pueden observarse en las figuras 29, 30 y 31, y en la tabla 12 respectivamente. En la figura 32 se muestra el comportamiento del NIM frente a las distintas iluminaciones.

1.2.3.- ESTUDIO DE LA FOTOSENSIBILIDAD DEL NISOLDIPINO.

El NIS presentó estabilidad frente a la luz de sodio durante el tiempo del ensayo. Sin embargo, se degradó frente a la iluminación de fluorescente y mucho más rápidamente frente a la luz solar, presentando en ambos casos un modelo biexponencial de degradación.

Los perfiles cromatográficos del NIS frente a las tres fuentes de iluminación y los valores de señal obtenidos con HPLC pueden observarse en las figuras 33, 34 y 35, y en

la tabla 13 respectivamente. En la figura 36 se muestra la fotodescomposición del NIS frente a la iluminación solar y de fluorescente, así como su fotoestabilidad frente a la luz de sodio.

Tabla 8. Valores de absorbancia obtenidos en el barrido espectroscópico de nicardipino.

Longitud de onda (nm)	Absorbancia
200,0	0,141
220,0	0,028
240,0(*)	0,313(**)
260,0	0,165
280,0	0,088
300,0	0,045
320,0	0,049
340,0	0,082
360,0	0,108
380,0	0,080
400,0	0,029

(*) Longitud de onda óptima para el sistema de detección.

(**) Absorbancia máxima.

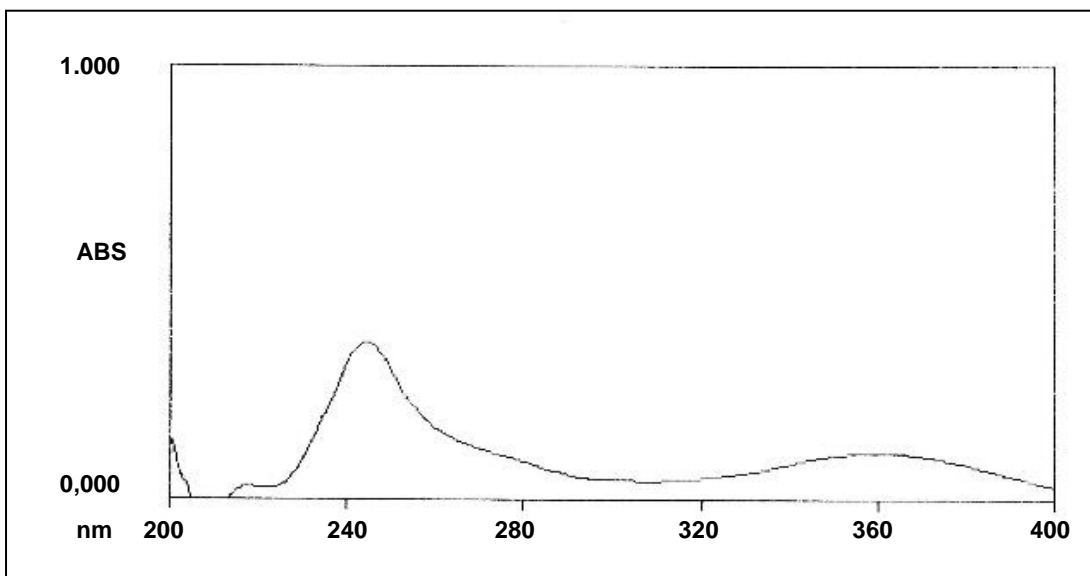


Figura 22. Perfil espectroscópico de nicardipino.

Tabla 9. Valores de absorbancia obtenidos en el barrido espectroscópico de nimodipino.

Longitud de onda (nm)	Absorbancia
200,0	0,159
220,0	0,042
240,0(*)	0,453(**)
260,0	0,229
280,0	0,133
300,0	0,065
320,0	0,062
340,0	0,104
360,0	0,142
380,0	0,115
400,0	0,045

(*) Longitud de onda óptima para el sistema de detección.

(**) Absorbancia máxima.

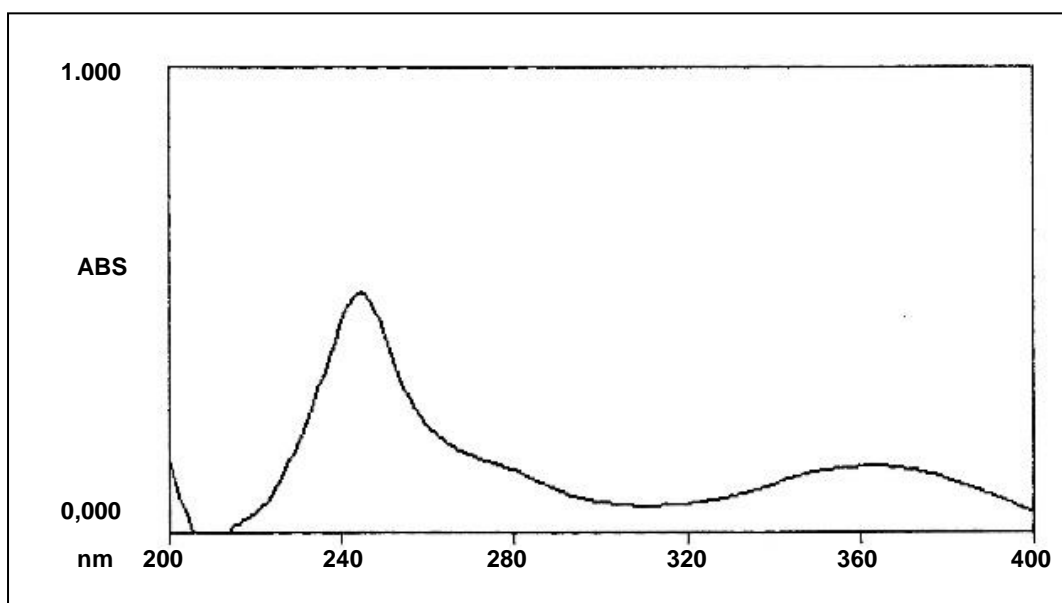


Figura 23. Perfil espectroscópico de nimodipino.

Tabla 10. Valores de absorbancia obtenidos en el barrido espectroscópico de nisoldipino.

Longitud de onda (nm)	Absorbancia
200,0	0,193
220,0	0,280
240,0(*)	0,460(**)
260,0	0,209
280,0	0,076
300,0	0,084
320,0	0,111
340,0	0,125
360,0	0,122
380,0	0,106
400,0	0,060

(*) Longitud de onda óptima para el sistema de detección.

(**) Absorbancia máxima.

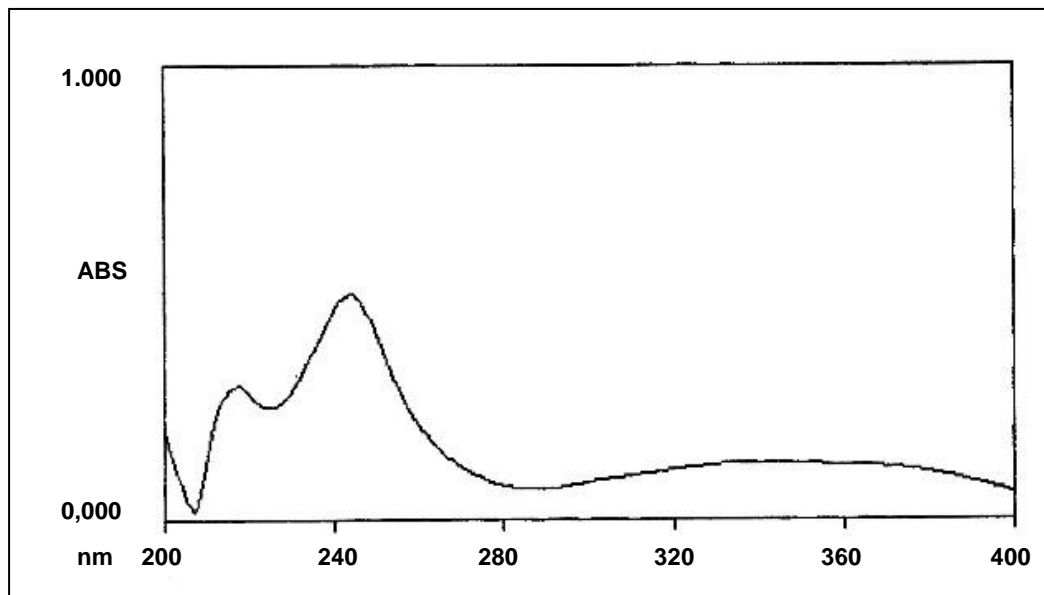


Figura 24. Perfil espectroscópico de nisoldipino.

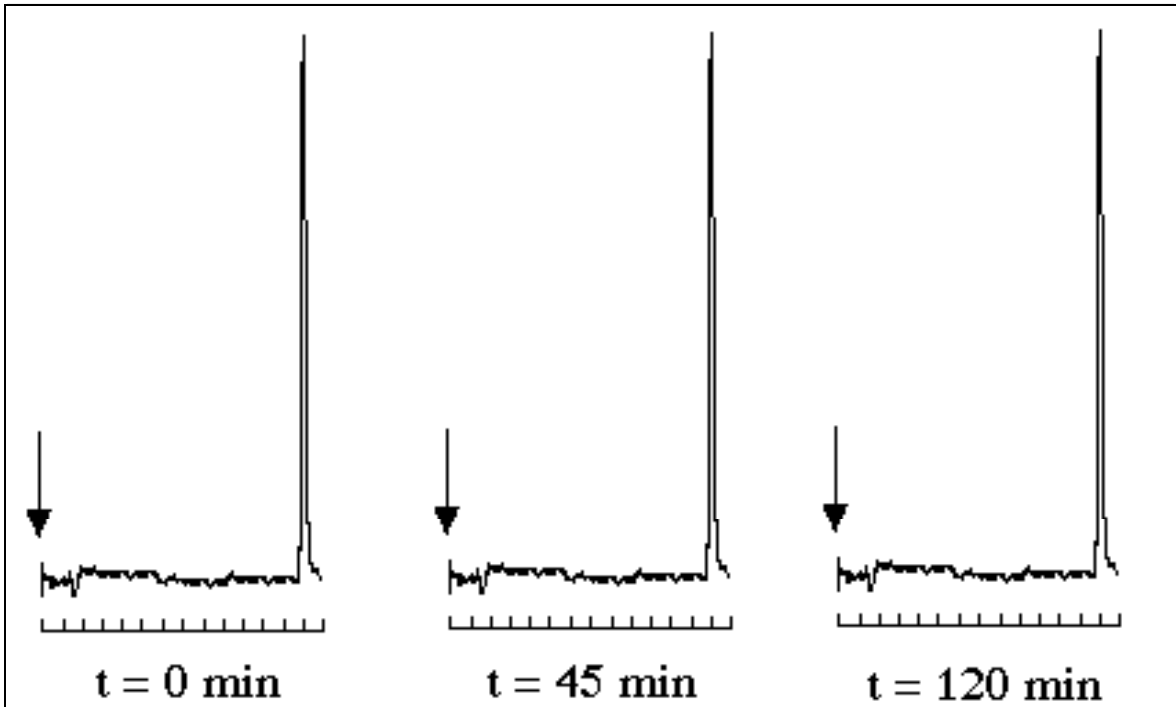


Figura 25. Perfil cromatográfico del nicardipino frente a luz de sodio a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotoestabilidad. Señal en milivoltios.

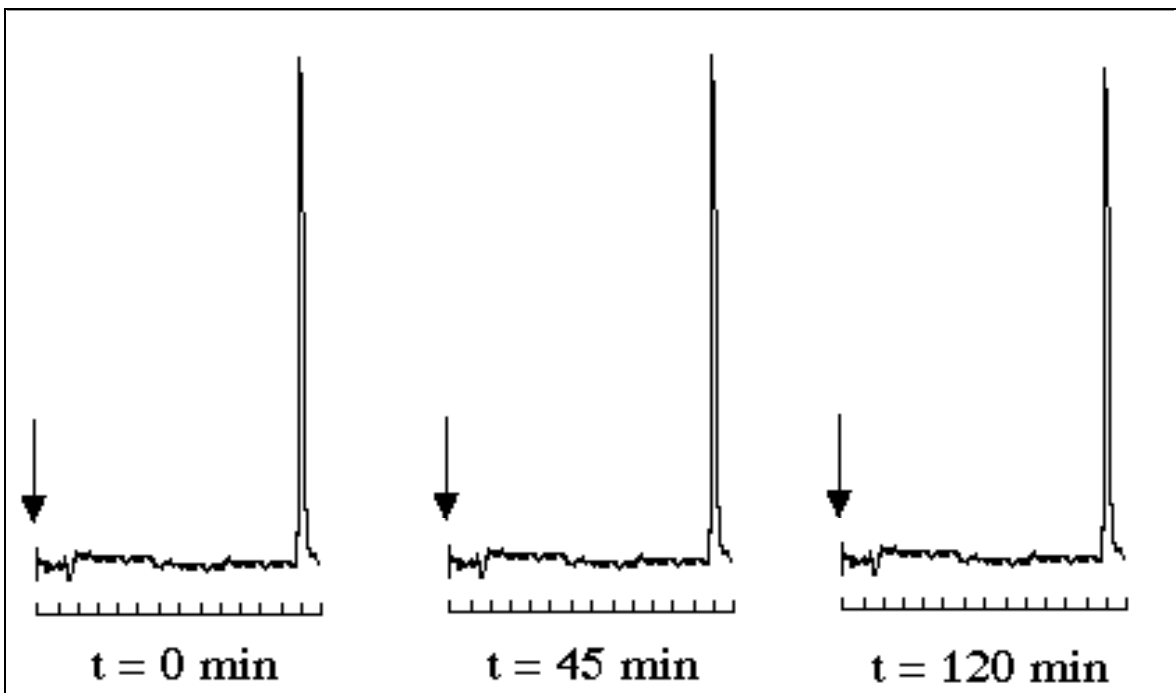


Figura 26. Perfil cromatográfico del nicardipino frente a luz de fluorescente a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotoestabilidad. Señal en milivoltios.

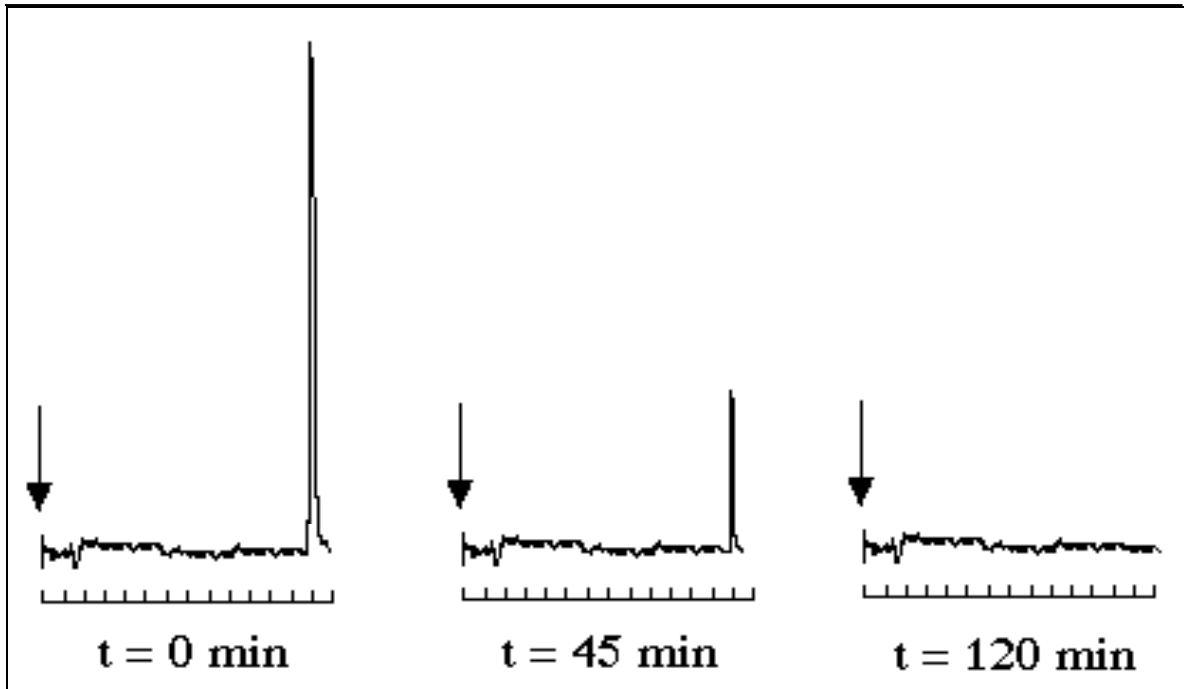


Figura 27. Perfil cromatográfico del nifedipino frente a luz solar a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotosensibilidad frente a esta fuente luminosa. Los niveles de señal son indetectables a los 120 minutos. Señal en milivoltios.

Tabla 11. Datos de señal obtenidos por el nifedipino frente a distintas iluminaciones en función del tiempo. Los datos de señal expresan la media de tres determinaciones.

Tiempo (minutos)	Señal (mV)		
	Luz de sodio	Luz fluorescente	Luz solar
0	5,18	4,58	5,16
5	5,15	4,60	4,25
15	5,25	4,59	3,33
25	5,10	4,60	2,62
45	5,08	4,59	1,64
60	5,10	4,58	1,14
90	5,10	4,65	0,53
120	5,09	4,61	0,00
180	4,98	4,58	0,00
240	5,07	4,60	0,00
300	5,11	4,60	0,00

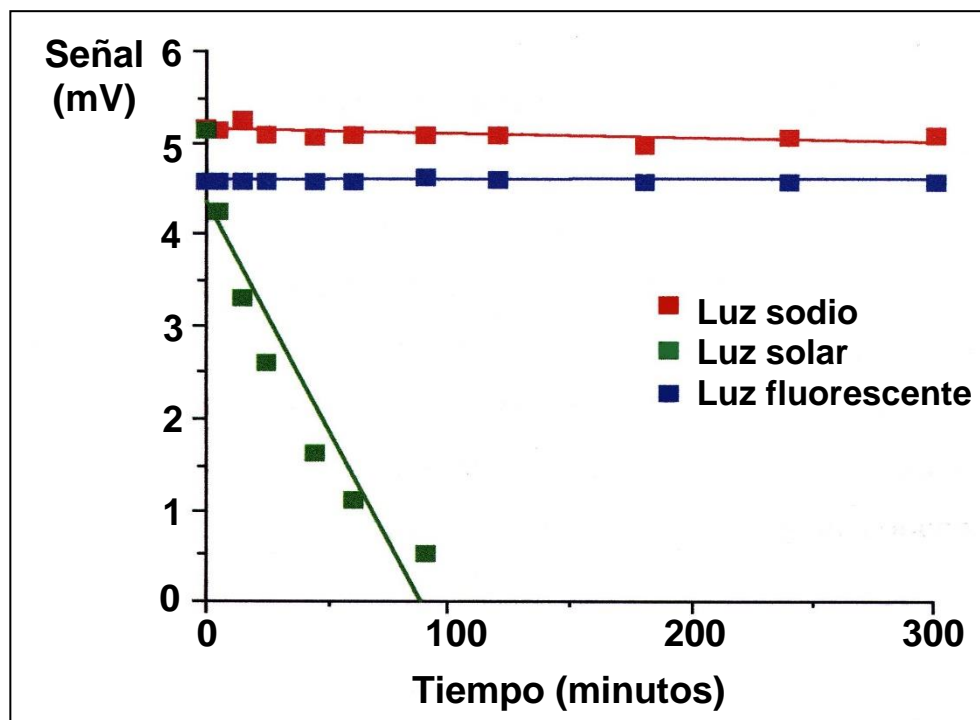


Figura 28. Comportamiento del nicardipino frente a las distintas iluminaciones. Fotodegradación, ecuación de descomposición y tiempo de vida media frente a la luz solar. Fotoestabilidad frente a la luz de sodio y de fluorescente.

Luz solar: $y = -0,0146 x + 3,1338$.

$t_{1/2} = 38$ minutos.

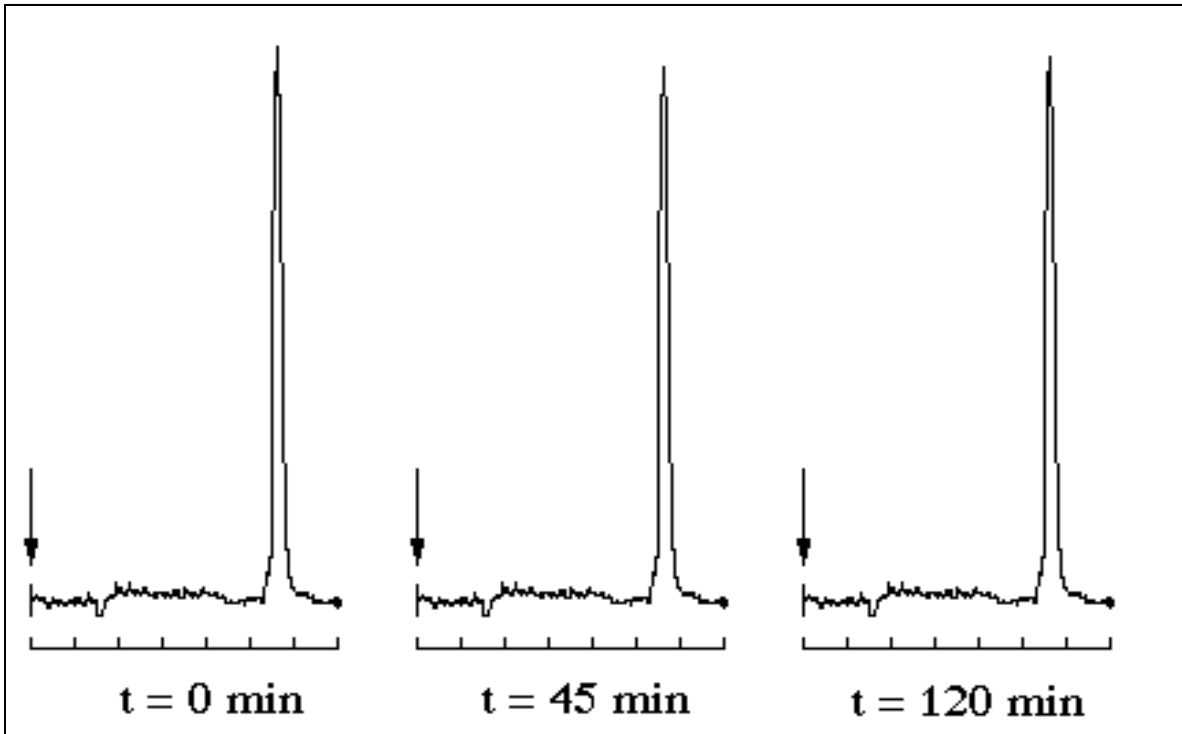


Figura 29. Perfil cromatográfico del nimodipino frente a luz de sodio a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotoestabilidad. Señal en milivoltios.

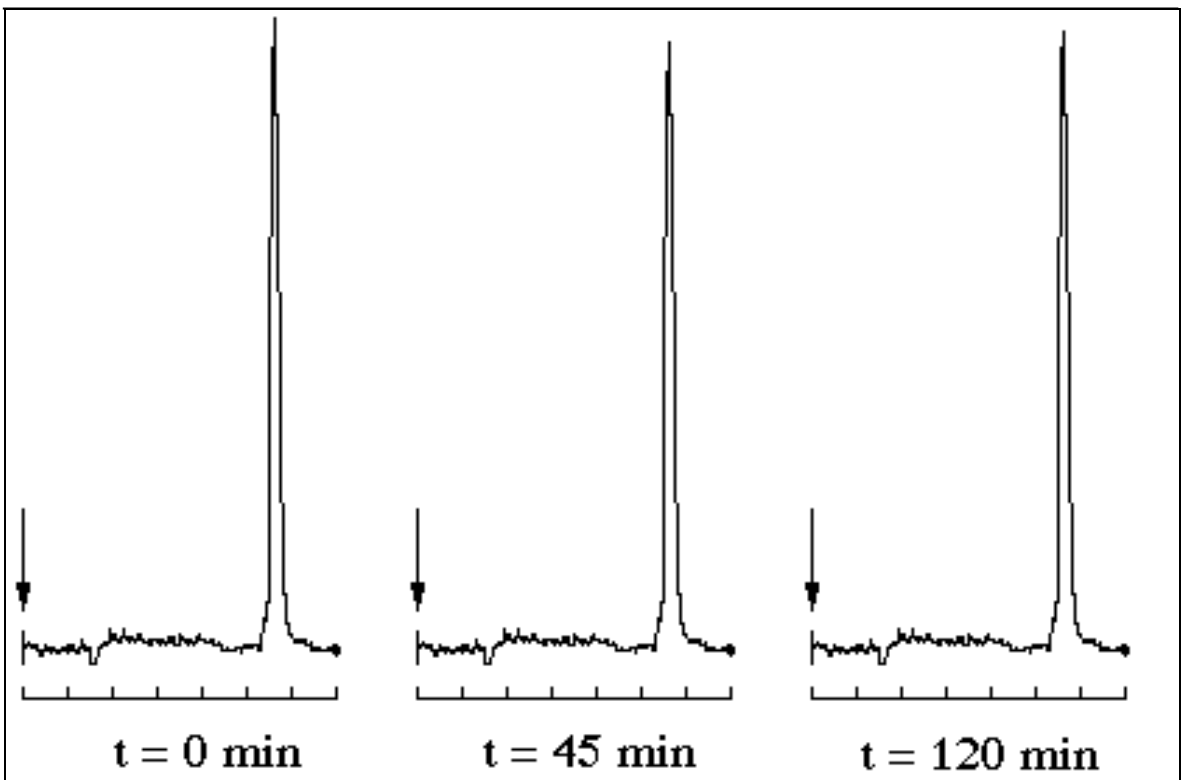


Figura 30. Perfil cromatográfico del nimodipino frente a luz de fluorescente a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotoestabilidad. Señal en milivoltios.

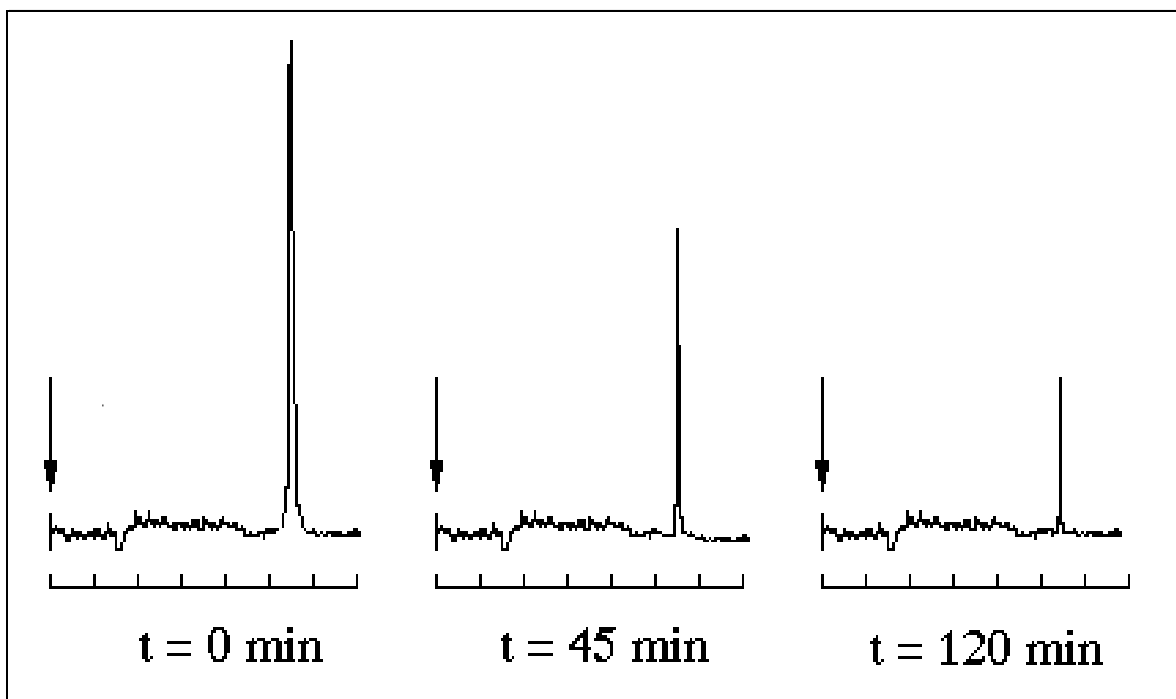


Figura 31. Perfil cromatográfico del nimodipino frente a luz solar a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotosensibilidad. Señal en milivoltios.

Tabla 12. Datos de señal obtenidos por el nimodipino frente a distintas iluminaciones en función del tiempo. Los datos de señal expresan la media de tres determinaciones.

Tiempo (minutos)	Señal (mV)		
	Luz de sodio	Luz fluorescente	Luz solar
0	16,75	17,82	12,58
5	16,80	17,77	12,08
15	16,55	17,50	10,69
25	16,70	17,42	9,51
45	16,66	17,38	7,81
60	16,52	17,48	6,91
90	16,76	17,01	5,80
120	16,62	17,35	3,45
180	16,57	17,61	1,72
240	16,71	17,58	0,82
300	16,80	17,60	0,41

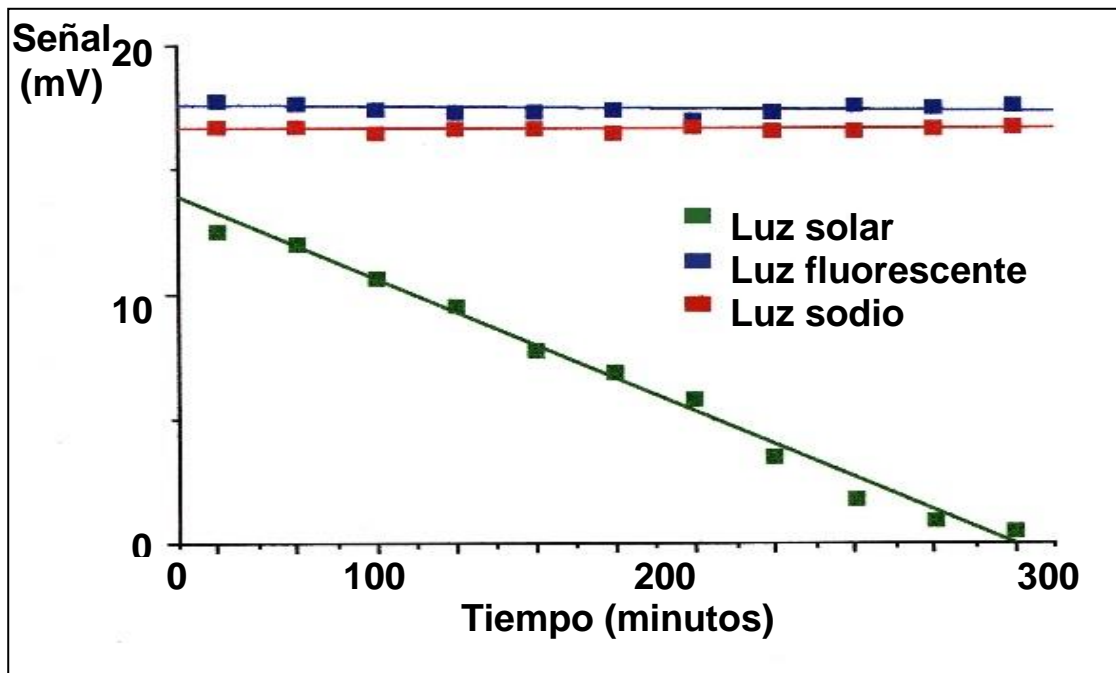


Figura 32. Comportamiento del nimodipino frente a las distintas iluminaciones. Fotodescomposición, ecuación de descomposición y tiempo de vida media frente a la luz solar. Fotoestabilidad frente a la luz de sodio y fluorescente.

Luz solar: $y = -0,0416 x + 10,6312$.

$t_{1/2} = 104$ minutos.

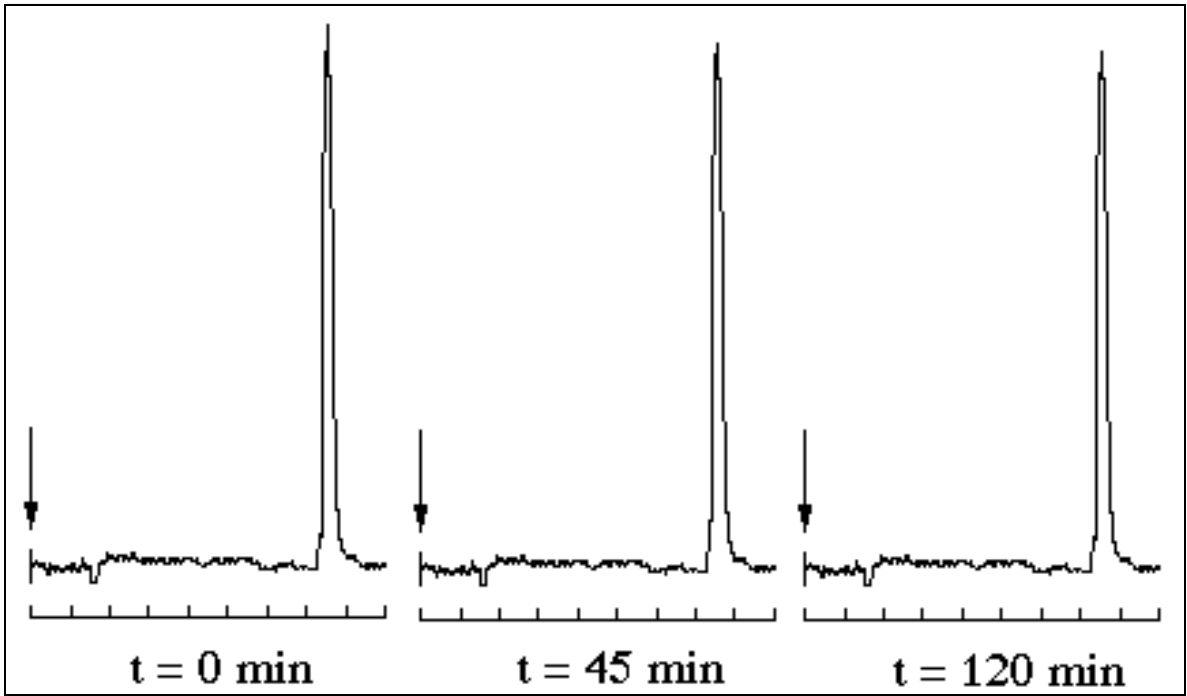


Figura 33. Perfil cromatográfico del nisoldipino frente a luz de sodio a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotoestabilidad. Señal en milivoltios.

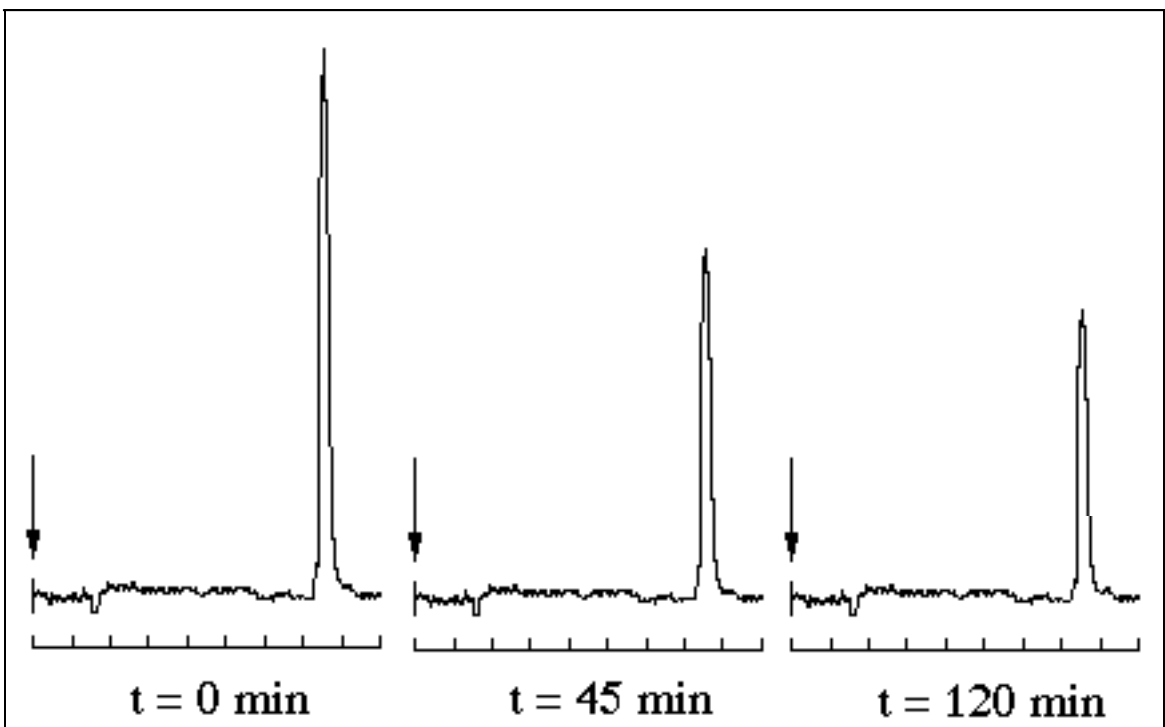


Figura 34. Perfil cromatográfico del nisoldipino frente a luz de fluorescente a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotosensibilidad. Señal en milivoltios.

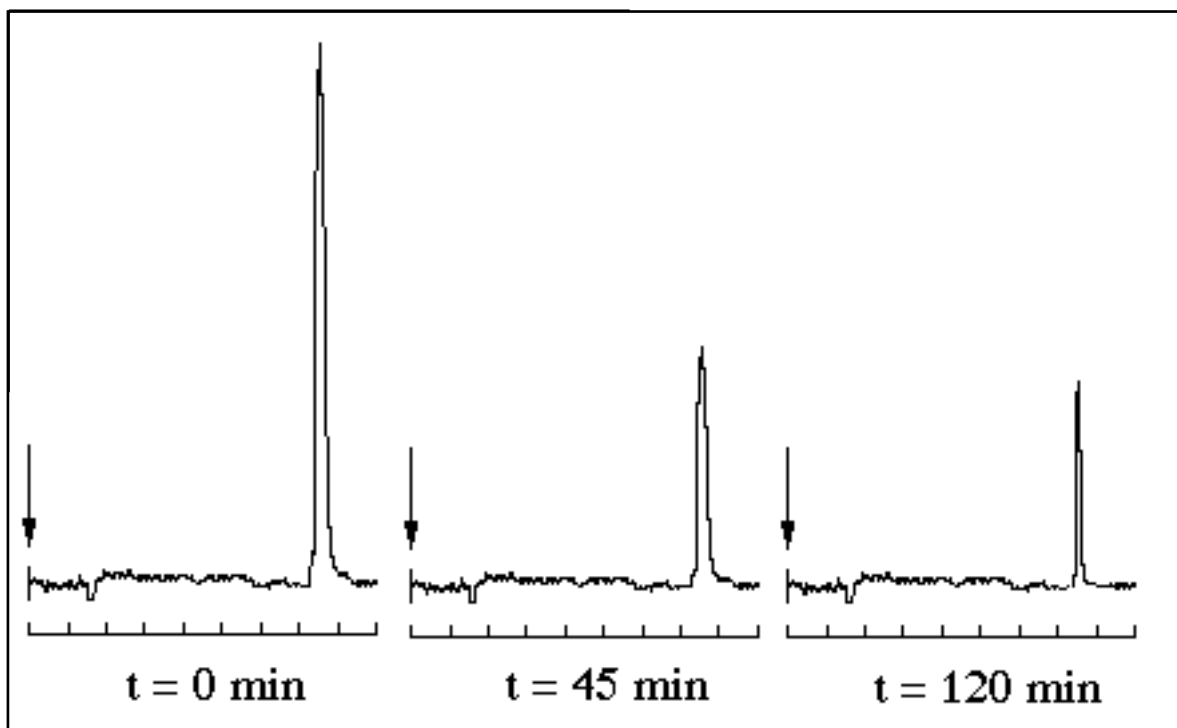


Figura 35. Perfil cromatográfico del nisoldipino frente a luz solar a los 0, 45 y 120 minutos que demuestra su fotosensibilidad. Señal en milivoltios.

Tabla 13. Datos de señal obtenidos por el nisoldipino frente a distintas iluminaciones en función del tiempo. Los datos de señal expresan la media de tres determinaciones.

Tiempo (minutos)	Señal (mV)		
	Luz de sodio	Luz fluorescente	Luz solar
0	12,38	15,52	13,42
5	12,25	12,53	6,32
15	11,90	11,41	6,29
25	12,00	10,38	6,15
45	11,97	10,11	5,93
60	11,96	9,56	5,83
90	11,98	9,04	5,44
120	11,96	8,55	5,15
180	11,95	7,93	4,76
240	11,97	7,62	4,40
300	12,01	7,00	4,10

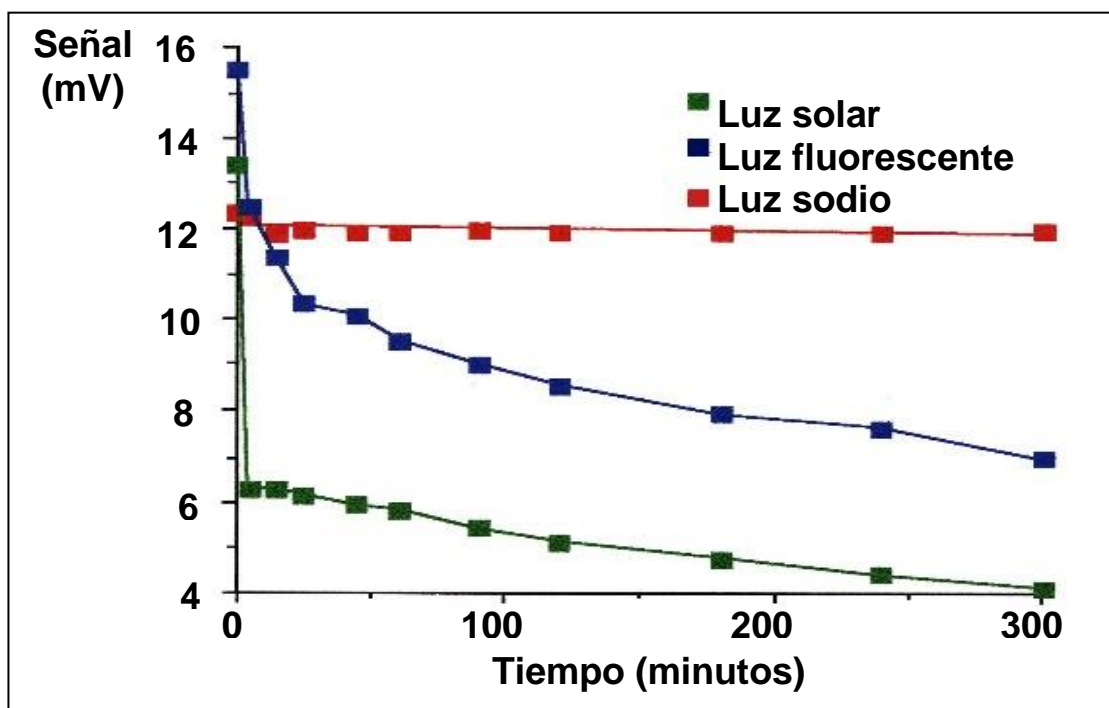


Figura 36. Comportamiento del nisoldipino frente a las distintas iluminaciones. Fotodescomposición, ecuaciones de descomposición y tiempos de vida media frente a la iluminación solar y de fluorescente. Fotoestabilidad frente a la iluminación de sodio.

Luz solar: $y = 0,0001 x^2 - 0,0475 x + 8,8986$.

$t_{1/2} = 51$ minutos.

Luz fluorescente: $y = 0,0001 x^2 - 0,0523 x + 12,8827$.

$t_{1/2} = 130$ minutos.

2.- ESTABLECIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

A partir de las biopsias de cápsula de Tenon humana se establecieron seis líneas celulares con las que se realizaron todos los experimentos. Tras tres días de incubación se pudo observar, mediante microscopía de gran magnificación, el inicio de la migración de los primeros fibroblastos hacia el exterior de los márgenes de los explantes (figura 37). En los días siguientes prosiguieron los fenómenos de migración y proliferación de fibroblastos en los márgenes de las biopsias. Tras 4-6 semanas de incubación los fibroblastos formaron una monocapa confluyente que rodeaba a todo el explante, lista para su propagación inicial (figura 38).

Las siembras fueron sometidas a digestión con tripsina-EDTA para proceder a la realización de subcultivos de fibroblastos (figura 39). Tras su primera propagación las células mostraron una gran capacidad de adherencia a la placa de cultivo y presentaron una morfología fibroblástica típica exhibiendo, al encontrarse en estado subconfluyente, múltiples prolongaciones citoplasmáticas del tipo de pseudópodos, lamelipodios y filopodios (figuras 40 y 41) que desaparecían al alcanzar la confluencia. Inicialmente los fibroblastos proliferaron formando pequeñas agrupaciones celulares (figura 42) y, tras 4 semanas, constituyeron haces (figura 43). Tras alcanzar un estado subconfluyente los fibroblastos fueron propagados sucesivamente hasta alcanzar el pase séptimo.

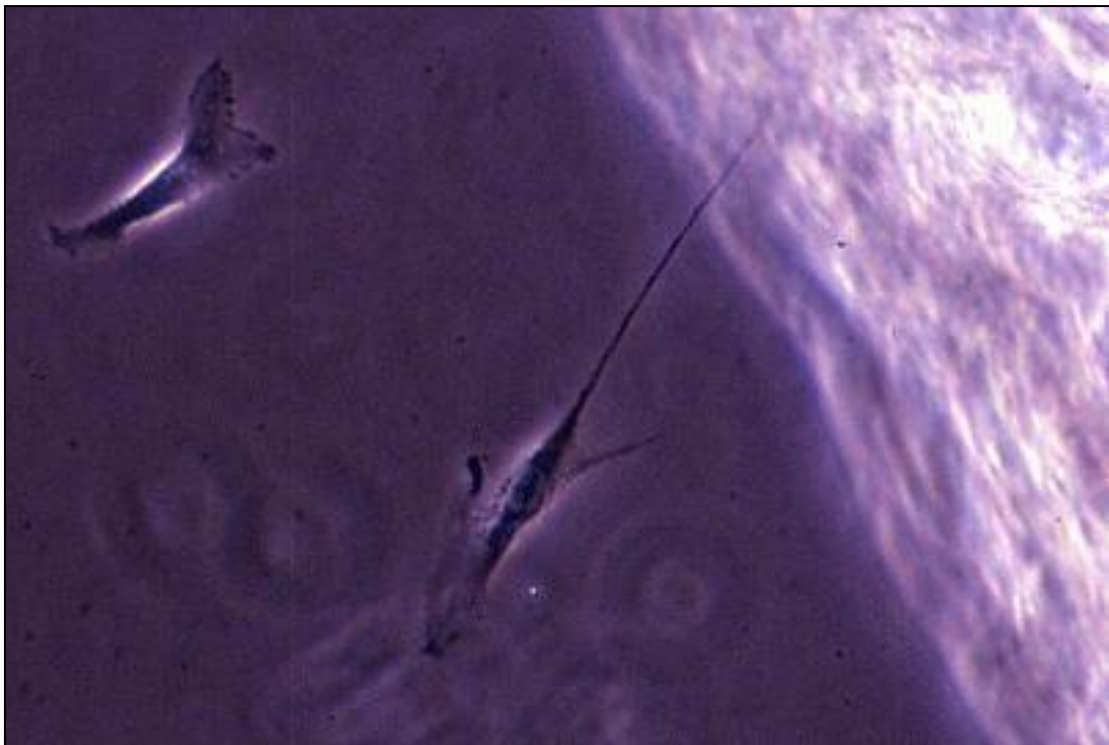


Figura 37. Explante de cápsula de Tenon humana tras 3 días de incubación. Se aprecia la migración inicial de fibroblastos a partir de los márgenes de la pieza. Microscopía de inversión de fases (40X).

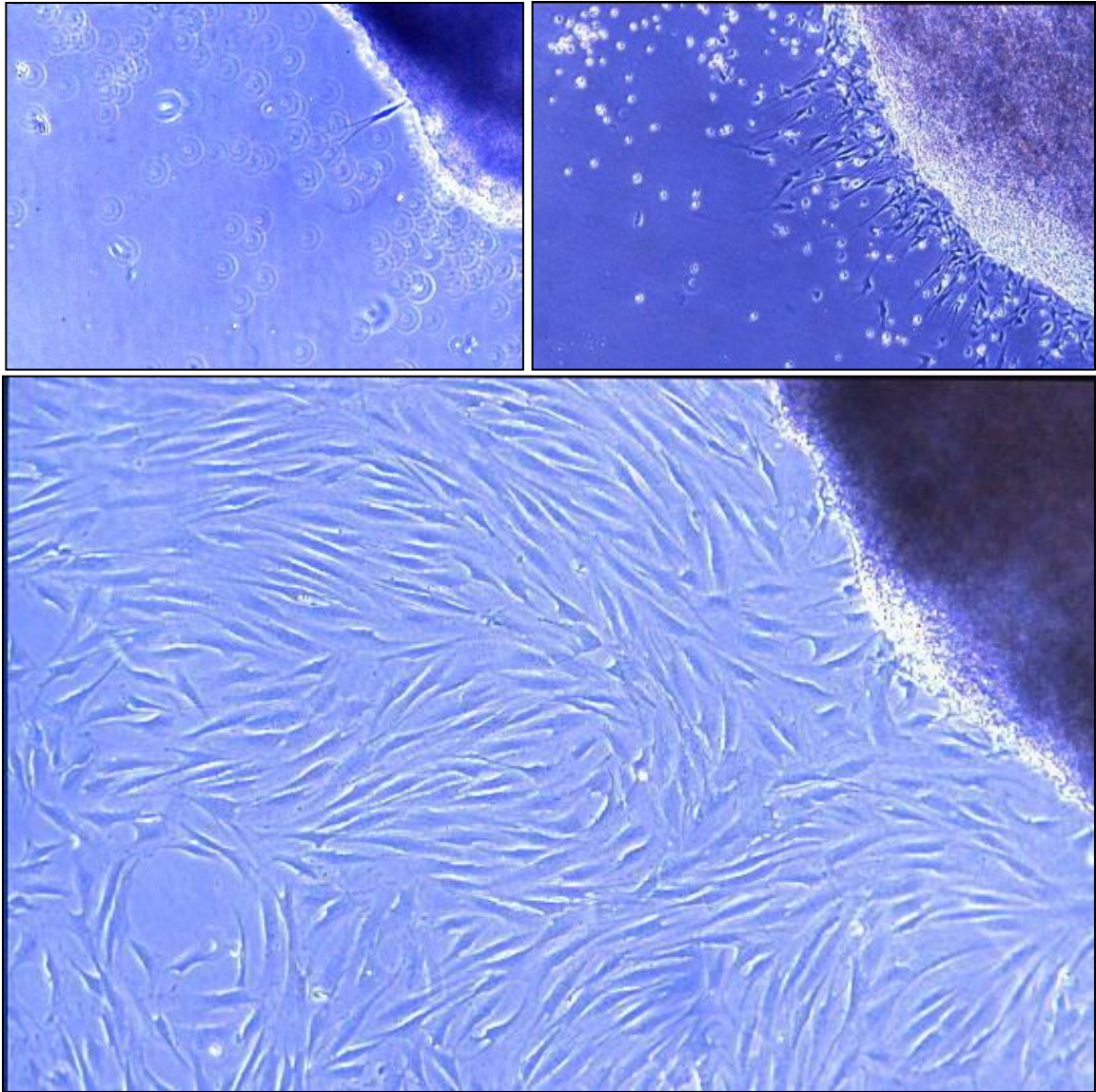


Figura 38. Imágenes de microscopía de inversión de fases en las que se observa un explante tras 3 días de incubación (superior izquierda) con crecimiento inicial de fibroblastos (10X). El mismo explante tras 7 días (superior derecha) (10X) y tras 2 semanas (inferior) con un crecimiento fibroblástico confluyente que rodea el explante (20X).

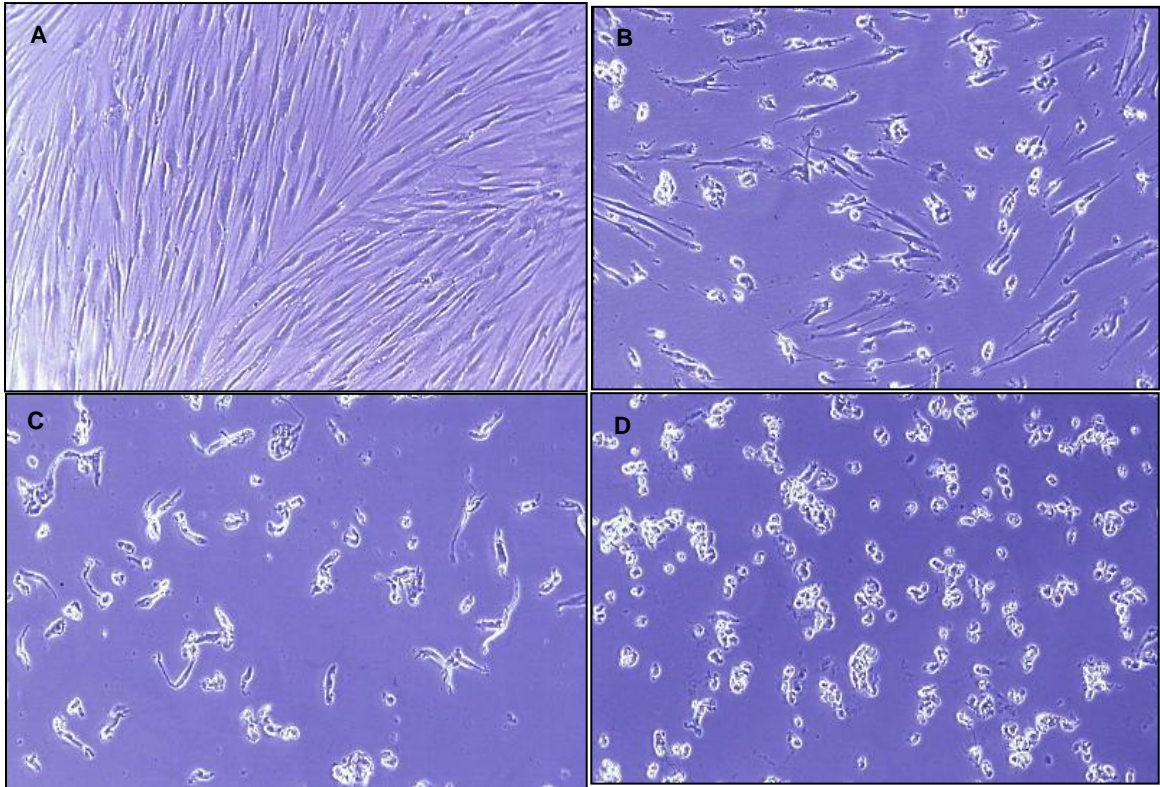


Figura 39. A: Monocapa de fibroblastos. B: Tras 1 minuto de digestión con tripsina-EDTA se aprecian fibroblastos adheridos y desprendidos de la superficie de cultivo. C: Tras 2 minutos aumentan los fibroblastos desprendidos. D: Tras 5 minutos todos los fibroblastos se han desprendido y adoptan una morfología globulosa. Microscopía de inversión de fases (10X).

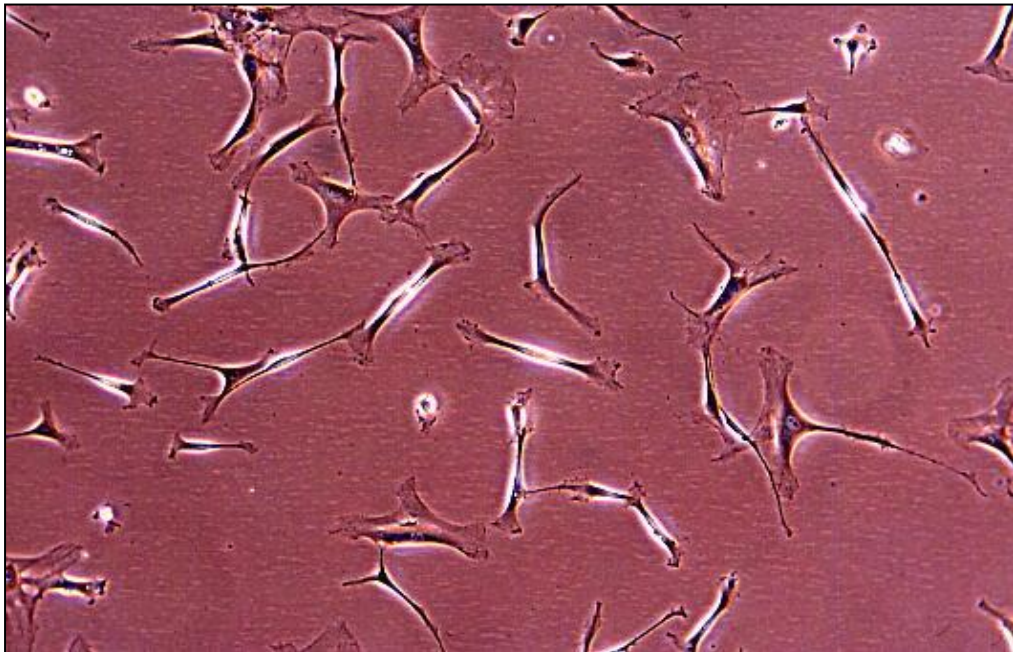


Figura 40. Células en la placa de cultivo con morfología fibroblástica típica en estado subconfluyente, con múltiples prolongaciones citoplasmáticas. Microscopía de inversión de fases (10X).

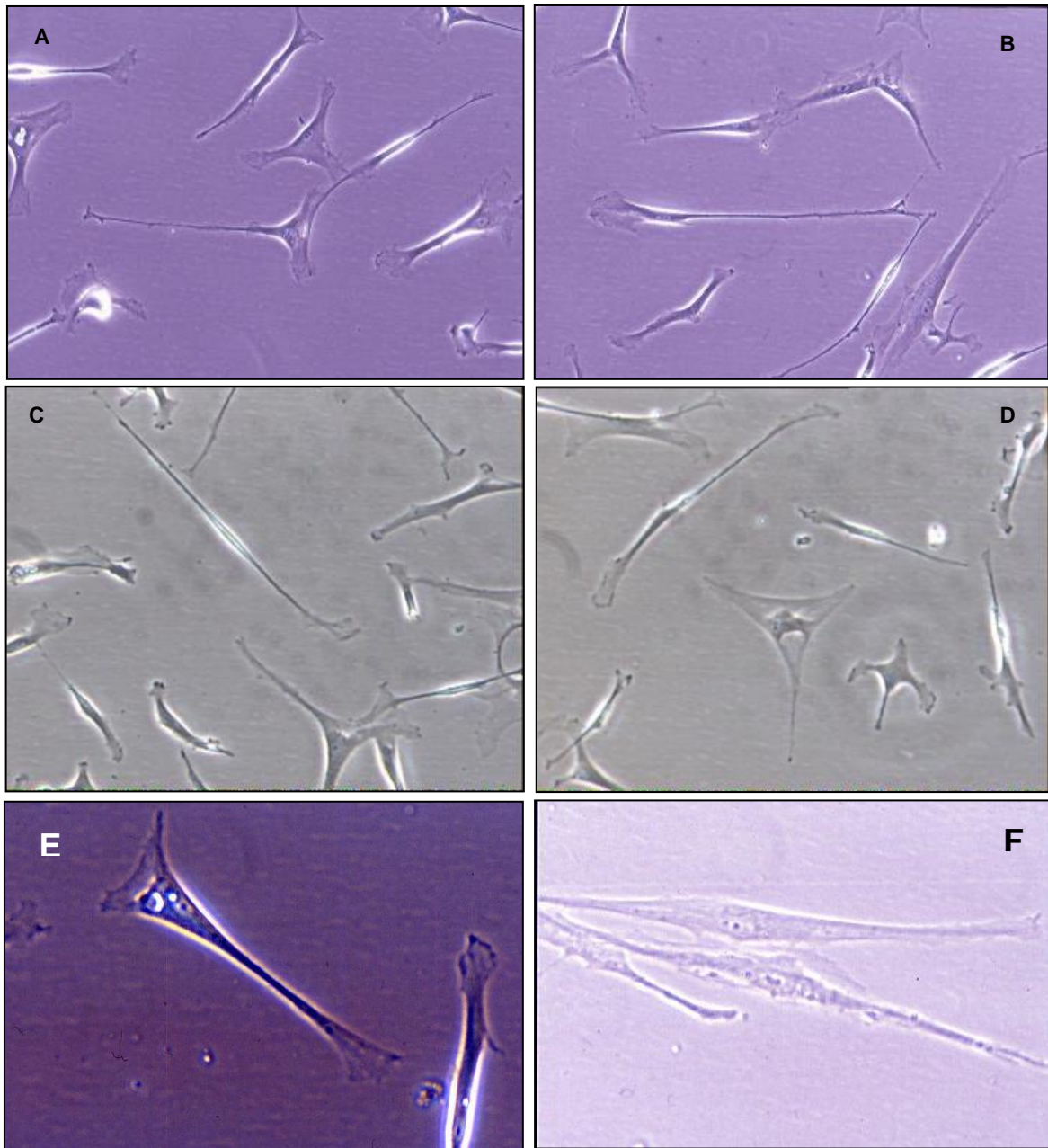


Figura 41. A, B, C y D: Fibroblastos en crecimiento en estado subconfluente. Morfología fibroblástica típica con múltiples prolongaciones citoplasmáticas (20X). E y F: Detalles de fibroblastos a gran aumento (40X). Microscopía de inversión de fases.

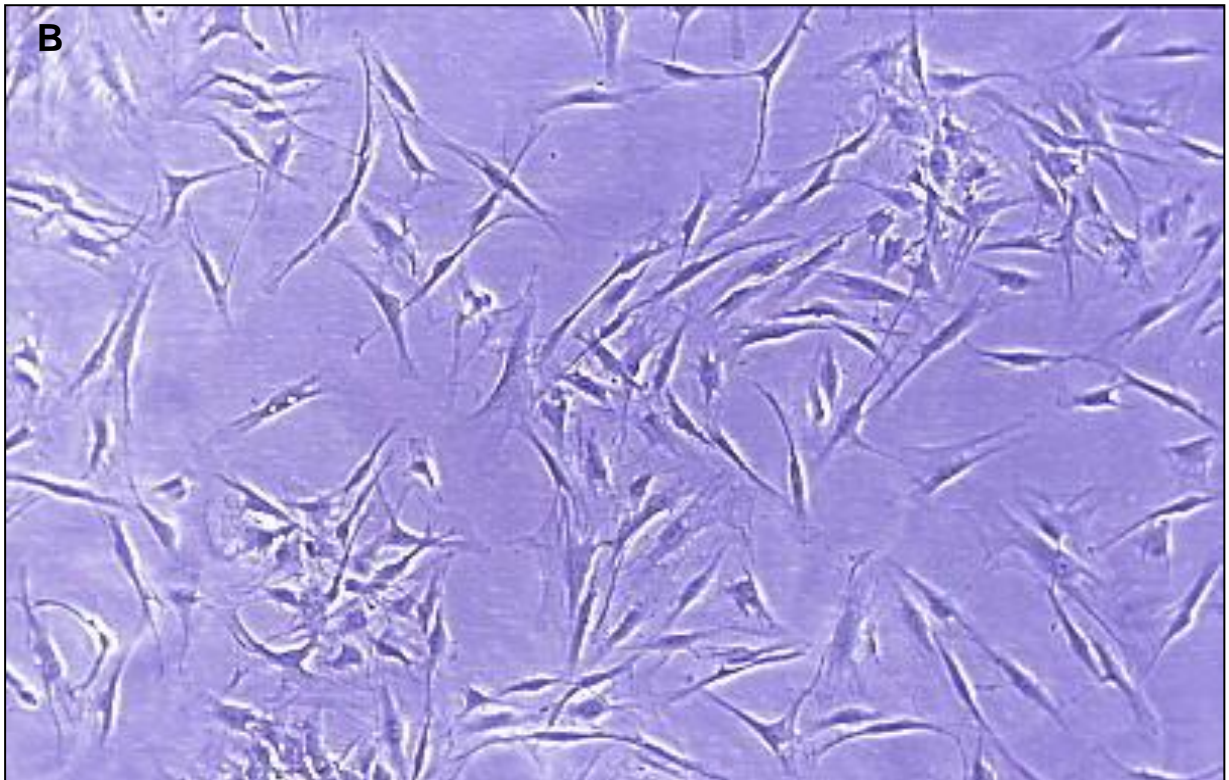
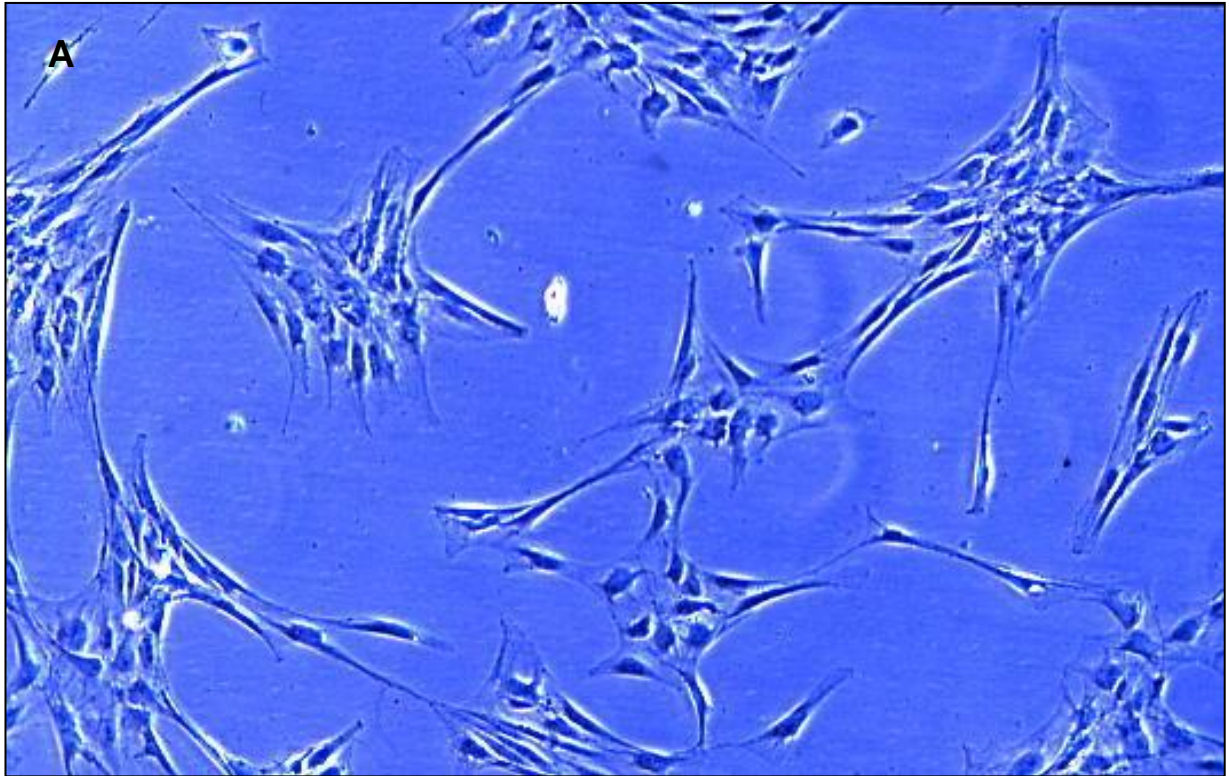


Figura 42. A: Placa de cultivo con las típicas agrupaciones de fibroblastos en crecimiento. B: Tras varios días se aprecia un aumento del número de fibroblastos que alcanzan un estado subconfluyente. Microscopía de inversión de fases (10X).

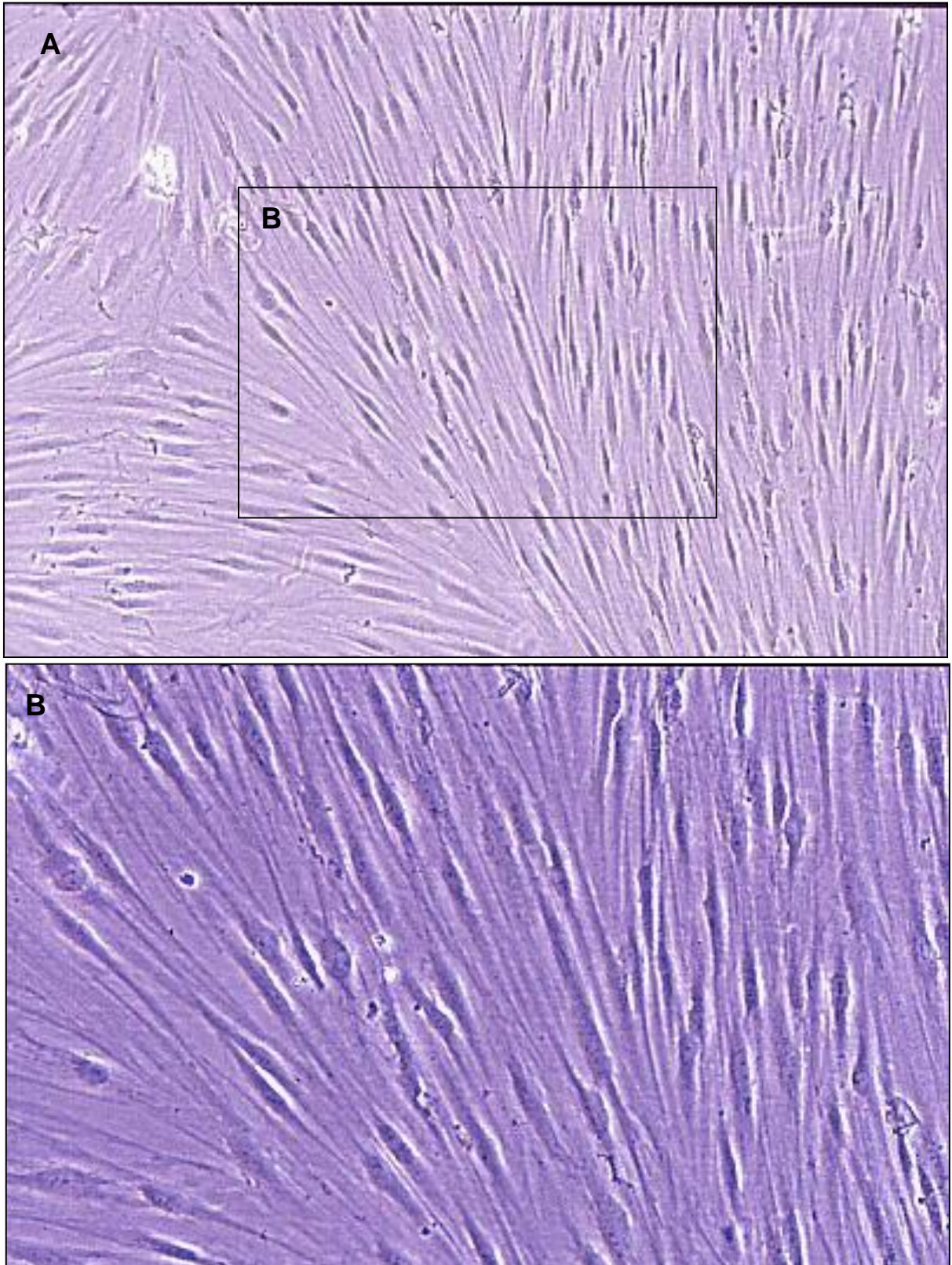


Figura 43. A: Monocapa de fibroblastos confluentes (10X). B: Ampliación del recuadro (20X).
Microscopía de inversión de fases.

3.- VALIDACIÓN DEL MODELO DE LESIÓN *IN VITRO*.

3.1.- COMPARACIÓN Y CORRELACIÓN.

Una vez establecido el modelo experimental de lesión *in vitro*, se compararon las mediciones del área libre de fibroblastos realizadas por dos observadores independientes en los cuatro tiempos estudiados, en tres experimentos consecutivos que incluían tres concentraciones diferentes de un mismo fármaco.

El coeficiente de correlación existente entre las mediciones del área libre de fibroblastos obtenida por los dos observadores en los cuatro tiempos del estudio fue $>0,9$ en todos los casos (tabla 14).

La comparación entre cada grupo de 72 áreas medidas por cada observador no presentó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los cuatro tiempos estudiados según el test de contraste de hipótesis para medias *t* de Student para datos no pareados. De igual manera, no se observaron diferencias significativas entre los observadores al comparar las áreas de las úlceras que formaban cada uno de los tres experimentos, tanto entre los casos como entre los controles (tabla 15).

Finalmente, utilizando el test de la U de Mann-Whitney no se detectaron diferencias significativas entre los observadores al comparar la cinética de reparación tisular de los tres experimentos, presentando los dos observadores similar grado de significación estadística al comparar los casos con sus correspondientes controles a las 0, 18, 24 y 48 h (tabla 15).

Tabla 14. Correlación existente en las mediciones del área libre de células obtenidas por los dos observadores, en los cuatro tiempos del estudio.

CORRELACIÓN	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
OBSERVADORES 1-2	$r = 0,996$	$r = 0,995$	$r = 0,997$	$r = 0,957$

r: Coeficiente de correlación de Pearson

Tabla 15. Áreas libres de fibroblastos cuantificadas por los dos observadores sobre tres experimentos consecutivos en los cuatro tiempos estudiados. Los valores representan el área media \pm desviación típica en mm². ** p<0,01.

VALIDACIÓN ULCERAS	0 HORAS X \pm DT	18 HORAS X \pm DT	24 HORAS X \pm DT	48 HORAS X \pm DT
OBSERVADORES 1 Y 2				
TOTAL (n=144)	0,5093 \pm 0,0703	0,2750 \pm 0,1139	0,1967 \pm 0,1304	0,0810 \pm 0,1125
CONTROLES (n=72)	0,5186 \pm 0,0658	0,2121 \pm 0,0911	0,1171 \pm 0,1020	0,0103 \pm 0,0169
CASOS (n=72)	0,5001 \pm 0,0738	0,3380 \pm 0,0990	0,2763 \pm 0,1048	0,1517 \pm 0,1227
OBSERVADOR 1				
TOTAL (n=72)	0,5086 \pm 0,0708	0,2735 \pm 0,1160	0,1957 \pm 0,1310	0,0835 \pm 0,1143
CONTROLES (n=36)	0,5175 \pm 0,0668	0,2091 \pm 0,0920	0,1168 \pm 0,1028	0,0100 \pm 0,0166
CASOS (n=36)	0,4996 \pm 0,0744	0,3380 \pm 0,1014	0,2747 \pm 0,1069	0,1570 \pm 0,1229
CONTROL A (n=12)	0,5421 \pm 0,0603	0,2222 \pm 0,1085	0,1264 \pm 0,1256	0,0129 \pm 0,0198
CASO A (n=12)	0,5105 \pm 0,0679	0,3969 \pm 0,0673 **	0,3389 \pm 0,1004**	0,2903 \pm 0,1126**
CONTROL B (n=12)	0,5410 \pm 0,0581	0,2189 \pm 0,0969	0,1150 \pm 0,1151	0,0125 \pm 0,0200
CASO B (n=12)	0,4989 \pm 0,0901	0,3498 \pm 0,0724**	0,2710 \pm 0,0889**	0,0833 \pm 0,0372**
CONTROL C (n=12)	0,4696 \pm 0,0587	0,1862 \pm 0,0701	0,1090 \pm 0,0663	0,0045 \pm 0,0058
CASO C (n=12)	0,4903 \pm 0,0680	0,2694 \pm 0,1139	0,2165 \pm 0,0976**	0,0973 \pm 0,0694**
OBSERVADOR 2				
TOTAL (n=72)	0,5101 \pm 0,0703	0,2765 \pm 0,1125	0,1976 \pm 0,1307	0,0785 \pm 0,1114
CONTROLES (n=36)	0,5196 \pm 0,0656	0,2151 \pm 0,0913	0,1174 \pm 0,1027	0,0106 \pm 0,0175
CASOS (n=36)	0,5006 \pm 0,0743	0,3380 \pm 0,0979	0,2779 \pm 0,1042	0,1464 \pm 0,1241
CONTROL A (n=12)	0,5432 \pm 0,0592	0,2263 \pm 0,1071	0,1268 \pm 0,1258	0,0136 \pm 0,0214
CASO A (n=12)	0,5103 \pm 0,0679	0,3908 \pm 0,0688**	0,3455 \pm 0,0916**	0,2898 \pm 0,1089**
CONTROL B (n=12)	0,5442 \pm 0,0528	0,2233 \pm 0,0951	0,1160 \pm 0,1146	0,0131 \pm 0,0206
CASO B (n=12)	0,5004 \pm 0,0902	0,3518 \pm 0,0693**	0,2713 \pm 0,0869**	0,0847 \pm 0,0370**
CONTROL C (n=12)	0,4714 \pm 0,0602	0,1957 \pm 0,0733	0,1096 \pm 0,0666	0,0050 \pm 0,0068
CASO C (n=12)	0,4910 \pm 0,0680	0,2714 \pm 0,1136	0,2168 \pm 0,0976**	0,0648 \pm 0,0436**

3.2.- REPRODUCTIBILIDAD.

En la figura 44 puede observarse como las áreas medias de los cinco primeros experimentos consecutivos realizados en los tres primeros fármacos estudiados variaba dentro de un rango muy estrecho.

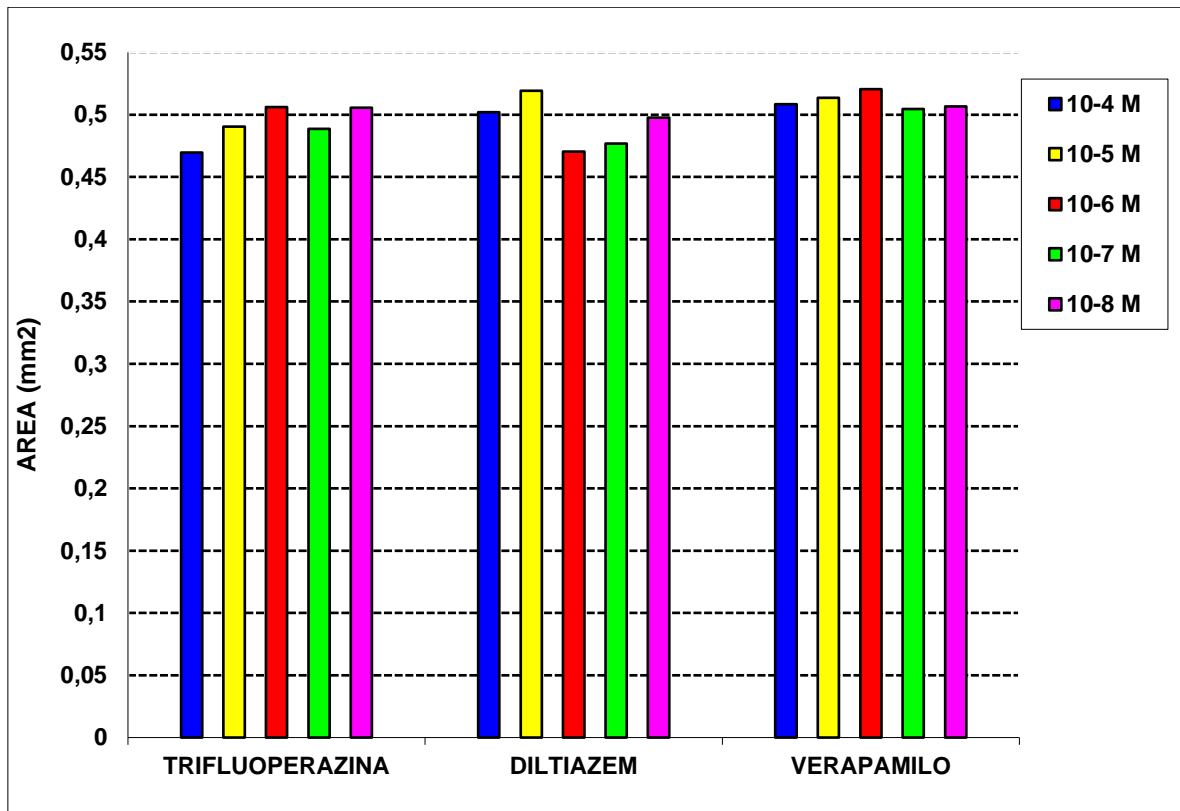


Figura 44. Reproducibilidad de las lesiones producidas *in vitro*. Los valores representan el área media en mm² obtenida en los cinco primeros experimentos consecutivos realizados en los tres primeros fármacos estudiados.

4.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA *IN VITRO*.

Para esta parte del estudio se realizaron un total de 2.736 lesiones, de las cuales 1.722 fueron incluidas en un total de 85 experimentos. El resto de las lesiones fueron excluidas del estudio por no presentar morfología redondeada o elíptica, por presentar un tamaño excesivamente grande o pequeño, o por cualquier otra circunstancia que dificultase el cálculo de su área.

El valor medio de todas las áreas válidas fue 0,5013 mm², con una desviación típica de 0,0736 mm². Un total de 1.020 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,5024 mm² y una desviación típica de 0,0738 mm²). Las 702 restantes fueron utilizadas como controles (área media 0,4996 mm² y desviación típica 0,0734 mm²). Al inicio de cada experimento se descartó la existencia de diferencias significativas entre los casos y sus controles correspondientes y entre los casos incluidos en cada fármaco.

La capacidad de reparación se cuantificó mediante fotografías seriadas a las 0, 18, 24 y 48 horas, midiendo en mm² y comparando el área libre de fibroblastos (expresada como porcentaje del área inicial libre de fibroblastos) entre las lesiones de cada grupo con sus controles sucesivamente (figuras 45-49).

Siguiendo la misma metodología, se compararon entre sí las cinéticas de reparación en controles con etanol en las concentraciones 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M y con medio de cultivo carente de etanol.

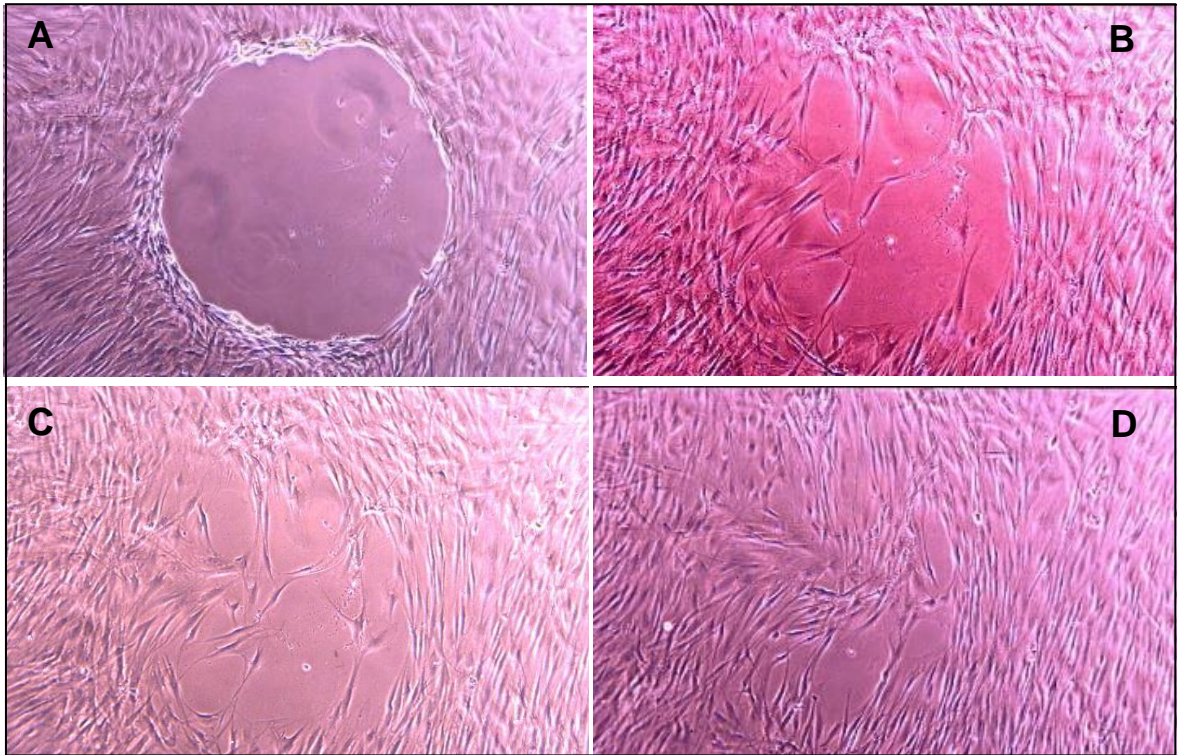


Figura 45. Cinética de reparación *in vitro* de fibroblastos de cápsula de Tenon. Superficie desnuda inicial a las 0 horas (A). A las 18 horas (B) los fibroblastos han migrado desde los márgenes. La proliferación se inicia a las 24 horas (C) y a las 48 horas (D) queda una pequeña área por cubrir. Microscopía de inversión de fases (10X).

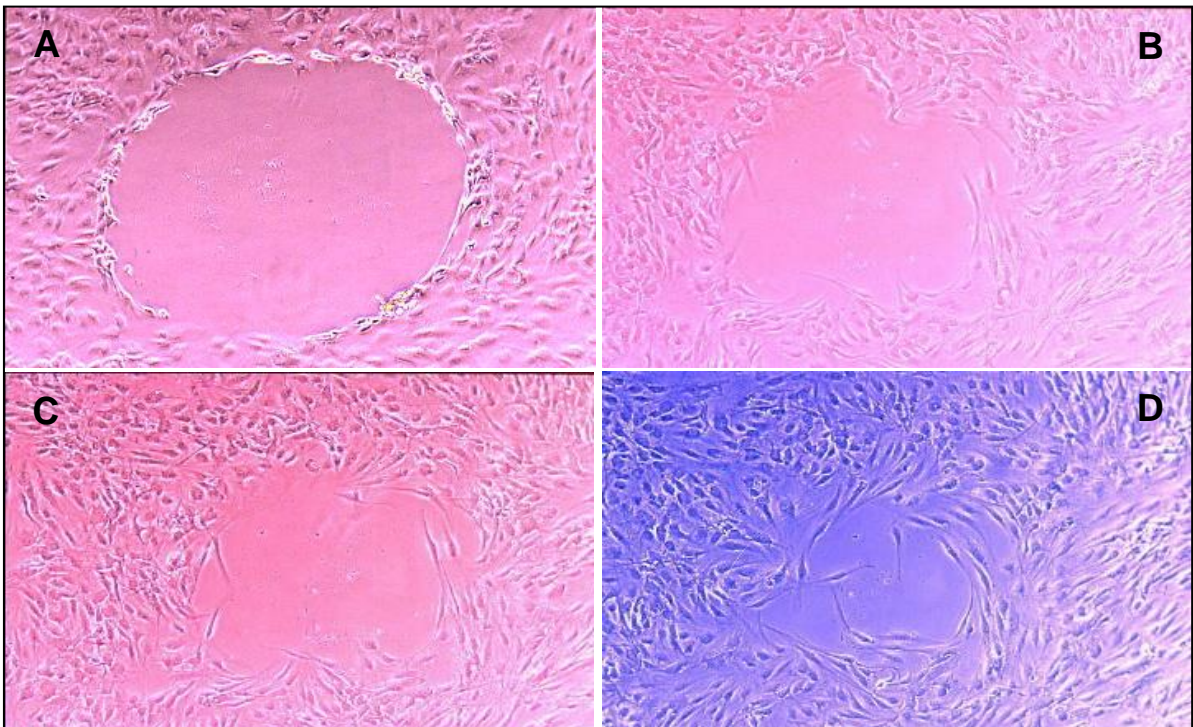


Figura 46. Cinética de reparación *in vitro* de fibroblastos de cápsula de Tenon. Superficie desnuda a las 0 horas (A), 18 horas, 24 horas (C) y 48 horas (D). Microscopía de inversión de fases (10X).

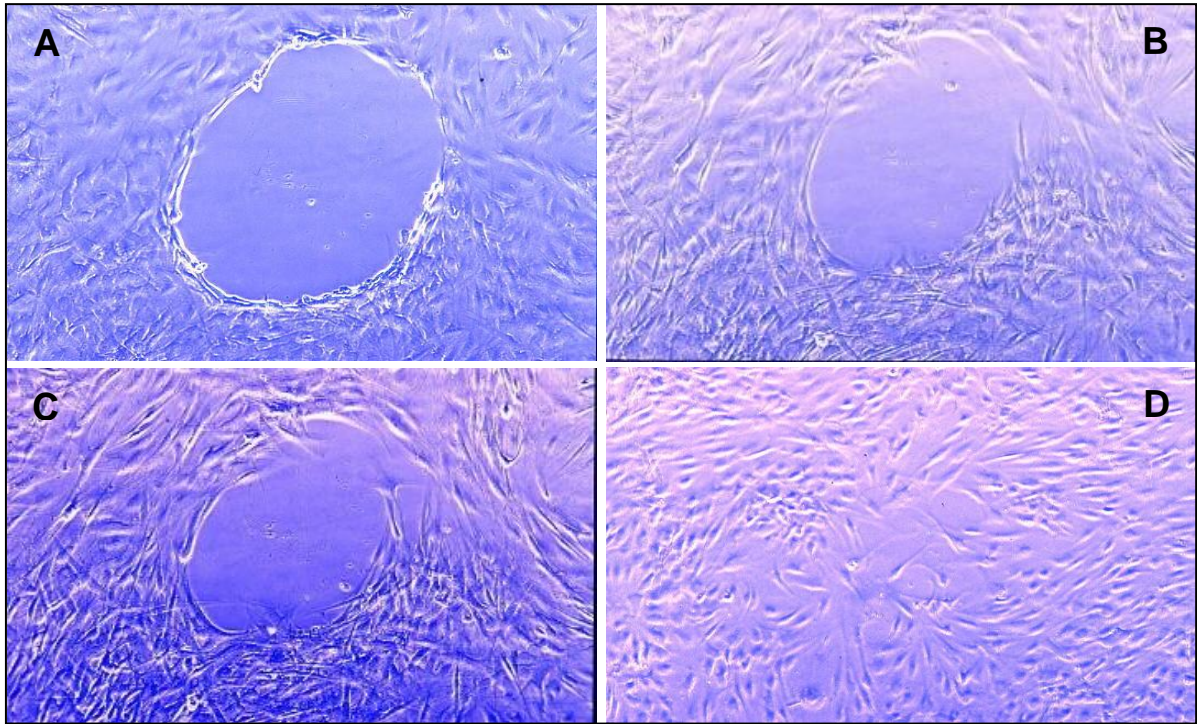


Figura 47. Cinética de reparación *in vitro* de fibroblastos de cápsula de Tenon. Úlcera de control. Superficie inicial a las 0 horas (A). A las 18 horas (B) inicio de la migración fibroblástica. La proliferación se inicia a las 24 horas (C) y a las 48 horas (D) la úlcera está cerrada. Microscopía de inversión de fases (10X).

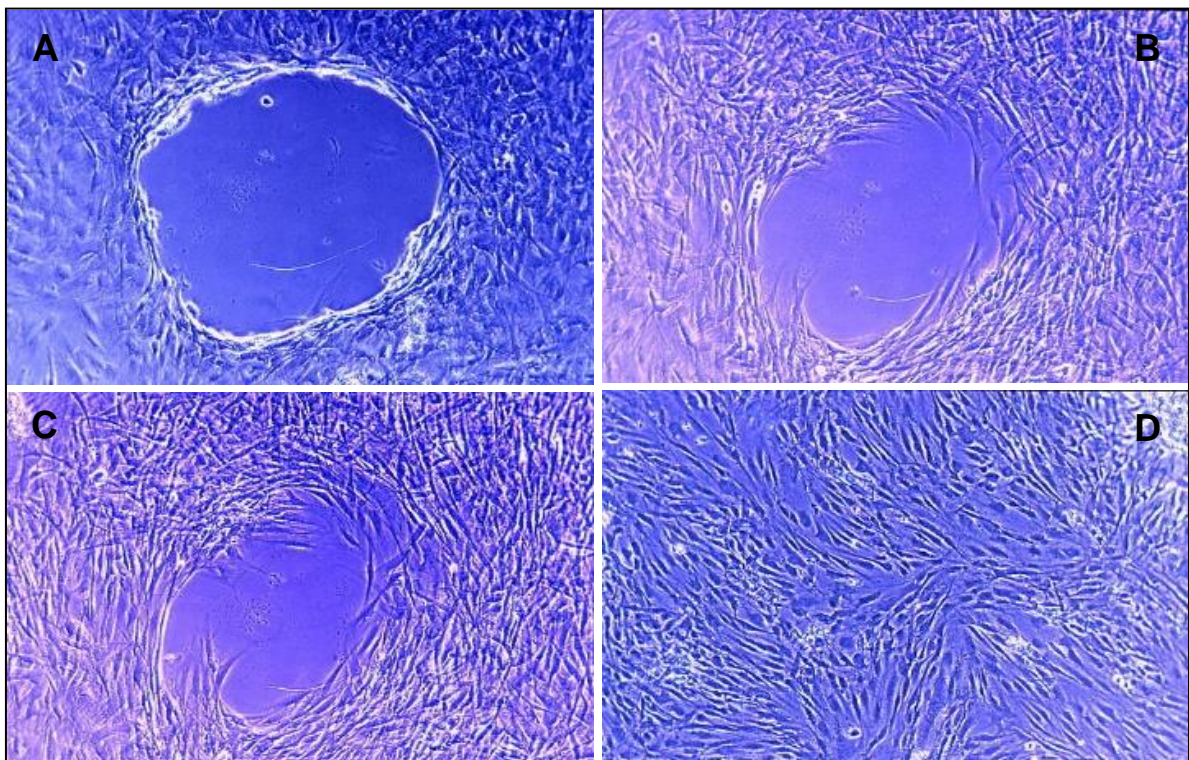


Figura 48. Cinética de reparación *in vitro* de fibroblastos de cápsula de Tenon. Úlcera de control. Superficie inicial a las 0 horas (A), a las 18 horas (B), a las 24 horas (C) y a las 48 horas (D) la úlcera está totalmente cerrada. Microscopía de inversión de fases (10X).

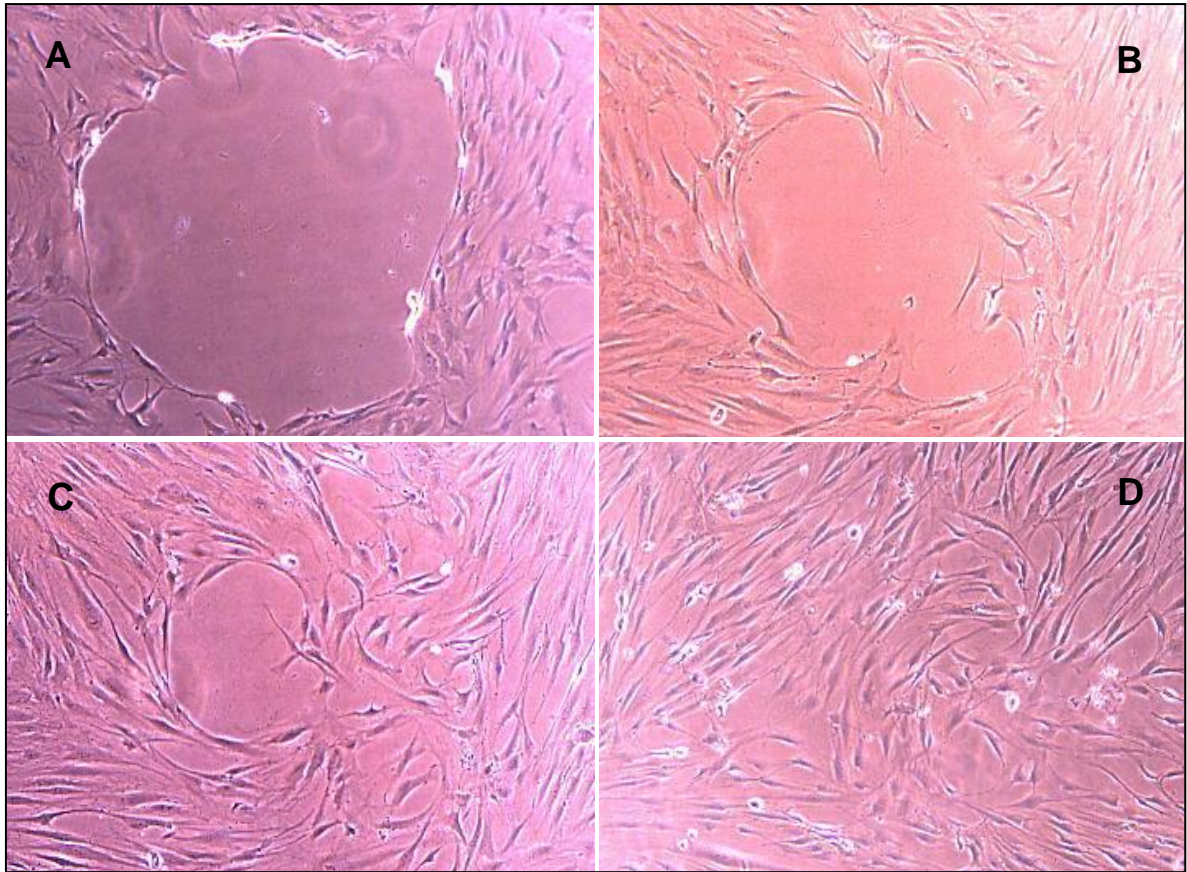


Figura 49. Cinética de reparación *in vitro* de fibroblastos de cápsula de Tenon. Úlcera de control. Superficie inicial a las 0 horas (A), a las 18 horas (B), a las 24 horas (C) y a las 48 horas (D) la úlcera está totalmente cerrada. Microscopía de inversión de fases (10X).

4.1.- EFECTO DE LA TRIFLUOPERAZINA SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Fueron realizados 11 experimentos a partir 174 úlceras con un área media de 0,5053 mm² y una desviación típica de 0,0671 mm². Un total de 132 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,5039 mm² y desviación típica de 0,0680 mm²). Las 42 restantes fueron utilizadas como controles (área media 0,5099 mm², con una desviación típica de 0,0647 mm²).

Las concentraciones de TFP utilizadas fueron 10⁻⁴, 7,5·10⁻⁵, 5·10⁻⁵, 2,5·10⁻⁵, 10⁻⁵, 7,5·10⁻⁶, 5·10⁻⁶, 2,5·10⁻⁶, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

Las concentraciones de TFP $\geq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M produjeron una alteración de la úlcera y de la monocapa de fibroblastos a las 18 horas que impidió su posterior estudio. Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en el grupo con TFP 2,5·10⁻⁵ M a las 18 horas, en los grupos con TFP $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 24 horas y en los grupos con TFP $\geq 2,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 48 horas. Concentraciones de TFP $\leq 10^{-6}$ M no presentaron en ningún momento diferencias respecto a sus controles (tablas 16 y 17).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de TFP experimentadas los resultados fueron los siguientes (figura 50):

TFP 5·10⁻⁵ M presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a todas las concentraciones estudiadas en todos los tiempos, excepto con TFP 2,5·10⁻⁵ M a las 18 horas.

TFP 2,5·10⁻⁵ M presentó en todos los tiempos diferencias estadísticamente significativas respecto a todas las concentraciones inferiores, excepto con TFP 10⁻⁵ M a las 24 y 48 horas.

TFP 10⁻⁵ M no presentó diferencias significativas respecto a concentraciones inferiores, excepto con TFP $\leq 2,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 48 horas.

Las concentraciones de TFP $\leq 2,5 \cdot 10^{-6}$ M no presentaron diferencias entre sí en ningún momento del estudio.

Tabla 16. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con trifluoperazina. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm² (media ± desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* p< 0,05. **p< 0,01.

TRIFLUOPERAZINA ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL-10⁻⁴ M	0,4696 ± 0,0587	0,1862 ± 0,0701	0,1090 ± 0,0663	0,0045 ± 0,0058
10⁻⁴ M	0,5035 ± 0,0889	-	-	-
CONTROL-7,5·10⁻⁵ M	0,5215 ± 0,0597	0,2260 ± 0,0724	0,1153 ± 0,0746	0,0047 ± 0,0072
7,5·10⁻⁵ M	0,5281 ± 0,0650	-	-	-
CONTROL-5·10⁻⁵ M	0,5421 ± 0,0603	0,2222 ± 0,1085	0,1264 ± 0,1256	0,0129 ± 0,0198
5 · 10⁻⁵ M	0,5105 ± 0,0679	0,3969 ± 0,0673**	0,3389 ± 0,1004**	0,2903 ± 0,1126**
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	0,5410 ± 0,0581	0,2189 ± 0,0969	0,1150 ± 0,1151	0,0125 ± 0,0200
2,5 · 10⁻⁵ M	0,4989 ± 0,0901	0,3498 ± 0,0724**	0,2710 ± 0,0889**	0,0833 ± 0,0372**
CONTROL-10⁻⁵ M	0,4696 ± 0,0587	0,1862 ± 0,0701	0,1090 ± 0,0663	0,0045 ± 0,0058
10⁻⁵ M	0,4903 ± 0,0680	0,2694 ± 0,1139	0,2165 ± 0,0976**	0,0973 ± 0,0694**
CONTROL-7,5·10⁻⁶ M	0,5483 ± 0,0620	0,2455 ± 0,1162	0,1119 ± 0,0936	0,0028 ± 0,0054
7,5 · 10⁻⁶ M	0,5094 ± 0,0540	0,2230 ± 0,0961	0,1678 ± 0,0552	0,0216 ± 0,0229**
CONTROL-5·10⁻⁶ M	0,5312 ± 0,0619	0,2422 ± 0,1023	0,1301 ± 0,0889	0,0025 ± 0,0049
5 · 10⁻⁶ M	0,5033 ± 0,0600	0,2812 ± 0,0649	0,1476 ± 0,0776	0,0414 ± 0,0498*
CONTROL-2,5·10⁻⁶ M	0,5215 ± 0,0597	0,2260 ± 0,0724	0,1153 ± 0,0746	0,0047 ± 0,0072
2,5 · 10⁻⁶ M	0,4983 ± 0,0784	0,2670 ± 0,0579	0,1474 ± 0,0977	0,0162 ± 0,0181
CONTROL-10⁻⁶ M	0,4696 ± 0,0487	0,1978 ± 0,0837	0,1052 ± 0,0677	0,0105 ± 0,0195
10⁻⁶ M	0,5061 ± 0,0619	0,2532 ± 0,0868	0,1609 ± 0,0841	0,0220 ± 0,0339
CONTROL-10⁻⁷ M	0,4828 ± 0,0604	0,2346 ± 0,0476	0,1391 ± 0,0700	0,0112 ± 0,0193
10⁻⁷ M	0,4886 ± 0,0605	0,2793 ± 0,1146	0,1355 ± 0,0885	0,0137 ± 0,0112
CONTROL-10⁻⁸ M	0,4903 ± 0,0566	0,2044 ± 0,0862	0,1181 ± 0,0792	0,0102 ± 0,0192
10⁻⁸ M	0,5055 ± 0,0650	0,2281 ± 0,0992	0,1407 ± 0,0723	0,0150 ± 0,0224

Tabla 17. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con trifluoperazina. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

TRIFLUOPERAZINA ÚLCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL-10 ⁻⁴ M	39,825 \pm 15,458	23,468 \pm 14,661	1,010 \pm 1,386
10 ⁻⁴ M	-	-	-
CONTROL-7,5·10 ⁻⁵ M	43,209 \pm 16,190	22,856 \pm 16,049	0,860 \pm 1,222
7,5·10 ⁻⁵ M	-	-	-
CONTROL-5·10 ⁻⁵ M	42,265 \pm 22,065	24,414 \pm 23,886	2,417 \pm 3,637
5 · 10 ⁻⁵ M	78,132 \pm 11,228**	66,500 \pm 17,878**	57,126 \pm 20,698**
CONTROL-2,5·10 ⁻⁵ M	41,224 \pm 18,534	21,892 \pm 21,449	2,380 \pm 3,712
2,5 · 10 ⁻⁵ M	69,930 \pm 5,305**	53,478 \pm 12,140**	17,126 \pm 7,378**
CONTROL-10 ⁻⁵ M	39,825 \pm 15,458	23,468 \pm 14,661	1,010 \pm 1,386
10 ⁻⁵ M	51,319 \pm 22,806	41,576 \pm 20,221*	19,020 \pm 14,809**
CONTROL-7,5·10 ⁻⁶ M	41,988 \pm 18,281	19,077 \pm 15,329	0,506 \pm 0,988
7,5 · 10 ⁻⁶ M	44,190 \pm 20,740	32,788 \pm 10,020*	4,168 \pm 4,571**
CONTROL-5·10 ⁻⁶ M	46,190 \pm 18,775	25,033 \pm 16,340	0,522 \pm 1,040
5 · 10 ⁻⁶ M	56,290 \pm 13,726	29,443 \pm 15,620	8,095 \pm 9,568*
CONTROL-2,5·10 ⁻⁶ M	43,209 \pm 16,190	22,856 \pm 16,049	0,860 \pm 1,222
2,5 · 10 ⁻⁶ M	53,420 \pm 7,853	29,026 \pm 17,823	3,257 \pm 3,702
CONTROL-10 ⁻⁶ M	41,974 \pm 17,131	22,295 \pm 13,522	2,101 \pm 3,611
10 ⁻⁶ M	49,969 \pm 19,524	31,590 \pm 16,826	4,183 \pm 6,165
CONTROL-10 ⁻⁷ M	48,938 \pm 9,914	28,974 \pm 14,427	2,224 \pm 3,564
10 ⁻⁷ M	56,675 \pm 20,073	27,753 \pm 16,480	3,016 \pm 2,278
CONTROL-10 ⁻⁸ M	41,489 \pm 17,403	23,752 \pm 15,744	1,989 \pm 3,517
10 ⁻⁸ M	45,324 \pm 19,848	27,910 \pm 14,184	3,136 \pm 4,924

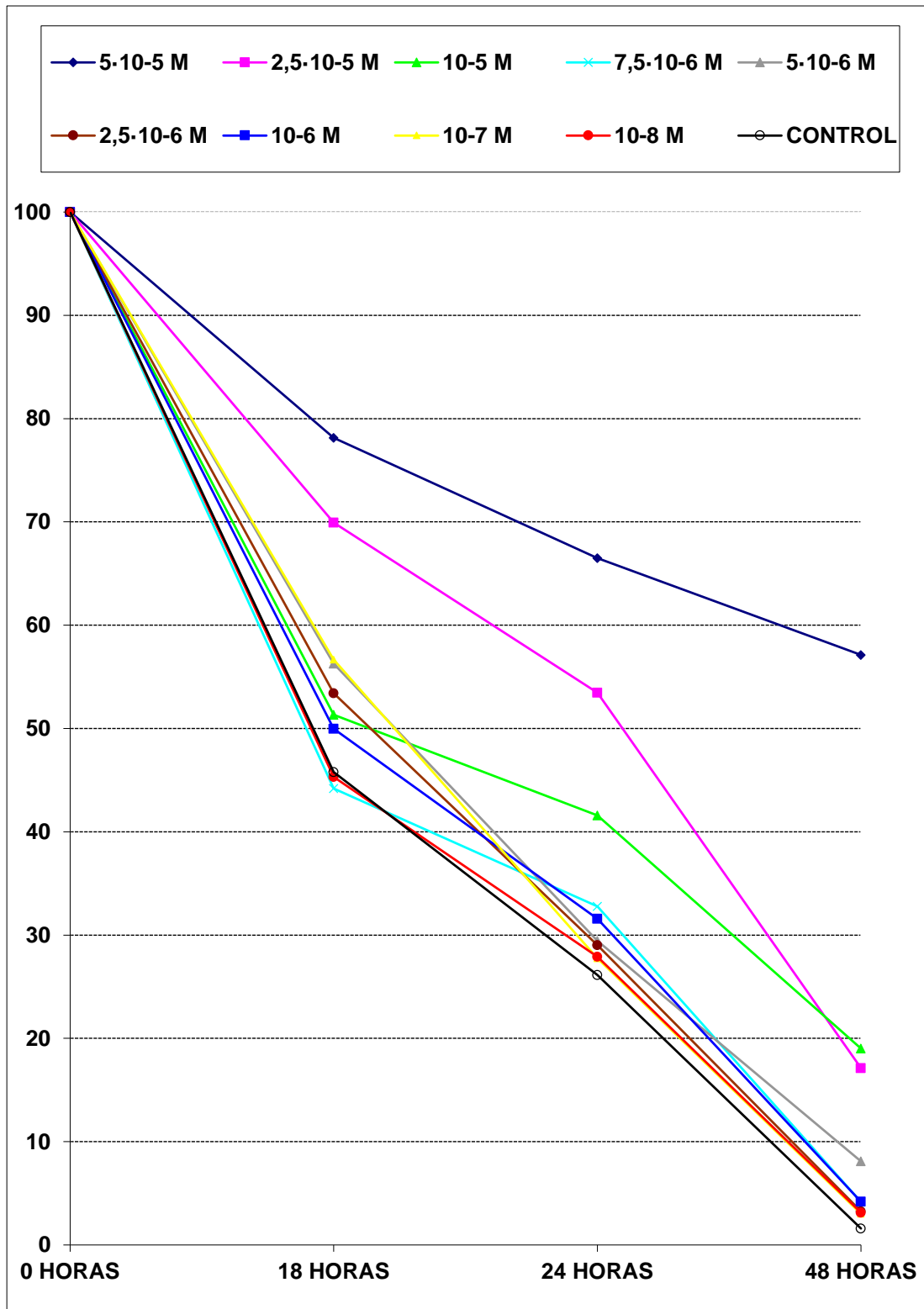


Figura 50. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con trifluoperazina. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

4.2.- EFECTO DEL DILTIAZEM SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Fueron realizados 8 experimentos a partir 126 úlceras con un área media de 0,4955 mm² y una desviación típica de 0,0813 mm². Un total de 96 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,4960 mm², con una desviación típica de 0,0831 mm²). Las 30 restantes fueron utilizadas como controles (área media 0,4935 mm², con una desviación típica de 0,0763 mm²).

En los experimentos fueron utilizadas las siguientes concentraciones de DTZ: 10⁻⁴, 7,5·10⁻⁵, 5·10⁻⁵, 2,5·10⁻⁵, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

Los grupos con concentraciones de DTZ 10⁻⁴ M y 7,5·10⁻⁵ M produjeron una alteración de la úlcera y la monocapa de fibroblastos a las 18 y 48 horas respectivamente. Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en los grupos con concentraciones de DTZ $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18, 24 y 48 horas. Los grupos con concentraciones de DTZ $\leq 10^{-5}$ M no presentaron en ningún momento diferencias respecto a sus controles (tablas 18 y 19).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de DTZ experimentadas los resultados fueron los siguientes (figura 51):

DTZ 7,5·10⁻⁵ M presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a concentraciones de DTZ $\leq 10^{-5}$ M a las 18 y 24 horas. Su posterior valoración no fue posible.

DTZ 5·10⁻⁵ M no presentó diferencias significativas respecto a DTZ 2,5·10⁻⁵ M en ningún momento del experimento, pero sí presentó áreas significativamente superiores respecto a concentraciones de DTZ 10⁻⁵ y 10⁻⁶ M a las 18 horas y a concentraciones de DTZ $\leq 10^{-7}$ M a las 18, 24 y 48 horas.

DTZ 2,5·10⁻⁵ M presentó áreas significativamente superiores respecto a concentraciones de DTZ $\leq 10^{-5}$ M a las 18 horas y a DTZ $\leq 10^{-7}$ M a las 24 y 48 horas.

DTZ 10⁻⁵ M presentó áreas significativamente superiores respecto a concentraciones de DTZ $\leq 10^{-7}$ M a las 48 horas.

DTZ 10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a concentraciones de DTZ $\leq 10^{-7}$ M a las 48 horas.

Las concentraciones de DTZ 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M no presentaron diferencias entre sí en ningún momento del experimento.

Tabla 18. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con diltiazem. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm² (media ± desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* p< 0,05. **p< 0,01.

DILTIAZEM ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL-10 ⁻⁴ M	0,4672 ± 0,0721	0,0994 ± 0,0331	0,0275 ± 0,0068	0,0011 ± 0,0040
10 ⁻⁴ M	0,5019 ± 0,1011	-	-	-
CONTROL-7,5·10 ⁻⁵ M	0,5162 ± 0,0774	0,1603 ± 0,0671	0,0505 ± 0,0368	0,0022 ± 0,0040
7,5 · 10 ⁻⁵ M	0,4993 ± 0,0779	0,2450 ± 0,0697*	0,1116 ± 0,0485**	-
CONTROL-5·10 ⁻⁵ M	0,4993 ± 0,0702	0,1489 ± 0,0690	0,0441 ± 0,0417	0,0032 ± 0,0049
5 · 10 ⁻⁵ M	0,5050 ± 0,0664	0,2065 ± 0,0651	0,0994 ± 0,0556**	0,0162 ± 0,0185*
CONTROL-2,5·10 ⁻⁵ M	0,5201 ± 0,0709	0,1526 ± 0,0712	0,0462 ± 0,0406	0,0032 ± 0,0049
2,5 · 10 ⁻⁵ M	0,4981 ± 0,0893	0,2217 ± 0,0677*	0,0838 ± 0,0525*	0,0246 ± 0,0232**
CONTROL-10 ⁻⁵ M	0,4686 ± 0,0702	0,1099 ± 0,0309	0,0316 ± 0,0172	0,0019 ± 0,0046
10 ⁻⁵ M	0,5192 ± 0,0803	0,1472 ± 0,0403*	0,0588 ± 0,0399	0,0154 ± 0,0138
CONTROL-10 ⁻⁶ M	0,4686 ± 0,0702	0,1099 ± 0,0309	0,0316 ± 0,0172	0,0019 ± 0,0046
10 ⁻⁶ M	0,4704 ± 0,0866	0,1342 ± 0,0442	0,0679 ± 0,0501	0,0106 ± 0,0080
CONTROL-10 ⁻⁷ M	0,4796 ± 0,0839	0,1003 ± 0,0348	0,0296 ± 0,0180	0,0007 ± 0,0027
10 ⁻⁷ M	0,4768 ± 0,0802	0,1129 ± 0,0205	0,0430 ± 0,0290	0,0035 ± 0,0059
CONTROL-10 ⁻⁸ M	0,4748 ± 0,0842	0,1107 ± 0,0356	0,0288 ± 0,0181	0,0019 ± 0,0046
10 ⁻⁸ M	0,4975 ± 0,0939	0,1430 ± 0,0599	0,0303 ± 0,0256	0,0009 ± 0,0032

Tabla 19. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con diltiazem. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

DILTIAZEM ÚLCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL-10⁻⁴ M	21,171 \pm 6,407	5,923 \pm 1,381	0,252 \pm 0,874
10⁻⁴ M	-	-	-
CONTROL-7,5·10⁻⁵ M	31,352 \pm 13,573	10,052 \pm 7,722	0,400 \pm 0,727
7,5 · 10⁻⁵ M	49,074 \pm 10,411**	21,960 \pm 7,614**	-
CONTROL-5·10⁻⁵ M	29,457 \pm 12,867	8,893 \pm 8,615	0,590 \pm 0,890
5 · 10⁻⁵ M	41,215 \pm 13,654*	20,287 \pm 12,869*	2,991 \pm 3,253*
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	29,460 \pm 14,520	8,939 \pm 8,429	0,590 \pm 0,890
2,5 · 10⁻⁵ M	44,544 \pm 12,559*	16,626 \pm 9,095*	4,818 \pm 4,083**
CONTROL-10⁻⁵ M	23,545 \pm 6,227	7,005 \pm 4,251	0,380 \pm 0,943
10⁻⁵ M	28,276 \pm 6,061	10,815 \pm 6,483	2,807 \pm 2,190
CONTROL-10⁻⁶ M	23,545 \pm 6,227	7,005 \pm 4,251	0,380 \pm 0,943
10⁻⁶ M	28,376 \pm 6,2796	14,285 \pm 9,432	2,386 \pm 1,861
CONTROL-10⁻⁷ M	20,860 \pm 6,827	6,425 \pm 4,437	0,127 \pm 0,441
10⁻⁷ M	24,036 \pm 4,747	9,386 \pm 6,279	0,724 \pm 1,204
CONTROL-10⁻⁸ M	23,300 \pm 6,995	6,335 \pm 4,478	0,380 \pm 0,943
10⁻⁸ M	28,823 \pm 12,058	5,924 \pm 4,240	0,142 \pm 0,493

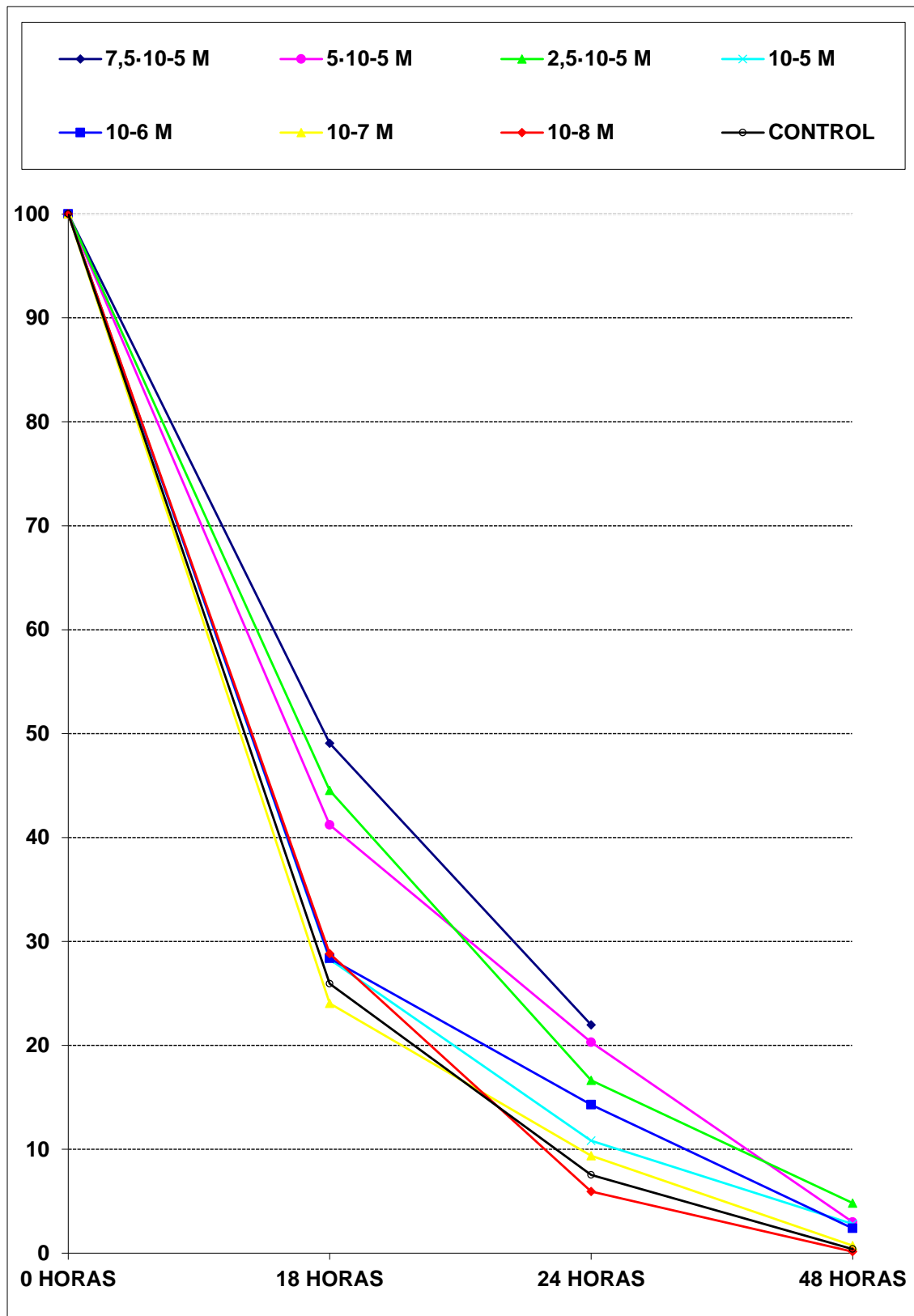


Figura 51. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con diltiazem. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

4.3.- EFECTO DEL VERAPAMILO SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Fueron realizados 11 experimentos con 174 úlceras con un área media a las 0 horas de 0,5044 mm² y una desviación típica de 0,0583 mm². Un total de 132 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,5065 mm², con una desviación típica de 0,0581 mm²). Las 42 restantes fueron utilizadas como controles (área media 0,4979 mm², con una desviación típica de 0,0592 mm²).

Las concentraciones de VPM utilizadas fueron 10⁻⁴, 7,5·10⁻⁵, 5·10⁻⁵, 2,5·10⁻⁵, 10⁻⁵, 7,5·10⁻⁶, 5·10⁻⁶, 2,5·10⁻⁶, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

El grupo con VPM 10⁻⁴ M produjo un despegamiento de la monocapa de fibroblastos a las 18 horas. Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en los grupos con concentraciones de VPM ≥5·10⁻⁵ M a las 18 horas, en los grupos con concentraciones de VPM ≥2,5·10⁻⁵ M a las 24 horas y en los grupos con concentraciones de VPM ≥7,5·10⁻⁶ M a las 48 horas. Los grupos con concentraciones de VPM ≤5·10⁻⁶ M no presentaron en ningún momento diferencias respecto a sus controles (tablas 20 y 21).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de VPM experimentadas los resultados fueron los siguientes (figura 52):

VPM 7,5·10⁻⁵ M presentó áreas significativamente superiores respecto a concentraciones de VPM ≤10⁻⁵ M a las 18 y 24 horas, y frente a concentraciones de VPM ≤ 7,5·10⁻⁶ M a las 48 horas.

VPM 5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a VPM ≤2,5·10⁻⁵ M a las 18 horas y frente a VPM ≤10⁻⁵ M a las 24 y 48 horas.

VPM 2,5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a VPM ≤2,5·10⁻⁶ M a las 18 horas, VPM ≤10⁻⁵ M a las 24 horas y VPM ≤7,5·10⁻⁶ M a las 48 horas.

VPM 10⁻⁵ M presentó diferencias significativas frente a VPM ≤ 2,5·10⁻⁶ M a las 48 horas.

VPM 7,5·10⁻⁶ M presentó áreas significativamente superiores respecto a concentraciones de VPM ≤10⁻⁶ M a las 48 horas.

Los grupos con concentraciones de VPM ≤5·10⁻⁶ M no presentaron diferencias entre sí en ningún momento del experimento.

Tabla 20. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con verapamilo. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm² (media ± desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* p< 0,05. **p< 0,01.

VERAPAMILO ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL-10⁻⁴	0,4935 ± 0,0598	0,3151 ± 0,0884	0,2177 ± 0,1043	0,0488 ± 0,0582
10⁻⁴	0,5083 ± 0,0645	-	-	-
CONTROL-7,5·10⁻⁵ M	0,4975 ± 0,0754	0,3374 ± 0,0968	0,2195 ± 0,1114	0,0186 ± 0,0304
7,5 · 10⁻⁵ M	0,4885 ± 0,0646	0,4064 ± 0,0732	0,3107 ± 0,0677*	0,1748 ± 0,0728**
CONTROL-5·10⁻⁵ M	0,4975 ± 0,0754	0,3374 ± 0,0968	0,2195 ± 0,1114	0,0186 ± 0,0304
5 · 10⁻⁵ M	0,5083 ± 0,0678	0,4278 ± 0,0746*	0,3393 ± 0,1100*	0,2009 ± 0,0844**
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	0,4846 ± 0,0727	0,2948 ± 0,1070	0,1592 ± 0,0699	0,0394 ± 0,0592
2,5 · 10⁻⁵ M	0,5027 ± 0,0459	0,3711 ± 0,0777*	0,2980 ± 0,0964**	0,1958 ± 0,1338**
CONTROL-10⁻⁵ M	0,4788 ± 0,0523	0,3402 ± 0,0713	0,2502 ± 0,0786	0,0554 ± 0,0544
10⁻⁵ M	0,5136 ± 0,0511	0,3474 ± 0,0944	0,2108 ± 0,0838	0,1243 ± 0,0841*
CONTROL-7,5·10⁻⁶ M	0,5016 ± 0,0380	0,2986 ± 0,0969	0,1945 ± 0,0990	0,0268 ± 0,0326
7,5 · 10⁻⁶ M	0,5078 ± 0,0668	0,3329 ± 0,0784	0,2193 ± 0,0868	0,0850 ± 0,0573*
CONTROL-5·10⁻⁶ M	0,5180 ± 0,0687	0,3585 ± 0,1037	0,2019 ± 0,1144	0,0160 ± 0,0312
5 · 10⁻⁶ M	0,5078 ± 0,0568	0,3329 ± 0,1004	0,2118 ± 0,1009	0,0514 ± 0,0700
CONTROL-2,5·10⁻⁶ M	0,4835 ± 0,0563	0,2363 ± 0,0603	0,1439 ± 0,0545	0,0311 ± 0,0586
2,5 · 10⁻⁶ M	0,5029 ± 0,0613	0,2935 ± 0,0443	0,1879 ± 0,0607	0,0574 ± 0,0675
CONTROL-10⁻⁶ M	0,4835 ± 0,0563	0,2363 ± 0,0603	0,1439 ± 0,0545	0,0311 ± 0,0586
10⁻⁶ M	0,5205 ± 0,0590	0,3039 ± 0,0840	0,2051 ± 0,0993	0,0207 ± 0,0315
CONTROL-10⁻⁷ M	0,5092 ± 0,0481	0,2893 ± 0,0814	0,1812 ± 0,1060	0,0281 ± 0,0370
10⁻⁷ M	0,5045 ± 0,0535	0,2835 ± 0,0904	0,1759 ± 0,1000	0,0271 ± 0,0354
CONTROL-10⁻⁸ M	0,5092 ± 0,0481	0,2893 ± 0,0814	0,1812 ± 0,1060	0,0281 ± 0,0370
10⁻⁸ M	0,5067 ± 0,0643	0,2824 ± 0,1073	0,1813 ± 0,1112	0,0290 ± 0,0372

Tabla 21. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con verapamilo. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

VERAPAMILO ÚLCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL-10 ⁻⁴	64,058 \pm 16,591	45,184 \pm 22,201	11,094 \pm 14,555
10 ⁻⁴	-	-	-
CONTROL-7,5·10 ⁻⁵ M	65,380 \pm 17,683	42,105 \pm 19,253	3,615 \pm 6,094
7,5 · 10 ⁻⁵ M	82,995 \pm 9,584**	63,458 \pm 10,640**	35,515 \pm 14,023**
CONTROL-5·10 ⁻⁵ M	65,380 \pm 17,683	42,105 \pm 19,253	3,615 \pm 6,094
5 · 10 ⁻⁵ M	84,003 \pm 7,001**	65,680 \pm 13,816**	38,795 \pm 13,982**
CONTROL-2,5·10 ⁻⁵ M	61,184 \pm 20,101	34,401 \pm 18,095	9,395 \pm 14,890
2,5 · 10 ⁻⁵ M	73,618 \pm 13,288	58,658 \pm 17,077**	38,400 \pm 26,066**
CONTROL-10 ⁻⁵ M	70,753 \pm 10,877	52,437 \pm 15,575	12,389 \pm 13,819
10 ⁻⁵ M	67,360 \pm 15,586	40,991 \pm 16,337	24,444 \pm 16,590**
CONTROL-7,5·10 ⁻⁶ M	59,579 \pm 19,281	39,005 \pm 19,341	5,296 \pm 6,382
7,5 · 10 ⁻⁶ M	63,595 \pm 11,235	42,997 \pm 15,929	16,981 \pm 12,236**
CONTROL-5·10 ⁻⁶ M	67,499 \pm 18,794	37,567 \pm 19,746	3,114 \pm 6,259
5 · 10 ⁻⁶ M	65,325 \pm 16,473	41,680 \pm 18,770	13,645 \pm 17,256
CONTROL-2,5·10 ⁻⁶ M	49,567 \pm 14,756	31,253 \pm 16,267	7,662 \pm 14,974
2,5 · 10 ⁻⁶ M	58,508 \pm 7,078	37,893 \pm 13,361	12,485 \pm 15,165
CONTROL-10 ⁻⁶ M	49,567 \pm 14,756	31,253 \pm 16,267	7,662 \pm 14,974
10 ⁻⁶ M	57,756 \pm 18,221	38,915 \pm 21,348	4,218 \pm 6,551
CONTROL-10 ⁻⁷ M	57,585 \pm 17,835	35,928 \pm 20,892	5,625 \pm 7,324
10 ⁻⁷ M	56,632 \pm 18,777	35,041 \pm 19,811	5,218 \pm 6,821
CONTROL-10 ⁻⁸ M	57,585 \pm 17,835	35,928 \pm 20,892	5,625 \pm 7,324
10 ⁻⁸ M	55,401 \pm 18,309	35,644 \pm 20,218	5,588 \pm 7,226

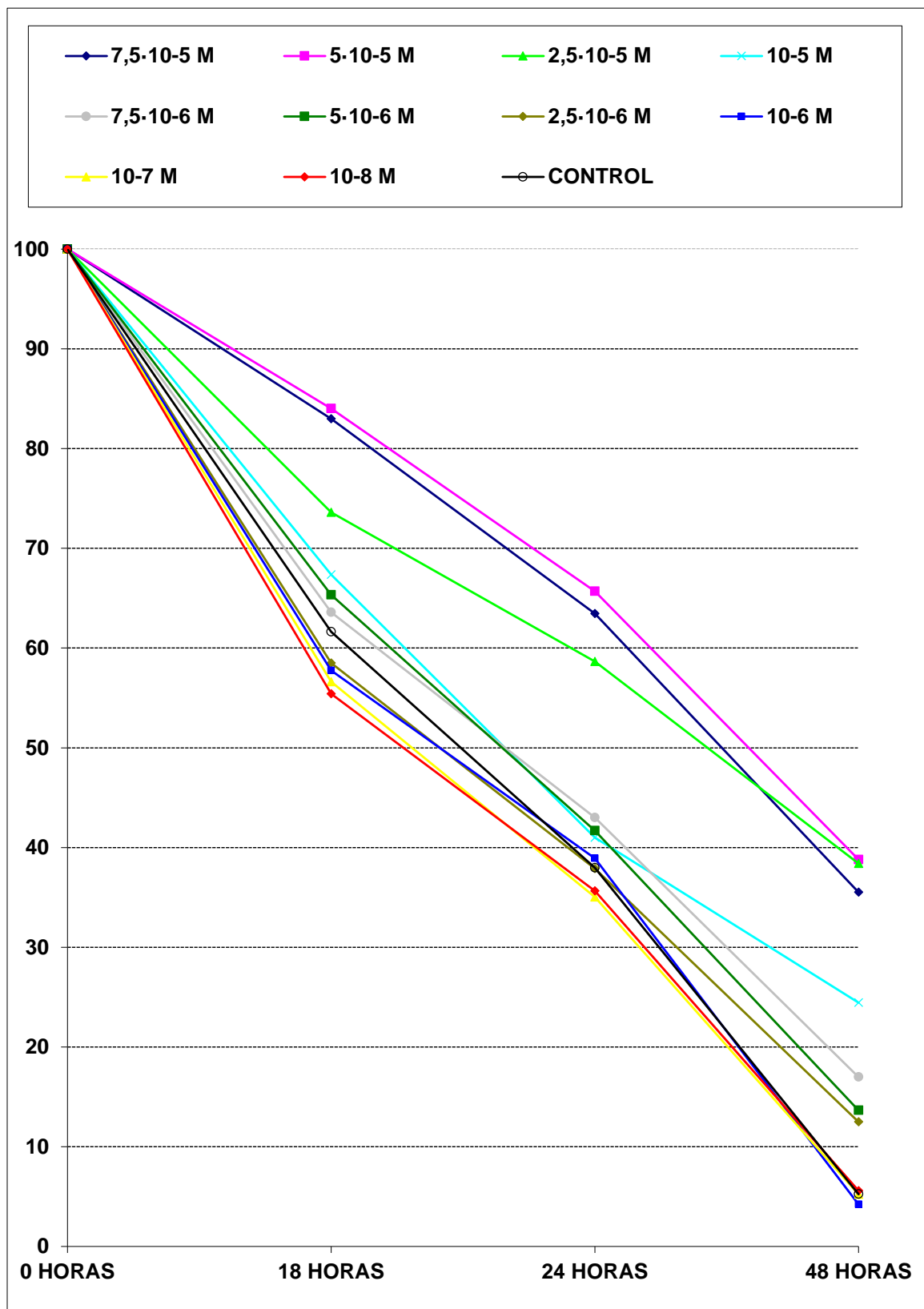


Figura 52. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con verapamilo. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

4.4.- EFECTO DEL MIBEFRADIL SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Se realizaron 10 experimentos con 168 úlceras que presentaron un área media a las 0 horas de 0,4975 mm² y una desviación típica de 0,0793 mm². Un total de 120 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,5017 mm², con una desviación típica de 0,0770 mm²). Las restantes 48 fueron utilizadas como controles (área media 0,4873 mm², con una desviación típica de 0,0849 mm²).

Las concentraciones de MBF utilizadas en el estudio fueron 10⁻⁴, 10⁻⁵, 7,5·10⁻⁶, 5·10⁻⁶, 2,5·10⁻⁶, 10⁻⁶, 7,5·10⁻⁷, 5·10⁻⁷, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

El grupo con MBF 10⁻⁴ M produjo un despegamiento de la monocapa de fibroblastos a las 18 horas. Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en los grupos con concentraciones de MBF ≥7,5·10⁻⁶ M a las 18 horas, en los grupos con concentraciones de MBF ≥5·10⁻⁶ M a las 24 horas y en los grupos con concentraciones de MBF ≥10⁻⁶ M a las 48 horas. Los grupos con concentraciones de MBF ≤7,5·10⁻⁷ M no presentaron en ningún momento diferencias respecto a sus controles (tablas 22 y 23).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de MBF experimentadas, los resultados fueron los siguientes (figura 53):

MBF 10⁻⁵ M presentó áreas significativamente superiores respecto a concentraciones de MBF ≤7,5·10⁻⁶ M a las 18, 24 y 48 horas.

MBF 7,5·10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a MBF ≤7,5·10⁻⁷ M a las 18 y 24 horas y MBF ≤10⁻⁶ M a las 48 horas.

MBF 5·10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a MBF ≤5·10⁻⁷ M a las 24 horas y MBF ≤7,5·10⁻⁷ M a las 48 horas.

MBF 2,5·10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a MBF ≤10⁻⁶ M a las 48 horas.

MBF 10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a concentraciones de MBF ≤5·10⁻⁷ M a las 18 y 24 horas y MBF 10⁻⁸ M a las 48 horas.

MBF 10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a concentraciones de MBF ≤5·10⁻⁷ M a las 18 y 24 horas y MBF 10⁻⁸ M a las 48 horas.

Los grupos con concentraciones de MBF $\leq 7,5 \cdot 10^{-7}$ M no presentaron diferencias entre sí en ningún momento del experimento.

Tabla 22. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con mibefradil. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm² (media \pm desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* p < 0,05. ** p < 0,01.

MIBEFRADIL ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL-10 ⁻⁴ M	0,4919 \pm 0,0757	0,2285 \pm 0,1245	0,1313 \pm 0,0988	0,0178 \pm 0,0306
10 ⁻⁴ M	0,5200 \pm 0,0549	-	-	-
CONTROL-10 ⁻⁵ M	0,4919 \pm 0,0757	0,2285 \pm 0,1245	0,1313 \pm 0,0988	0,0178 \pm 0,0306
10 ⁻⁵ M	0,4944 \pm 0,0765	0,3756 \pm 0,0394**	0,2820 \pm 0,0595**	0,1057 \pm 0,0263**
CONTROL-7,5·10 ⁻⁶ M	0,5173 \pm 0,1013	0,1826 \pm 0,0852	0,0829 \pm 0,0510	0,0044 \pm 0,0105
7,5 · 10 ⁻⁶ M	0,4930 \pm 0,0701	0,2798 \pm 0,0912*	0,1619 \pm 0,0872*	0,0630 \pm 0,0296**
CONTROL-5·10 ⁻⁶ M	0,4922 \pm 0,1098	0,2143 \pm 0,1451	0,0715 \pm 0,0756	0,0201 \pm 0,0377
5 · 10 ⁻⁶ M	0,5076 \pm 0,0770	0,2316 \pm 0,0882	0,1403 \pm 0,0737	0,0431 \pm 0,0225**
CONTROL-2,5·10 ⁻⁶ M	0,4922 \pm 0,1098	0,2143 \pm 0,1451	0,0715 \pm 0,0756	0,0201 \pm 0,0377
2,5 · 10 ⁻⁶ M	0,4935 \pm 0,0704	0,2287 \pm 0,0819	0,0982 \pm 0,0701	0,0411 \pm 0,0299*
CONTROL-10 ⁻⁶ M	0,4807 \pm 0,0786	0,1965 \pm 0,0958	0,1079 \pm 0,0871	0,0017 \pm 0,0041
10 ⁻⁶ M	0,5187 \pm 0,0920	0,2973 \pm 0,1478	0,1732 \pm 0,1057	0,0312 \pm 0,0396*
CONTROL-7,5·10 ⁻⁷ M	0,5209 \pm 0,0925	0,2407 \pm 0,0834	0,0865 \pm 0,0892	0,0073 \pm 0,0137
7,5 · 10 ⁻⁷ M	0,4906 \pm 0,0703	0,1758 \pm 0,0820	0,0777 \pm 0,0830	0,0122 \pm 0,0211
CONTROL-5·10 ⁻⁷ M	0,4768 \pm 0,0807	0,1843 \pm 0,1244	0,0742 \pm 0,0926	0,0047 \pm 0,0115
5 · 10 ⁻⁷ M	0,4801 \pm 0,0720	0,1762 \pm 0,1107	0,0719 \pm 0,0579	0,0039 \pm 0,0104
CONTROL-10 ⁻⁷ M	0,5011 \pm 0,0872	0,1936 \pm 0,1023	0,1057 \pm 0,0525	0,0052 \pm 0,0129
10 ⁻⁷ M	0,5132 \pm 0,0957	0,1868 \pm 0,0892	0,0878 \pm 0,0556	0,0099 \pm 0,0175
CONTROL-10 ⁻⁸ M	0,4679 \pm 0,0827	0,2091 \pm 0,0899	0,0978 \pm 0,0443	0,0000 \pm 0,0000
10 ⁻⁸ M	0,5055 \pm 0,0996	0,1953 \pm 0,0689	0,0799 \pm 0,0419	0,0034 \pm 0,0119

Tabla 23. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con mibefradil. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

MIBEFRADIL ÚLCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL-10 ⁻⁴ M	47,240 \pm 26,823	27,198 \pm 20,906	4,087 \pm 7,239
10 ⁻⁴ M	-	-	-
CONTROL-10 ⁻⁵ M	47,240 \pm 26,823	27,198 \pm 20,906	4,087 \pm 7,239
10 ⁻⁵ M	77,555 \pm 13,798**	58,053 \pm 15,144**	22,090 \pm 7,739**
CONTROL-7,5·10 ⁻⁶ M	35,635 \pm 16,851	15,954 \pm 10,454	0,728 \pm 1,701
7,5 · 10 ⁻⁶ M	56,310 \pm 13,141**	31,837 \pm 13,211**	12,594 \pm 4,756**
CONTROL-5·10 ⁻⁶ M	42,371 \pm 29,737	14,400 \pm 16,362	3,895 \pm 7,448
5 · 10 ⁻⁶ M	46,535 \pm 14,642	28,072 \pm 12,575*	8,781 \pm 4,441**
CONTROL-2,5·10 ⁻⁶ M	42,371 \pm 29,737	14,400 \pm 16,362	3,895 \pm 7,448
2,5 · 10 ⁻⁶ M	47,529 \pm 15,069	20,565 \pm 14,372	8,405 \pm 6,033*
CONTROL-10 ⁻⁶ M	41,631 \pm 21,248	22,769 \pm 18,288	0,402 \pm 0,955
10 ⁻⁶ M	54,705 \pm 20,311	31,421 \pm 15,838	5,763 \pm 6,846*
CONTROL-7,5·10 ⁻⁷ M	46,120 \pm 13,598	15,645 \pm 17,942	1,440 \pm 2,926
7,5 · 10 ⁻⁷ M	39,095 \pm 21,316	17,469 \pm 19,449	3,000 \pm 5,210
CONTROL-5·10 ⁻⁷ M	36,502 \pm 22,694	13,856 \pm 18,720	1,087 \pm 2,811
5 · 10 ⁻⁷ M	36,145 \pm 20,058	14,946 \pm 11,305	0,951 \pm 2,660
CONTROL-10 ⁻⁷ M	38,925 \pm 19,279	20,611 \pm 11,387	1,050 \pm 2,569
10 ⁻⁷ M	35,943 \pm 14,075	16,922 \pm 10,610	1,945 \pm 3,470
CONTROL-10 ⁻⁸ M	45,026 \pm 17,666	20,340 \pm 10,424	0,000 \pm 0,0000
10 ⁻⁸ M	38,769 \pm 11,121	17,422 \pm 6,702	0,460 \pm 1,593

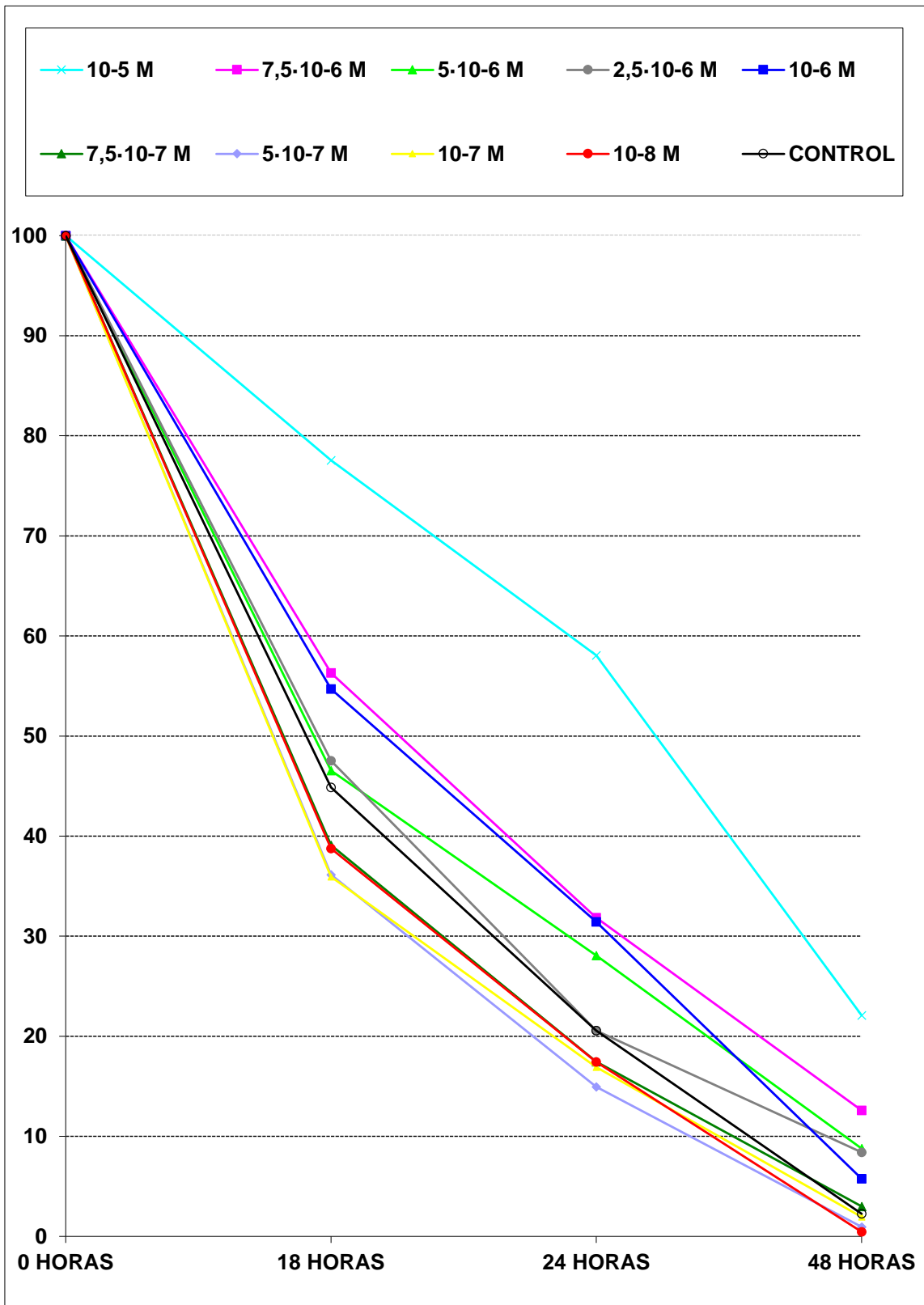


Figura 53. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con mibefradil. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

4.5.- EFECTO DEL NICARDIPINO SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Se realizaron 9 experimentos con 216 úlceras que presentaron un área media a las 0 horas de 0,5073 mm² y una desviación típica de 0,0681 mm². Un total de 108 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,5059 mm², con una desviación típica de 0,0694 mm²). El mismo número de lesiones fueron utilizadas como controles (área media 0,5087 mm², con una desviación típica de 0,0671 mm²).

Las concentraciones de NIC utilizadas fueron 10⁻⁴, 7,5·10⁻⁵, 5·10⁻⁵, 2,5·10⁻⁵, 10⁻⁵, 7,5·10⁻⁶, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

Los grupos con NIC 10⁻⁴ y 7,5·10⁻⁵ M produjeron un despegamiento de la monocapa de fibroblastos a las 18 y 24 horas respectivamente. Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en los grupos con concentraciones de NIC ≥10⁻⁵ M a las 18, 24 y 48 horas. Los grupos con concentraciones de NIC ≤7,5·10⁻⁶ M no presentaron, en ningún momento, diferencias respecto a sus controles (tablas 24 y 25).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de NIC experimentadas los resultados fueron los siguientes (figura 54):

NIC 7,5·10⁻⁵ M presentó áreas significativamente superiores respecto a concentraciones de NIC ≤10⁻⁶ M a las 18 horas, no siendo posible la valoración posterior.

NIC 5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIC ≤10⁻⁶ M a las 18 y 24 horas y frente a NIC ≤2,5·10⁻⁵ M a las 48 horas.

NIC 2,5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIC ≤10⁻⁶ M a las 18, 24 y 48 horas.

NIC 10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIC ≤10⁻⁶ M a las 18, 24 y 48 horas.

NIC 7,5·10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a concentraciones de NIC ≤10⁻⁶ M a las 18 y 24 horas y NIC ≤10⁻⁷ M a las 48 horas.

Los grupos con concentraciones de NIC ≤10⁻⁶ M no presentaron diferencias entre sí en ningún momento del experimento.

No existieron diferencias significativas entre la cinética de reparación de los controles con etanol (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M), ni entre éstos y el control carente de etanol (tablas 24 y 25).

Tabla 24. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nicardipino. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm^2 (media \pm desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NICARDIPINO ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL SIN ETANOL	0,5398 \pm 0,0596	0,2568 \pm 0,1072	0,1589 \pm 0,0832	0,0294 \pm 0,0453
CONTROL- 10^{-4} M	0,5237 \pm 0,0756	0,2467 \pm 0,0698	0,1095 \pm 0,0488	0,0116 \pm 0,0340
10^{-4} M	0,5028 \pm 0,0467	-	-	-
CONTROL- $7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,4870 \pm 0,0743	0,2659 \pm 0,0817	0,1098 \pm 0,0852	0,0172 \pm 0,0352
$7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,5159 \pm 0,0772	0,4305 \pm 0,1000**	-	-
CONTROL- $5 \cdot 10^{-5}$ M	0,4896 \pm 0,0706	0,2651 \pm 0,0913	0,1030 \pm 0,0743	0,0078 \pm 0,0183
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,5152 \pm 0,0749	0,4054 \pm 0,0945**	0,2771 \pm 0,0829**	0,2109 \pm 0,0851**
CONTROL- $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,4871 \pm 0,0573	0,2856 \pm 0,1094	0,1125 \pm 0,1046	0,0303 \pm 0,0469
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,4950 \pm 0,0789	0,3703 \pm 0,0638	0,2118 \pm 0,0679*	0,1250 \pm 0,0589**
CONTROL- 10^{-5} M	0,5413 \pm 0,0614	0,2593 \pm 0,1062	0,1602 \pm 0,0828	0,0307 \pm 0,0477
10^{-5} M	0,5059 \pm 0,0708	0,3584 \pm 0,0713*	0,2213 \pm 0,0813	0,0802 \pm 0,0582*
CONTROL- $7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,5193 \pm 0,0686	0,3441 \pm 0,1055	0,1860 \pm 0,1362	0,0445 \pm 0,0433
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,4962 \pm 0,0641	0,3644 \pm 0,0685	0,2527 \pm 0,0476	0,0742 \pm 0,0778
CONTROL- 10^{-6} M	0,5210 \pm 0,0570	0,2482 \pm 0,1010	0,1091 \pm 0,0761	0,0036 \pm 0,0085
10^{-6} M	0,5072 \pm 0,0609	0,2885 \pm 0,0595	0,1105 \pm 0,0769	0,0257 \pm 0,0391
CONTROL- 10^{-7} M	0,4966 \pm 0,0594	0,2741 \pm 0,0889	0,1137 \pm 0,0769	0,0073 \pm 0,0109
10^{-7} M	0,5173 \pm 0,0715	0,2929 \pm 0,0988	0,1434 \pm 0,0726	0,0111 \pm 0,0212
CONTROL- 10^{-8} M	0,5124 \pm 0,0759	0,2937 \pm 0,1016	0,1691 \pm 0,0875	0,0148 \pm 0,0234
10^{-8} M	0,4976 \pm 0,0909	0,3011 \pm 0,0975	0,1410 \pm 0,0701	0,0094 \pm 0,0125

Tabla 25. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nicardipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NICARDIPINO ÚLCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL SIN ETANOL	48,150 \pm 20,133	29,554 \pm 15,243	5,432 \pm 8,348
CONTROL-10⁻⁴ M	46,940 \pm 11,110	20,773 \pm 8,407	2,210 \pm 6,225
10⁻⁴ M	-	-	-
CONTROL-7,5·10⁻⁵ M	52,720 \pm 13,499	21,585 \pm 16,829	3,666 \pm 7,473
7,5 · 10⁻⁵ M	83,097 \pm 14,674**	-	-
CONTROL-5·10⁻⁵ M	52,078 \pm 15,419	20,085 \pm 14,177	1,667 \pm 3,894
5 · 10⁻⁵ M	78,355 \pm 12,216**	54,995 \pm 17,781**	41,674 \pm 17,750**
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	57,930 \pm 19,341	22,240 \pm 19,583	5,881 \pm 9,220
2,5 · 10⁻⁵ M	73,875 \pm 14,534*	42,948 \pm 15,823*	25,505 \pm 13,306**
CONTROL-10⁻⁵ M	48,525 \pm 19,994	29,736 \pm 15,209	5,667 \pm 8,781
10⁻⁵ M	71,772 \pm 15,133**	43,684 \pm 16,112*	16,125 \pm 11,552*
CONTROL-7,5·10⁻⁶ M	65,843 \pm 17,145	34,780 \pm 24,899	8,265 \pm 8,188
7,5 · 10⁻⁶ M	73,502 \pm 10,230	50,840 \pm 6,274	16,992 \pm 16,226
CONTROL-10⁻⁶ M	47,887 \pm 13,338	20,445 \pm 13,415	0,795 \pm 1,864
10⁻⁶ M	57,309 \pm 12,358	22,720 \pm 16,741	5,405 \pm 8,341
CONTROL-10⁻⁷ M	55,500 \pm 17,318	23,169 \pm 17,422	1,515 \pm 2,278
10⁻⁷ M	54,745 \pm 20,552	26,405 \pm 12,544	2,415 \pm 4,894
CONTROL-10⁻⁸ M	57,954 \pm 19,357	33,135 \pm 16,972	2,680 \pm 3,887
10⁻⁸ M	59,913 \pm 14,754	27,951 \pm 12,247	2,050 \pm 2,759

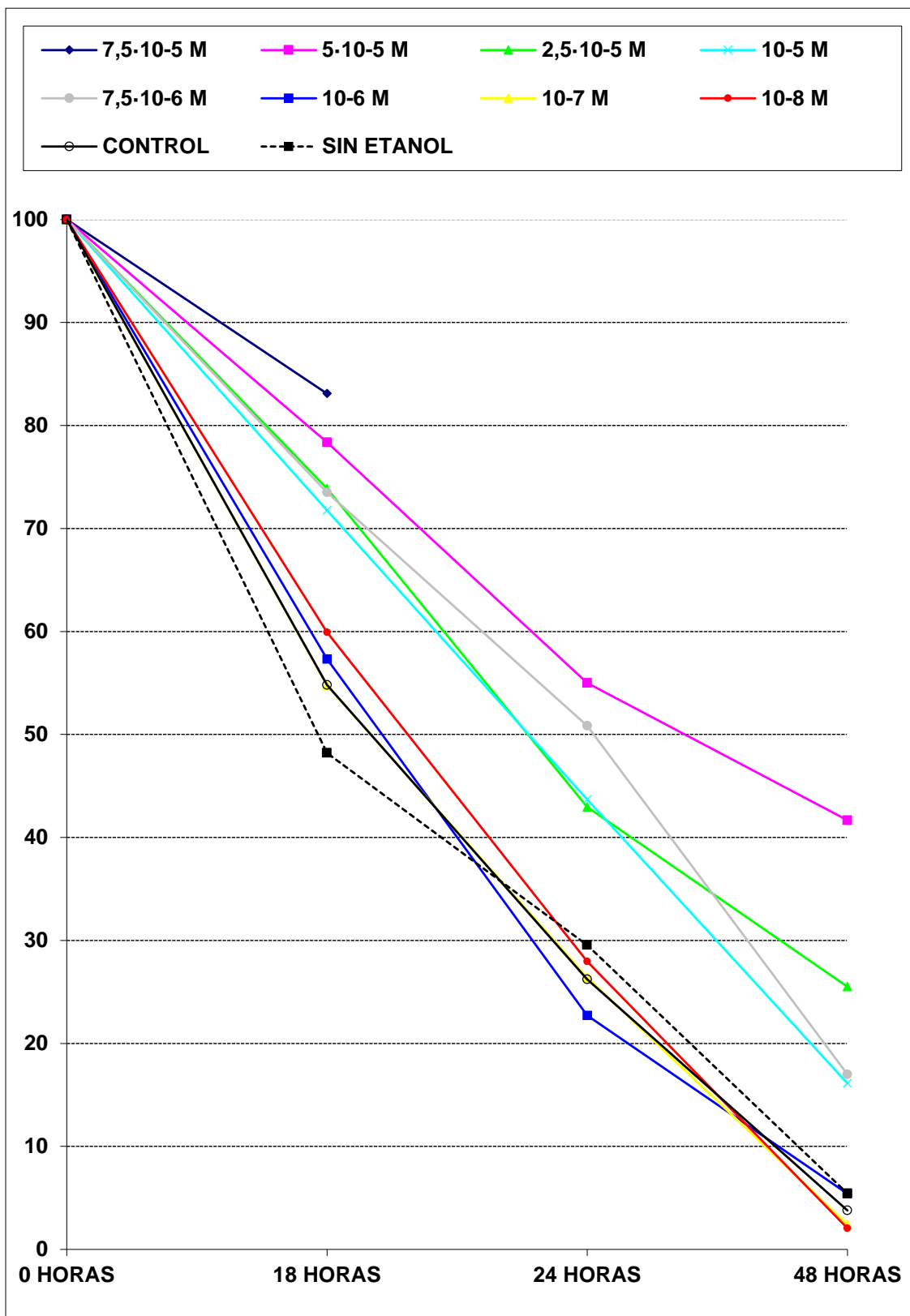


Figura 54. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nifedipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

4.6.- EFECTO DEL NIFEDIPINO SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Se realizaron 8 experimentos con 192 úlceras que presentaron un área media a las 0 horas de 0,4933 mm² y una desviación típica de 0,0719 mm². Un total de 96 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,4945 mm², con una desviación típica de 0,0752 mm²). El mismo número de lesiones fueron utilizadas como controles (área media 0,4921 mm², con una desviación típica de 0,0689 mm²).

Las concentraciones de NIF utilizadas fueron 10⁻⁴, 7,5·10⁻⁵, 5·10⁻⁵, 2,5·10⁻⁵, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en los grupos con concentraciones de NIF $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 horas y en los grupos con concentraciones de NIF $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 24 y 48 horas. Los grupos con concentraciones de NIF $\leq 10^{-5}$ M no presentaron en ningún momento diferencias significativas respecto a sus controles (tablas 26 y 27).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de NIF experimentadas los resultados fueron los siguientes (figura 55):

NIF 10⁻⁴ M presentó áreas significativamente superiores respecto al resto de concentraciones a las 18 horas y también presentó diferencias significativas respecto a NIF 5·10⁻⁵ M a las 24 horas y respecto a NIF $\leq 10^{-5}$ M a las 24 y 48 horas .

NIF 7,5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIF 10⁻⁸ M a las 24 horas y NIF $\leq 10^{-5}$ M a las 48 horas.

NIF 5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIF $\leq 10^{-6}$ M a las 48 horas.

NIF 2,5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIF 10⁻⁸ M a las 24 y 48 horas.

NIF 10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIF 10⁻⁸ M a las 24 horas.

Los grupos con concentraciones de NIF $\leq 10^{-6}$ M no presentaron diferencias entre sí en ningún momento del experimento.

Tabla 26. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nifedipino. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm² (media ± desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* p < 0,05. **p < 0,01.

NIFEDIPINO ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL-10 ⁻⁴ M	0,4861 ± 0,0611	0,2183 ± 0,1185	0,1068 ± 0,0968	0,0246 ± 0,0348
10 ⁻⁴ M	0,4906 ± 0,0568	0,3468 ± 0,0897*	0,1929 ± 0,0773*	0,0614 ± 0,0413*
CONTROL-7,5·10 ⁻⁵ M	0,4704 ± 0,0732	0,1731 ± 0,0779	0,0752 ± 0,0422	0,0110 ± 0,0113
7,5 · 10 ⁻⁵ M	0,4616 ± 0,0781	0,2636 ± 0,0789*	0,1570 ± 0,0501**	0,0543 ± 0,0370**
CONTROL-5·10 ⁻⁵ M	0,4588 ± 0,0645	0,1426 ± 0,0674	0,0452 ± 0,0308	0,0051 ± 0,0097
5 · 10 ⁻⁵ M	0,4838 ± 0,0723	0,2122 ± 0,0785	0,1199 ± 0,0757**	0,0335 ± 0,0192**
CONTROL-2,5·10 ⁻⁵ M	0,4635 ± 0,0805	0,1641 ± 0,0700	0,0801 ± 0,0437	0,0111 ± 0,0133
2,5 · 10 ⁻⁵ M	0,4778 ± 0,0755	0,1926 ± 0,0527	0,1398 ± 0,0630*	0,0326 ± 0,0249*
CONTROL-10 ⁻⁵ M	0,5196 ± 0,0464	0,2341 ± 0,1133	0,1164 ± 0,0752	0,0148 ± 0,0281
10 ⁻⁵ M	0,4958 ± 0,0650	0,2316 ± 0,0362	0,1344 ± 0,0533	0,0231 ± 0,0245
CONTROL-10 ⁻⁶ M	0,5083 ± 0,0637	0,2298 ± 0,1183	0,1154 ± 0,0773	0,0174 ± 0,0280
10 ⁻⁶ M	0,5068 ± 0,0607	0,2612 ± 0,0709	0,1334 ± 0,0469	0,0180 ± 0,0256
CONTROL-10 ⁻⁷ M	0,5158 ± 0,0695	0,2019 ± 0,1208	0,1092 ± 0,0834	0,0197 ± 0,0280
10 ⁻⁷ M	0,5346 ± 0,0964	0,2515 ± 0,1251	0,1309 ± 0,0899	0,0224 ± 0,0174
CONTROL-10 ⁻⁸ M	0,5145 ± 0,0728	0,2498 ± 0,1352	0,1110 ± 0,0840	0,0217 ± 0,0310
10 ⁻⁸ M	0,5050 ± 0,0879	0,2039 ± 0,0989	0,0895 ± 0,0615	0,0142 ± 0,0123

Tabla 27. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nifedipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIFEDIPINO ÚLCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL-10⁻⁴ M	43,758 \pm 19,816	21,160 \pm 17,364	4,826 \pm 6,529
10⁻⁴ M	70,601 \pm 15,689**	39,752 \pm 16,356*	12,616 \pm 8,357*
CONTROL-7,5·10⁻⁵ M	37,945 \pm 17,434	16,511 \pm 9,657	2,386 \pm 2,289
7,5 · 10⁻⁵ M	53,932 \pm 14,638*	33,255 \pm 13,417**	11,230 \pm 7,172**
CONTROL-5·10⁻⁵ M	30,585 \pm 12,838	9,795 \pm 6,409	0,992 \pm 1,843
5 · 10⁻⁵ M	43,092 \pm 11,829*	24,210 \pm 13,047**	7,315 \pm 4,595**
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	36,475 \pm 15,595	17,735 \pm 9,774	2,345 \pm 2,628
2,5 · 10⁻⁵ M	41,372 \pm 13,545	31,649 \pm 14,968*	7,387 \pm 5,766*
CONTROL-10⁻⁵ M	44,253 \pm 18,924	21,809 \pm 12,294	2,654 \pm 4,815
10⁻⁵ M	47,297 \pm 8,074	27,622 \pm 10,638	4,903 \pm 5,460
CONTROL-10⁻⁶ M	43,973 \pm 19,257	21,924 \pm 12,662	3,130 \pm 4,811
10⁻⁶ M	52,013 \pm 14,719	25,538 \pm 10,223	2,411 \pm 3,101
CONTROL-10⁻⁷ M	38,870 \pm 20,269	21,060 \pm 14,768	3,713 \pm 4,850
10⁻⁷ M	46,750 \pm 21,729	24,374 \pm 16,036	4,094 \pm 2,964
CONTROL-10⁻⁸ M	48,030 \pm 22,779	21,467 \pm 14,921	4,120 \pm 5,570
10⁻⁸ M	37,874 \pm 18,671	16,770 \pm 13,342	2,600 \pm 2,215

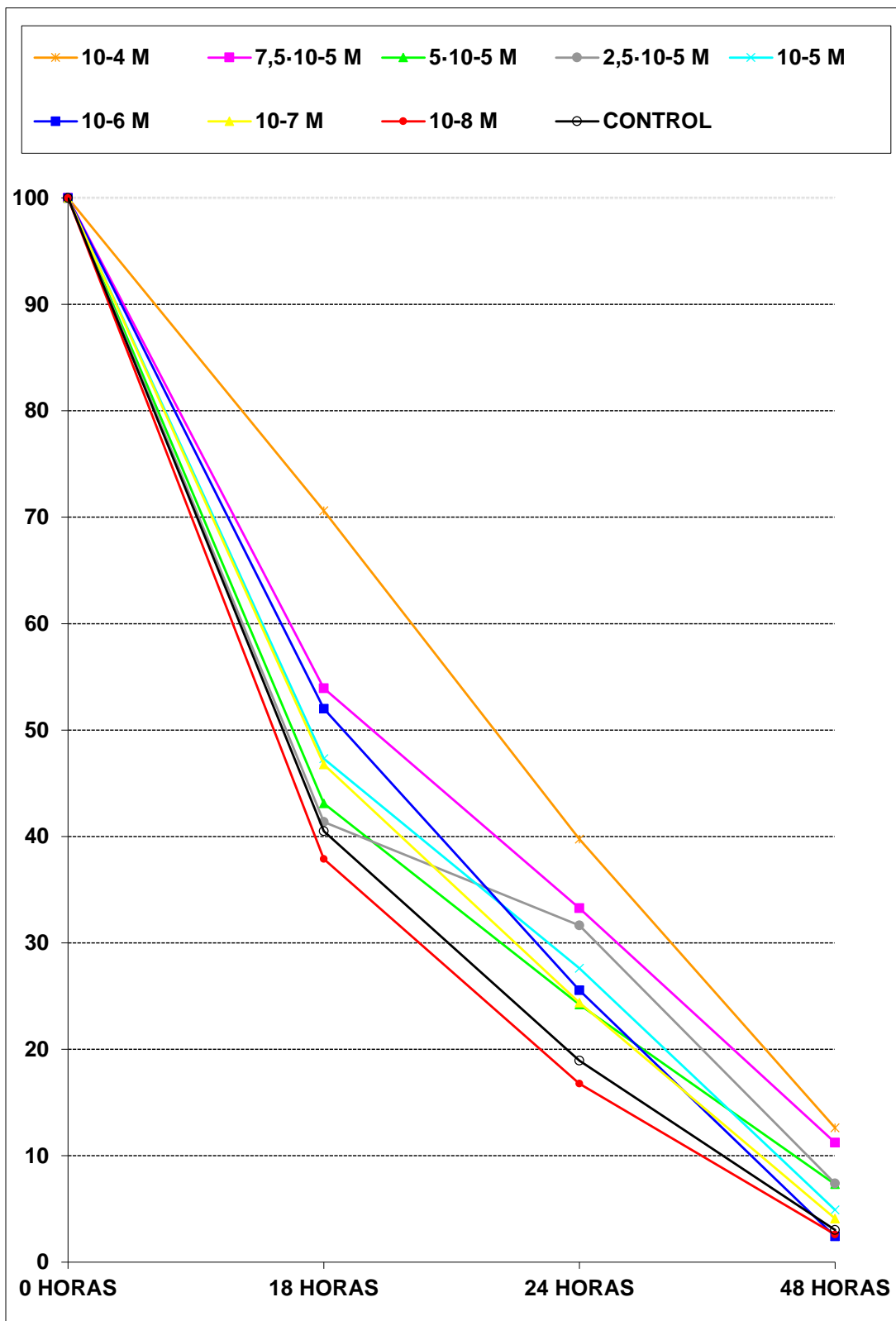


Figura 55. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nifedipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

4.7.- EFECTO DEL NIMODIPINO SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Se realizaron 9 experimentos con 216 úlceras que presentaron un área media a las 0 horas de 0,4991 mm² y una desviación típica de 0,0806 mm². Un total de 108 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,5025 mm², con una desviación típica de 0,0842 mm²). El mismo número de lesiones fueron utilizadas como controles (área media 0,4957 mm², con una desviación típica de 0,0770 mm²).

Las concentraciones de NIM utilizadas en los experimentos fueron 10⁻⁴, 5·10⁻⁵, 2,5·10⁻⁵, 10⁻⁵, 7,5·10⁻⁶, 5·10⁻⁶, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en los grupos con concentraciones de NIM ≥10⁻⁵ M a las 18 horas y en los grupos con concentraciones de NIM ≥7,5·10⁻⁶ M a las 24 y 48 horas. Los grupos con concentraciones de NIM ≤5·10⁻⁶ M no presentaron en ningún momento diferencias significativas respecto a sus controles (tablas 28 y 29).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de NIM experimentadas los resultados fueron los siguientes (figura 56):

NIM 10⁻⁴ M presentó áreas significativamente superiores respecto a NIM ≤5·10⁻⁶ M a las 24 horas y respecto a NIM 7,5·10⁻⁶ M y NIM ≤10⁻⁶ M a las 48 horas .

NIM 5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIM ≤10⁻⁵ M a las 18, 24 y 48 horas.

NIM 2,5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIM ≤10⁻⁵ M a las 18, 24 y 48 horas.

NIM 10⁻⁵ M, NIM 7,5·10⁻⁶ M y NIM 5·10⁻⁶ M presentaron diferencias significativas respecto a NIM ≤10⁻⁷ M a las 24 y 48 horas.

NIM 10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a NIM ≤10⁻⁷ M a las 24 horas.

Los grupos con concentraciones de NIM ≤10⁻⁷ M no presentaron diferencias entre sí en ningún momento del experimento.

Tabla 28. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nimodipino. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm² (media ± desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* p < 0,05. **p < 0,01.

NIMODIPINO ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL-10⁻⁴ M	0,4987 ± 0,0761	0,1357 ± 0,0750	0,0580 ± 0,0627	0,0024 ± 0,0045
10⁻⁴ M	0,5376 ± 0,0838	0,3276 ± 0,0895**	0,2347 ± 0,0665**	0,0926 ± 0,0930**
CONTROL-5·10⁻⁵ M	0,4811 ± 0,0896	0,2624 ± 0,0625	0,1553 ± 0,0522	0,0146 ± 0,0118
5 · 10⁻⁵ M	0,4885 ± 0,0885	0,3630 ± 0,0760**	0,2358 ± 0,0722**	0,0928 ± 0,0376**
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	0,4829 ± 0,0906	0,2626 ± 0,0614	0,1554 ± 0,0528	0,0158 ± 0,0108
2,5 · 10⁻⁵ M	0,4884 ± 0,1100	0,3506 ± 0,1144	0,2209 ± 0,0905	0,0912 ± 0,0495**
CONTROL-10⁻⁵ M	0,4997 ± 0,0747	0,1358 ± 0,0749	0,0578 ± 0,0628	0,0019 ± 0,0034
10⁻⁵ M	0,5254 ± 0,0882	0,2617 ± 0,1213*	0,1530 ± 0,0908**	0,0253 ± 0,0165**
CONTROL-7,5·10⁻⁶ M	0,5069 ± 0,0699	0,1809 ± 0,1076	0,0632 ± 0,0598	0,0028 ± 0,0045
7,5 · 10⁻⁶ M	0,5074 ± 0,0926	0,2578 ± 0,0948	0,1764 ± 0,0846**	0,0230 ± 0,0122**
CONTROL-5·10⁻⁶ M	0,4785 ± 0,0907	0,2588 ± 0,0636	0,1530 ± 0,0520	0,0145 ± 0,0119
5 · 10⁻⁶ M	0,4824 ± 0,0681	0,2574 ± 0,0800	0,1521 ± 0,0407	0,0403 ± 0,0391
CONTROL-10⁻⁶ M	0,4914 ± 0,0843	0,2205 ± 0,0881	0,1228 ± 0,0824	0,0104 ± 0,0123
10⁻⁶ M	0,4951 ± 0,0868	0,2907 ± 0,0807	0,1407 ± 0,0553	0,0222 ± 0,0334
CONTROL-10⁻⁷ M	0,5104 ± 0,0600	0,1772 ± 0,0980	0,0656 ± 0,0610	0,0044 ± 0,0050
10⁻⁷ M	0,5040 ± 0,0621	0,2477 ± 0,0603	0,0703 ± 0,0282	0,0092 ± 0,0093
CONTROL-10⁻⁸ M	0,5119 ± 0,0641	0,1786 ± 0,0983	0,0654 ± 0,0618	0,0045 ± 0,0052
10⁻⁸ M	0,4937 ± 0,0819	0,2415 ± 0,0751	0,0625 ± 0,0316	0,0028 ± 0,0051

Tabla 29. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nimodipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIMODIPINO ÚLCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL-10⁻⁴ M	27,559 \pm 14,436	10,716 \pm 13,839	0,529 \pm 1,112
10⁻⁴ M	61,769 \pm 17,952**	44,831 \pm 16,032**	17,518 \pm 19,421**
CONTROL-5\cdot10⁻⁵ M	56,205 \pm 16,403	32,539 \pm 10,153	3,183 \pm 2,667
5 \cdot 10⁻⁵ M	74,755 \pm 11,851*	47,630 \pm 9,567**	19,594 \pm 8,355**
CONTROL-2,5\cdot10⁻⁵ M	56,060 \pm 16,276	32,429 \pm 10,195	3,345 \pm 2,446
2,5 \cdot 10⁻⁵ M	71,415 \pm 13,411*	44,644 \pm 11,882*	18,060 \pm 8,299**
CONTROL-10⁻⁵ M	27,525 \pm 14,443	10,670 \pm 13,863	0,390 \pm 0,724
10⁻⁵ M	48,631 \pm 19,359*	28,921 \pm 16,348**	4,755 \pm 4,038**
CONTROL-7,5\cdot10⁻⁶ M	35,355 \pm 20,859	11,647 \pm 13,516	0,633 \pm 1,116
7,5 \cdot 10⁻⁶ M	50,641 \pm 14,196	33,410 \pm 10,794**	4,536 \pm 2,298**
CONTROL-5\cdot10⁻⁶ M	55,667 \pm 16,338	32,183 \pm 9,905	3,166 \pm 2,712
5 \cdot 10⁻⁶ M	53,162 \pm 12,743	31,926 \pm 9,035	8,722 \pm 8,274
CONTROL-10⁻⁶ M	45,035 \pm 18,052	24,276 \pm 15,436	2,093 \pm 2,450
10⁻⁶ M	57,923 \pm 12,976	27,785 \pm 9,569	5,185 \pm 8,046
CONTROL-10⁻⁷ M	35,872 \pm 21,425	12,155 \pm 13,669	0,932 \pm 1,164
10⁻⁷ M	50,607 \pm 15,921	13,849 \pm 4,927	1,826 \pm 1,857
CONTROL-10⁻⁸ M	36,025 \pm 21,480	12,077 \pm 13,772	0,935 \pm 1,175
10⁻⁸ M	50,364 \pm 18,167	12,307 \pm 4,961	0,544 \pm 0,9479

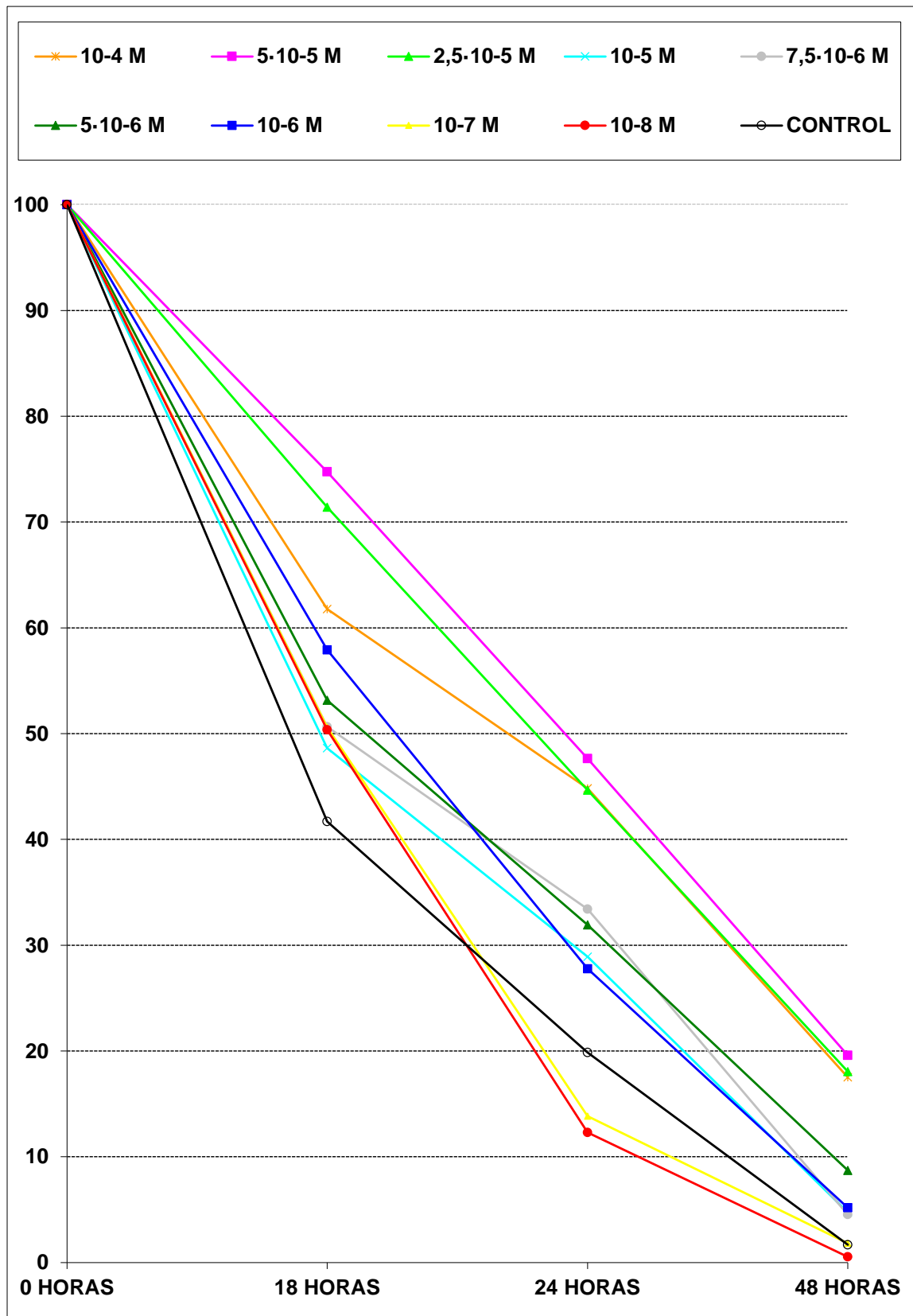


Figura 56. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nimodipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

4.8.- EFECTO DEL NITRENDIPINO SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Se realizaron 9 experimentos con 216 úlceras que presentaron un área media a las 0 horas de 0,5043 mm² y una desviación típica de 0,0785 mm². Un total de 108 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,5094 mm², con una desviación típica de 0,0819 mm²). El mismo número de lesiones fueron utilizadas como controles (área media 0,4991 mm², con una desviación típica de 0,0751 mm²).

Las concentraciones de NIT empleadas en los experimentos fueron 10⁻⁴, 5·10⁻⁵, 2,5·10⁻⁵, 10⁻⁵, 7,5·10⁻⁶, 5·10⁻⁶, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en los grupos con concentraciones de NIT $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 y 24 horas y en los grupos con concentraciones de NIT $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 48 horas. Los grupos con concentraciones de NIT $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M no presentaron en ningún momento diferencias significativas respecto a sus controles (tablas 30 y 31).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de NIT experimentadas los resultados fueron los siguientes (figura 57):

NIT 10⁻⁴ M presentó áreas significativamente superiores respecto a NIT $\leq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 y 48 horas.

NIT 5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIT $\leq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18, 24 y 48 horas.

NIT 2,5·10⁻⁵ M y NIT 10⁻⁵ M presentaron diferencias significativas respecto a NIT $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M a las 48 horas.

Los grupos con concentraciones de NIT $\leq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M no presentaron diferencias entre sí en ningún momento del experimento.

Tabla 30. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nitrendipino. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm² (media ± desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* p < 0,05. **p < 0,01.

NITRENDIPINO ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL-10⁻⁴ M	0,5223 ± 0,0586	0,2552 ± 0,1194	0,0947 ± 0,0687	0,0109 ± 0,0121
10⁻⁴ M	0,5166 ± 0,0901	0,3920 ± 0,1013*	0,2007 ± 0,1347*	0,1124 ± 0,0567**
CONTROL-5·10⁻⁵ M	0,4785 ± 0,0824	0,3200 ± 0,0686	0,1384 ± 0,0793	0,0100 ± 0,0097
5 · 10⁻⁵ M	0,4949 ± 0,0645	0,3995 ± 0,0671**	0,2366 ± 0,0346**	0,1208 ± 0,0784**
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	0,4465 ± 0,0602	0,2952 ± 0,0752	0,1370 ± 0,0797	0,0055 ± 0,0067
2,5 · 10⁻⁵ M	0,4930 ± 0,0836	0,3058 ± 0,0657	0,1326 ± 0,0838	0,0584 ± 0,0532**
CONTROL-10⁻⁵ M	0,5206 ± 0,0605	0,2507 ± 0,1235	0,1156 ± 0,0857	0,0054 ± 0,0102
10⁻⁵ M	0,5120 ± 0,0761	0,2703 ± 0,1065	0,1741 ± 0,0897	0,0546 ± 0,0573**
CONTROL-7,5·10⁻⁶ M	0,5188 ± 0,0620	0,2482 ± 0,1228	0,1141 ± 0,0853	0,0051 ± 0,0101
7,5 · 10⁻⁶ M	0,5149 ± 0,1054	0,2481 ± 0,1172	0,1407 ± 0,1031	0,0312 ± 0,0428*
CONTROL-5·10⁻⁶ M	0,4650 ± 0,0695	0,2580 ± 0,1187	0,1186 ± 0,0914	0,0044 ± 0,0065
5 · 10⁻⁶ M	0,5123 ± 0,0700	0,2666 ± 0,1007	0,1653 ± 0,0816	0,0152 ± 0,0175
CONTROL-10⁻⁶ M	0,4630 ± 0,0908	0,3239 ± 0,0796	0,1686 ± 0,0988	0,0090 ± 0,0101
10⁻⁶ M	0,4951 ± 0,0867	0,2657 ± 0,0758	0,1237 ± 0,0694	0,0122 ± 0,0106
CONTROL-10⁻⁷ M	0,5364 ± 0,0689	0,2555 ± 0,1207	0,1120 ± 0,0903	0,0073 ± 0,0101
10⁻⁷ M	0,5505 ± 0,0867	0,2771 ± 0,1189	0,1466 ± 0,1176	0,0146 ± 0,0168
CONTROL-10⁻⁸ M	0,5411 ± 0,0672	0,2694 ± 0,1274	0,1057 ± 0,0807	0,0091 ± 0,0128
10⁻⁸ M	0,4957 ± 0,0787	0,2411 ± 0,1177	0,1246 ± 0,0919	0,0143 ± 0,0260

Tabla 31. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nitrendipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NITRENDIPINO ULCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL-10⁻⁴ M	48,759 \pm 21,552	18,094 \pm 13,041	2,041 \pm 2,222
10⁻⁴ M	75,703 \pm 14,095**	40,485 \pm 26,400*	22,900 \pm 12,895**
CONTROL-5\cdot10⁻⁵ M	66,200 \pm 17,717	28,196 \pm 15,576	2,316 \pm 1,921
5 \cdot 10⁻⁵ M	80,719 \pm 8,142*	48,388 \pm 7,372**	24,035 \pm 14,299**
CONTROL-2,5\cdot10⁻⁵ M	65,577 \pm 20,564	29,863 \pm 16,279	1,620 \pm 1,795
2,5 \cdot 10⁻⁵ M	62,520 \pm 13,657	29,263 \pm 16,580	12,804 \pm 11,812**
CONTROL-10⁻⁵ M	48,460 \pm 23,033	22,560 \pm 16,706	1,055 \pm 1,926
10⁻⁵ M	50,467 \pm 17,778	35,214 \pm 18,499	10,615 \pm 11,551**
CONTROL-7,5\cdot10⁻⁶ M	48,136 \pm 22,893	23,370 \pm 16,681	1,005 \pm 1,896
7,5 \cdot 10⁻⁶ M	47,324 \pm 21,399	28,011 \pm 20,524	5,883 \pm 7,979*
CONTROL-5\cdot10⁻⁶ M	55,966 \pm 28,498	25,015 \pm 18,300	1,330 \pm 1,748
5 \cdot 10⁻⁶ M	52,099 \pm 18,008	32,980 \pm 16,868	2,713 \pm 3,276
CONTROL-10⁻⁶ M	68,905 \pm 17,196	34,252 \pm 15,375	2,137 \pm 1,807
10⁻⁶ M	54,292 \pm 14,434	26,400 \pm 14,610	2,681 \pm 2,483
CONTROL-10⁻⁷ M	47,595 \pm 21,105	21,146 \pm 17,381	1,340 \pm 1,853
10⁻⁷ M	50,063 \pm 18,839	26,458 \pm 20,145	2,705 \pm 3,184
CONTROL-10⁻⁸ M	49,810 \pm 22,601	19,706 \pm 15,330	1,686 \pm 2,355
10⁻⁸ M	47,801 \pm 20,211	24,997 \pm 16,572	2,803 \pm 4,741

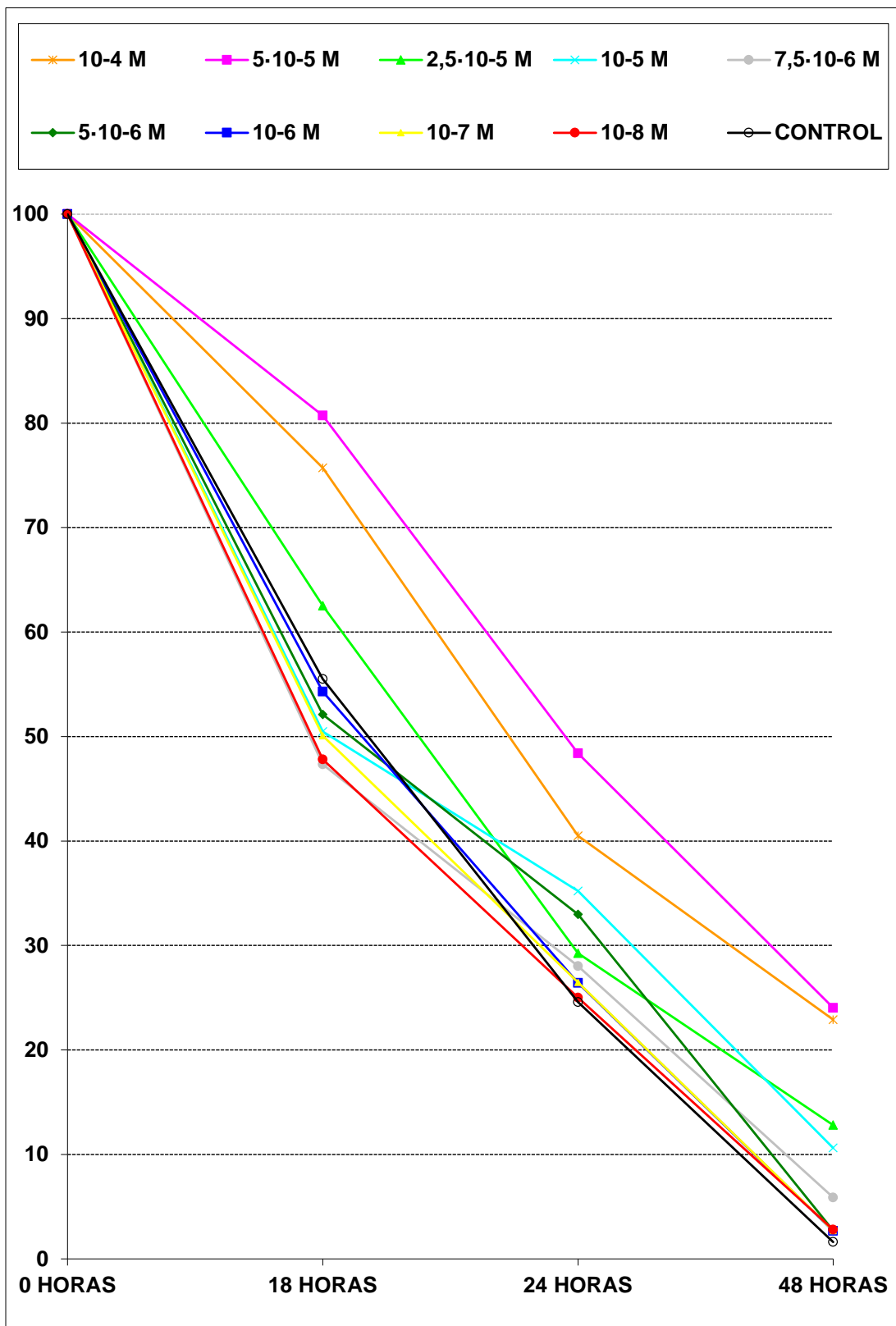


Figura 57. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nitrendipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

4.9.- EFECTO DEL NISOLDIPINO SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA.

Se realizaron 10 experimentos con 240 úlceras que presentaron un área media a las 0 horas de 0,5019 mm² y una desviación típica de 0,0750 mm². Un total de 120 lesiones fueron incluidas como casos (área media 0,4993 mm², con una desviación típica de 0,0706 mm²). El mismo número de lesiones fueron utilizadas como controles (área media 0,5045 mm², con una desviación típica de 0,0794 mm²).

Las concentraciones de NIS empleadas en los experimentos fueron 10⁻⁴, 7,5·10⁻⁵, 5·10⁻⁵, 2,5·10⁻⁵, 10⁻⁵, 7,5·10⁻⁶, 5·10⁻⁶, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ M.

Las áreas libres de fibroblastos (expresadas como porcentaje de área libre de fibroblastos respecto al área inicial) fueron significativamente superiores respecto a sus controles en los grupos con concentraciones de NIS $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 horas y en los grupos con concentraciones de NIS $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 24 y 48 horas. Los grupos con concentraciones de NIS $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M no presentaron en ningún momento diferencias significativas respecto a sus controles (tablas 32 y 33).

Al comparar la cinética de reparación fibroblástica entre las diferentes concentraciones de NIM experimentadas los resultados fueron los siguientes (figura 58):

NIS 10⁻⁴ M presentó áreas significativamente superiores respecto a NIS $\leq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 y 48 horas y respecto a NIS $\leq 5 \cdot 10^{-5}$ M a las 24 horas.

NIS 7,5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIS $\leq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 horas y respecto a NIS $\leq 5 \cdot 10^{-5}$ M a las 24 y 48 horas.

NIS 5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIS $\leq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 48 horas.

NIS 2,5·10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIS $\leq 10^{-7}$ M a las 48 horas.

NIS 10⁻⁵ M presentó diferencias significativas respecto a NIS $\leq 10^{-7}$ M a las 24 horas y NIS $\leq 10^{-6}$ M a las 48 horas.

NIS 7,5·10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a NIS $\leq 10^{-7}$ M a las 48 horas.

NIS 5·10⁻⁶ M presentó diferencias significativas respecto a NIS 10⁻⁸ M a las 48 horas.

Los grupos con concentraciones de NIT $\leq 10^{-6}$ M no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí en ningún momento del experimento.

Tabla 32. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nisoldipino. Los valores expresan el área libre de fibroblastos en mm² (media ± desviación típica) inicial y a las 18, 24 y 48 horas.

* p< 0,05. **p< 0,01.

NISOLDIPINO ÚLCERAS DOSIS	0 HORAS	18 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
CONTROL-10⁻⁴ M	0,5107 ± 0,0846	0,3467 ± 0,0828	0,1549 ± 0,0790	0,0355 ± 0,0291
10⁻⁴ M	0,5086 ± 0,0847	0,3981 ± 0,0745	0,2915 ± 0,0680**	0,1334 ± 0,0632**
CONTROL-7,5·10⁻⁵ M	0,4994 ± 0,0676	0,2806 ± 0,0839	0,1198 ± 0,0638	0,0238 ± 0,0269
7,5 · 10⁻⁵ M	0,5076 ± 0,0783	0,3874 ± 0,0656**	0,2991 ± 0,0459**	0,1622 ± 0,0359**
CONTROL-5·10⁻⁵ M	0,5073 ± 0,0917	0,2809 ± 0,1079	0,1301 ± 0,0747	0,0279 ± 0,0256
5 · 10⁻⁵ M	0,5127 ± 0,0738	0,3802 ± 0,0772	0,2350 ± 0,0525**	0,1165 ± 0,0504**
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	0,5077 ± 0,0912	0,2813 ± 0,1075	0,1301 ± 0,0747	0,0275 ± 0,0248
2,5 · 10⁻⁵ M	0,4978 ± 0,0553	0,3195 ± 0,0758	0,1820 ± 0,0434	0,0737 ± 0,0246**
CONTROL-10⁻⁵ M	0,5098 ± 0,0917	0,3372 ± 0,0979	0,1583 ± 0,0839	0,0387 ± 0,0329
10⁻⁵ M	0,4694 ± 0,0697	0,3059 ± 0,0722	0,2155 ± 0,0718	0,0705 ± 0,0324*
CONTROL-7,5·10⁻⁶ M	0,5011 ± 0,0818	0,2883 ± 0,0960	0,1063 ± 0,0594	0,0212 ± 0,0198
7,5 · 10⁻⁶ M	0,4930 ± 0,0745	0,3255 ± 0,0930	0,2088 ± 0,1077**	0,0692 ± 0,0437**
CONTROL-5·10⁻⁶ M	0,4927 ± 0,0659	0,3216 ± 0,0111	0,1400 ± 0,0882	0,0292 ± 0,0274
5 · 10⁻⁶ M	0,4991 ± 0,0716	0,3342 ± 0,0637	0,1926 ± 0,0805	0,0450 ± 0,0317
CONTROL-10⁻⁶ M	0,5092 ± 0,0918	0,3364 ± 0,0979	0,1578 ± 0,0843	0,0408 ± 0,0320
10⁻⁶ M	0,4997 ± 0,0539	0,3416 ± 0,0820	0,1915 ± 0,1179	0,0449 ± 0,0462
CONTROL-10⁻⁷ M	0,4917 ± 0,0745	0,3121 ± 0,1211	0,1434 ± 0,0933	0,0325 ± 0,0321
10⁻⁷ M	0,5058 ± 0,0889	0,3020 ± 0,0824	0,1413 ± 0,1055	0,0294 ± 0,0318
CONTROL-10⁻⁸ M	0,5155 ± 0,0751	0,3589 ± 0,0878	0,1709 ± 0,0808	0,0359 ± 0,0299
10⁻⁸ M	0,4992 ± 0,0662	0,3195 ± 0,0583	0,1633 ± 0,0919	0,0156 ± 0,0141

Tabla 33. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nisoldipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir (% \pm desviación típica) a las 18, 24 y 48 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NISOLDIPINO ÚLCERAS DOSIS	18 HORAS % \pm DT	24 HORAS % \pm DT	48 HORAS % \pm DT
CONTROL-10⁻⁴ M	67,940 \pm 12,541	31,602 \pm 18,647	7,675 \pm 7,334
10⁻⁴ M	78,467 \pm 8,376*	58,128 \pm 13,648**	26,679 \pm 11,889**
CONTROL-7,5·10⁻⁵ M	55,510 \pm 13,061	23,975 \pm 12,255	4,790 \pm 5,359
7,5 · 10⁻⁵ M	76,661 \pm 9,795**	59,430 \pm 7,793**	31,983 \pm 5,102**
CONTROL-5·10⁻⁵ M	54,058 \pm 14,853	24,796 \pm 12,868	5,611 \pm 5,705
5 · 10⁻⁵ M	74,494 \pm 11,380**	46,078 \pm 9,591**	22,824 \pm 9,911**
CONTROL-2,5·10⁻⁵ M	54,117 \pm 14,843	24,775 \pm 12,860	5,488 \pm 5,376
2,5 · 10⁻⁵ M	64,169 \pm 13,199	37,115 \pm 10,270*	15,306 \pm 6,454**
CONTROL-10⁻⁵ M	66,018 \pm 15,719	31,426 \pm 18,059	8,168 \pm 7,730
10⁻⁵ M	65,804 \pm 15,552	45,356 \pm 11,962*	15,285 \pm 6,889*
CONTROL-7,5·10⁻⁶ M	56,618 \pm 13,871	21,260 \pm 11,766	4,563 \pm 5,122
7,5 · 10⁻⁶ M	65,225 \pm 11,645	41,473 \pm 17,836**	13,783 \pm 8,438**
CONTROL-5·10⁻⁶ M	64,426 \pm 18,522	29,186 \pm 20,226	6,238 \pm 6,428
5 · 10⁻⁶ M	67,225 \pm 10,296	39,389 \pm 16,690	9,699 \pm 7,258
CONTROL-10⁻⁶ M	65,940 \pm 15,710	31,345 \pm 18,113	8,168 \pm 7,730
10⁻⁶ M	67,660 \pm 10,203	37,075 \pm 19,465	8,592 \pm 7,550
CONTROL-10⁻⁷ M	62,504 \pm 20,449	29,010 \pm 19,662	6,730 \pm 6,987
10⁻⁷ M	59,911 \pm 12,572	29,008 \pm 20,261	6,040 \pm 6,242
CONTROL-10⁻⁸ M	69,430 \pm 13,783	33,830 \pm 18,188	7,253 \pm 6,644
10⁻⁸ M	64,167 \pm 9,565	32,320 \pm 16,481	3,361 \pm 3,493

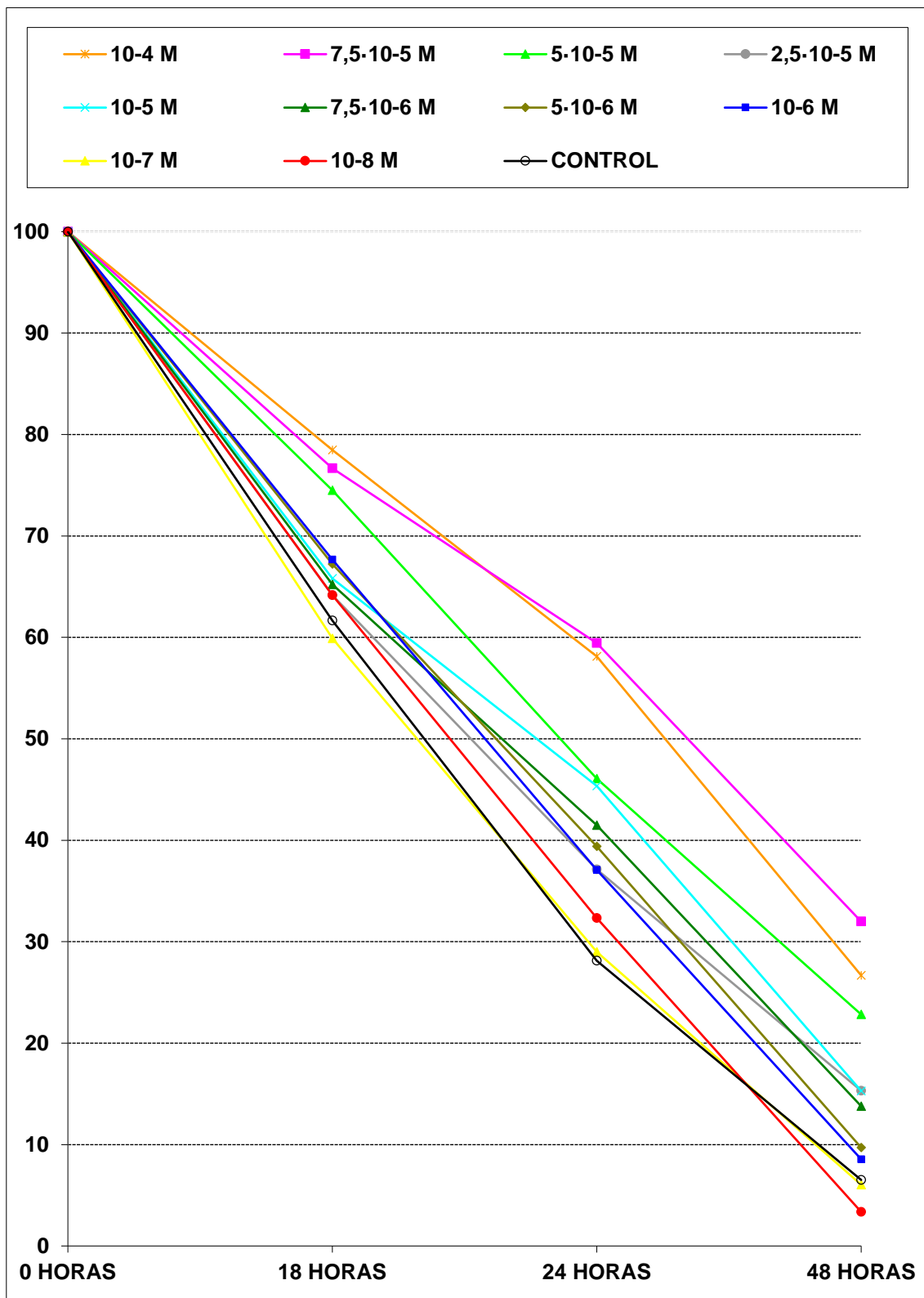


Figura 58. Cinética de reparación fibroblástica *in vitro* con nisoldipino. Los valores expresan el porcentaje del área inicial libre de fibroblastos que queda sin cubrir a las 18, 24 y 48 horas. Los valores del control expresan el área media de todos los controles utilizados en el estudio.

5.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*.

La capacidad de los inhibidores de los canales del calcio para modificar la proliferación fibroblástica *in vitro* se evaluó mediante el test espectrofotométrico WST-1 (figura 20).

5.1.- EFECTO DE LA TRIFLUOPERAZINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 12 experimentos con concentraciones de TFP entre 10^{-3} y 10^{-8} M. Las concentraciones de TFP $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la del control a las 18 horas. Las concentraciones de TFP $\geq 2,5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una proliferación celular significativamente menor que la de sus controles a las 24 y 48 horas. Las DI_{50} se situaron, en todos los tiempos estudiados, en el rango $5 \cdot 10^{-5}$ - $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, con unos valores de $3,588 \cdot 10^{-5}$ M, $3,186 \cdot 10^{-5}$ M y $3,547 \cdot 10^{-5}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de TFP $\leq 10^{-6}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la del control en todos los momentos de l estudio (tabla 34 y figura 59).

Tabla 34. Proliferación fibroblástica *in vitro* con trifluoperazina a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

TFP PROLIFERACIÓN	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL	0,815 \pm 0,109 (100)	0,849 \pm 0,122 (100)	0,869 \pm 0,152 (100)
10^{-3} M	0,004 \pm 0,006 (0,490)**	0,007 \pm 0,001 (0,824)**	0,009 \pm 0,017 (1,035)**
10^{-4} M	0,112 \pm 0,027 (13,742)**	0,119 \pm 0,026 (14,016)**	0,129 \pm 0,027 (14,844)**
$7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,256 \pm 0,041 (31,411)**	0,266 \pm 0,050 (31,330)**	0,273 \pm 0,060 (31,415)**
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,356 \pm 0,060 (43,680)**	0,364 \pm 0,063 (42,873)**	0,388 \pm 0,043 (44,649)**
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,594 \pm 0,062 (72,883)**	0,600 \pm 0,073 (70,671)**	0,608 \pm 0,027 (69,965)**
10^{-5} M	0,621 \pm 0,090 (76,196)**	0,625 \pm 0,106 (73,616)**	0,657 \pm 0,101 (75,604)**
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,649 \pm 0,095 (79,631)**	0,663 \pm 0,110 (78,091)**	0,702 \pm 0,116 (80,782)**
$5 \cdot 10^{-6}$ M	0,715 \pm 0,119 (87,730)	0,721 \pm 0,122 (84,923)*	0,750 \pm 0,132 (86,306)*
$2,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,730 \pm 0,102 (89,570)	0,734 \pm 0,109 (86,454)*	0,754 \pm 0,109 (86,766)*
10^{-6} M	0,767 \pm 0,114 (94,110)	0,809 \pm 0,115 (95,288)	0,856 \pm 0,099 (98,504)
10^{-7} M	0,774 \pm 0,096 (94,969)	0,797 \pm 0,092 (93,875)	0,824 \pm 0,077 (94,821)
10^{-8} M	0,802 \pm 0,125 (98,404)	0,836 \pm 0,034 (98,468)	0,870 \pm 0,040 (100,115)

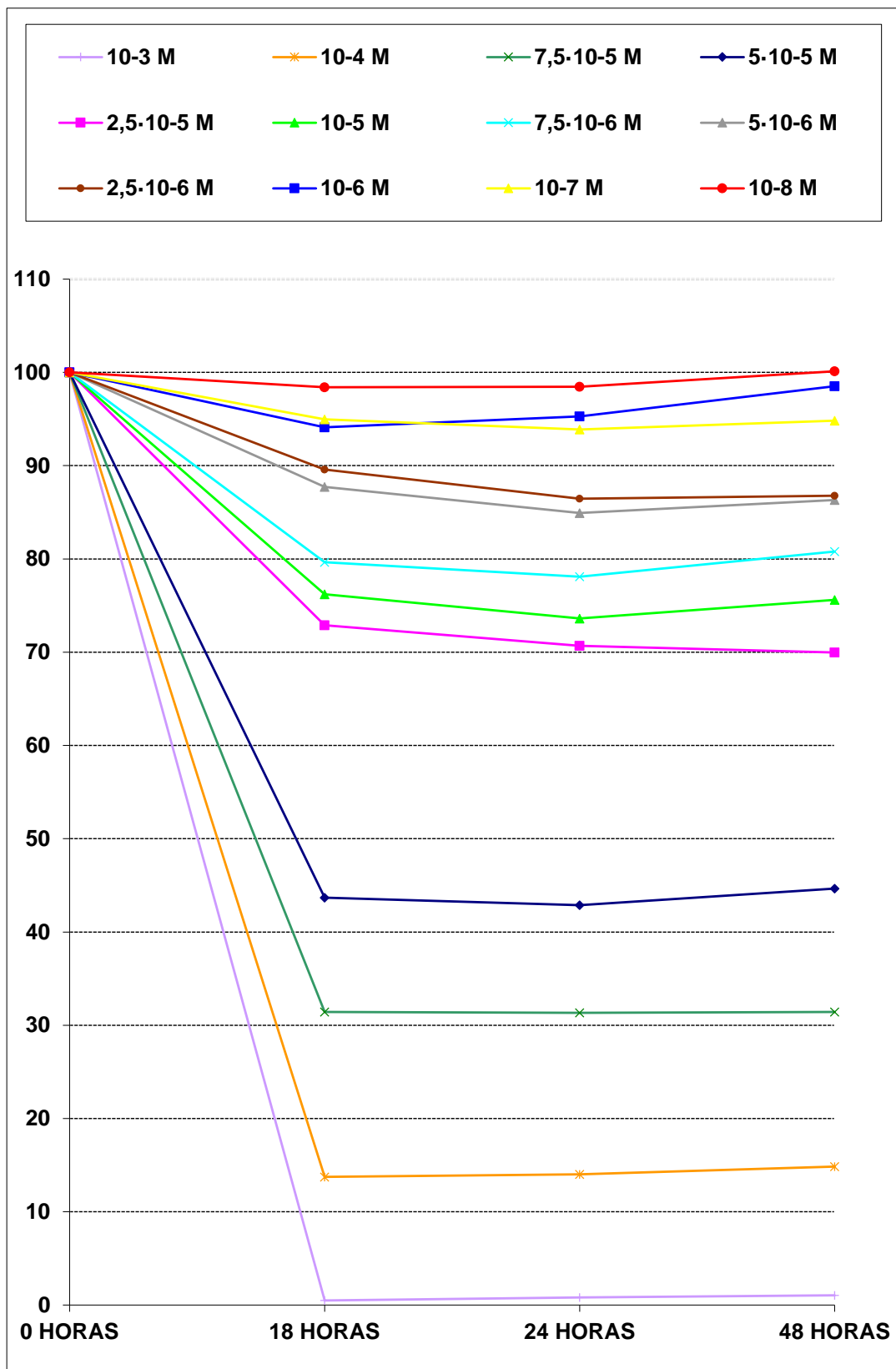


Figura 59. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con trifluoperazina. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

5.2.- EFECTO DEL DILTIAZEM SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 10 experimentos con concentraciones de DTZ entre 10^{-3} y 10^{-8} M. Las concentraciones de DTZ $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de sus controles a las 18 y 24 horas. Las concentraciones de DTZ $\geq 10^{-5}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de su control a las 48 horas. Las DI_{50} se fueron superiores a 10^{-4} M en todos los tiempos del estudio, con unos valores de $1,063 \cdot 10^{-4}$ M, $1,086 \cdot 10^{-4}$ M y $1,051 \cdot 10^{-4}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de DTZ $\leq 10^{-6}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 35 y figura 60).

Tabla 35. Proliferación fibroblástica *in vitro* con diltiazem a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

DTZ PROLIFERACIÓN	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL	0,759 \pm 0,011 (100)	0,776 \pm 0,013 (100)	0,810 \pm 0,015 (100)
10^{-3} M	0,021 \pm 0,019 (2,766)**	0,024 \pm 0,022 (3,092)**	0,028 \pm 0,028 (3,456)**
$5 \cdot 10^{-4}$ M	0,112 \pm 0,042 (14,756)**	0,126 \pm 0,040 (16,237)**	0,135 \pm 0,041 (16,666)**
10^{-4} M	0,479 \pm 0,066 (63,109)**	0,500 \pm 0,023 (64,432)**	0,503 \pm 0,041 (62,098)**
$7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,529 \pm 0,050 (69,696)**	0,534 \pm 0,048 (68,814)**	0,542 \pm 0,051 (66,913)**
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,625 \pm 0,017 (82,345)**	0,631 \pm 0,019 (81,314)**	0,659 \pm 0,021 (81,358)**
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,693 \pm 0,071 (91,304)*	0,705 \pm 0,071 (90,850)*	0,746 \pm 0,061 (92,098)*
10^{-5} M	0,718 \pm 0,022 (94,598)	0,732 \pm 0,017 (94,329)	0,764 \pm 0,075 (94,320)*
10^{-6} M	0,729 \pm 0,077 (96,047)	0,740 \pm 0,028 (95,360)	0,762 \pm 0,021 (94,074)
10^{-7} M	0,752 \pm 0,056 (99,077)	0,767 \pm 0,047 (98,840)	0,804 \pm 0,078 (99,259)
10^{-8} M	0,768 \pm 0,015 (101,185)	0,770 \pm 0,021 (99,226)	0,794 \pm 0,021 (98,024)

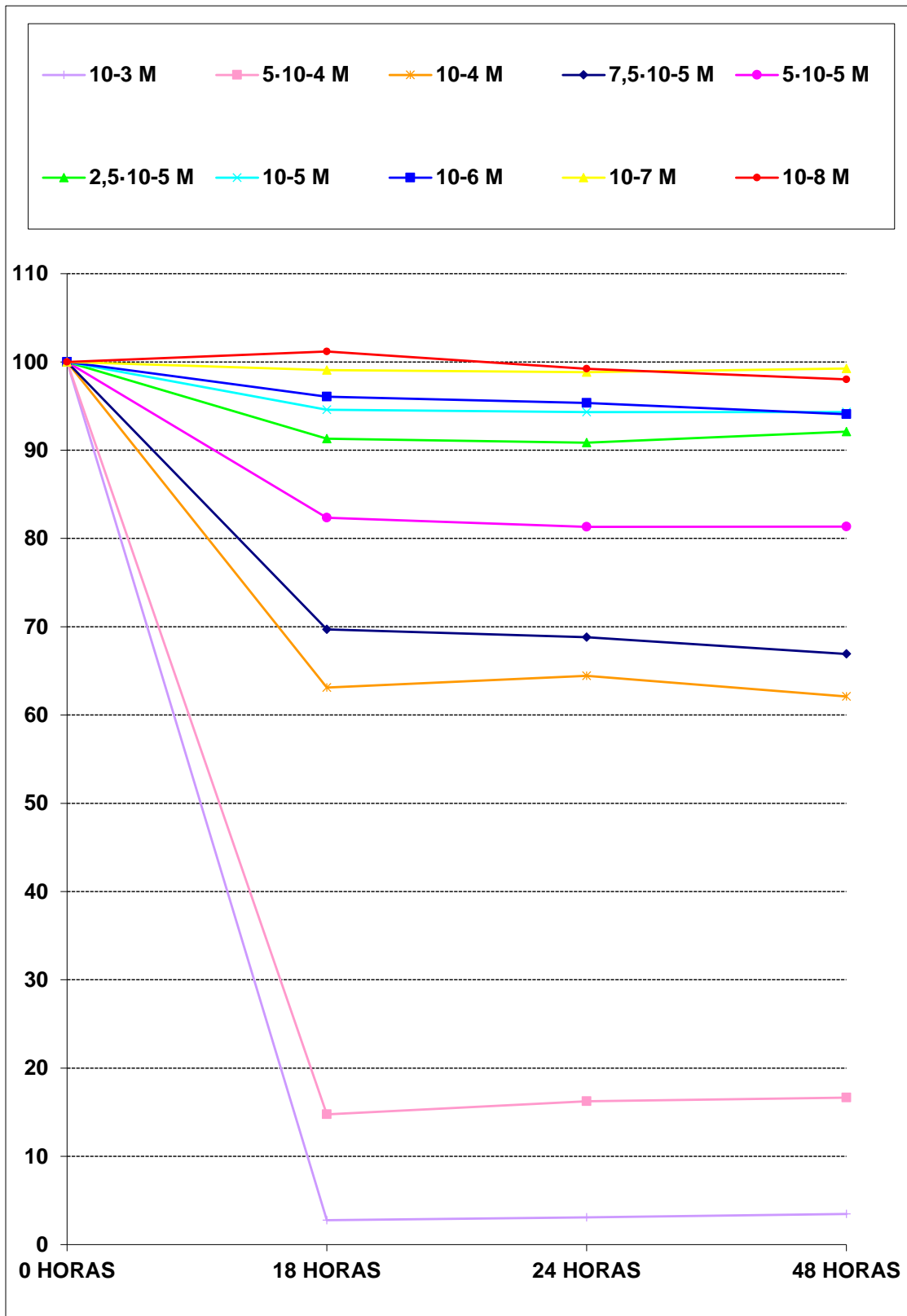


Figura 60. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con diltiazem. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

5.3.- EFECTO DEL VERAPAMILO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 12 experimentos con concentraciones de VPM entre 10^{-3} y 10^{-8} M. Las concentraciones de VPM $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de sus controles a las 18, 24 y 48 horas. Las DI_{50} se situaron en el rango 10^{-4} - $7,5 \cdot 10^{-5}$ M en todos los tiempos estudiados, con unos valores de $9,129 \cdot 10^{-5}$ M, $9,456 \cdot 10^{-5}$ M y $9,996 \cdot 10^{-5}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de VPM $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 36 y figura 61).

Tabla 36. Proliferación fibroblástica *in vitro* con verapamilo a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

VPM PROLIFERACIÓN	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL	0,533 \pm 0,086 (100)	0,536 \pm 0,084 (100)	0,545 \pm 0,085 (100)
10^{-3} M	0,014 \pm 0,011 (2,623)**	0,015 \pm 0,017 (2,795)**	0,018 \pm 0,013 (3,299)**
10^{-4} M	0,233 \pm 0,050 (43,714)**	0,238 \pm 0,072 (44,354)**	0,249 \pm 0,070 (45,639)**
$7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,341 \pm 0,031 (63,977)**	0,344 \pm 0,030 (64,179)**	0,354 \pm 0,040 (64,954)**
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,382 \pm 0,068 (71,591)*	0,408 \pm 0,073 (76,037)*	0,413 \pm 0,091 (75,699)**
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,424 \pm 0,047 (79,549)**	0,426 \pm 0,049 (79,477)**	0,442 \pm 0,061 (81,100)**
10^{-5} M	0,431 \pm 0,025 (80,863)**	0,432 \pm 0,041 (80,509)**	0,436 \pm 0,043 (80,000)**
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,440 \pm 0,033 (82,551)**	0,446 \pm 0,034 (83,208)**	0,451 \pm 0,032 (82,752)**
$5 \cdot 10^{-6}$ M	0,475 \pm 0,035 (89,118)	0,476 \pm 0,040 (88,709)	0,483 \pm 0,041 (88,623)
$2,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,500 \pm 0,084 (93,808)	0,501 \pm 0,083 (93,369)	0,506 \pm 0,087 (92,844)
10^{-6} M	0,508 \pm 0,167 (95,309)	0,508 \pm 0,167 (94,673)	0,529 \pm 0,169 (97,064)
10^{-7} M	0,504 \pm 0,075 (94,559)	0,518 \pm 0,083 (96,641)	0,533 \pm 0,133 (97,798)
10^{-8} M	0,501 \pm 0,035 (93,894)	0,535 \pm 0,043 (99,705)	0,539 \pm 0,026 (98,899)

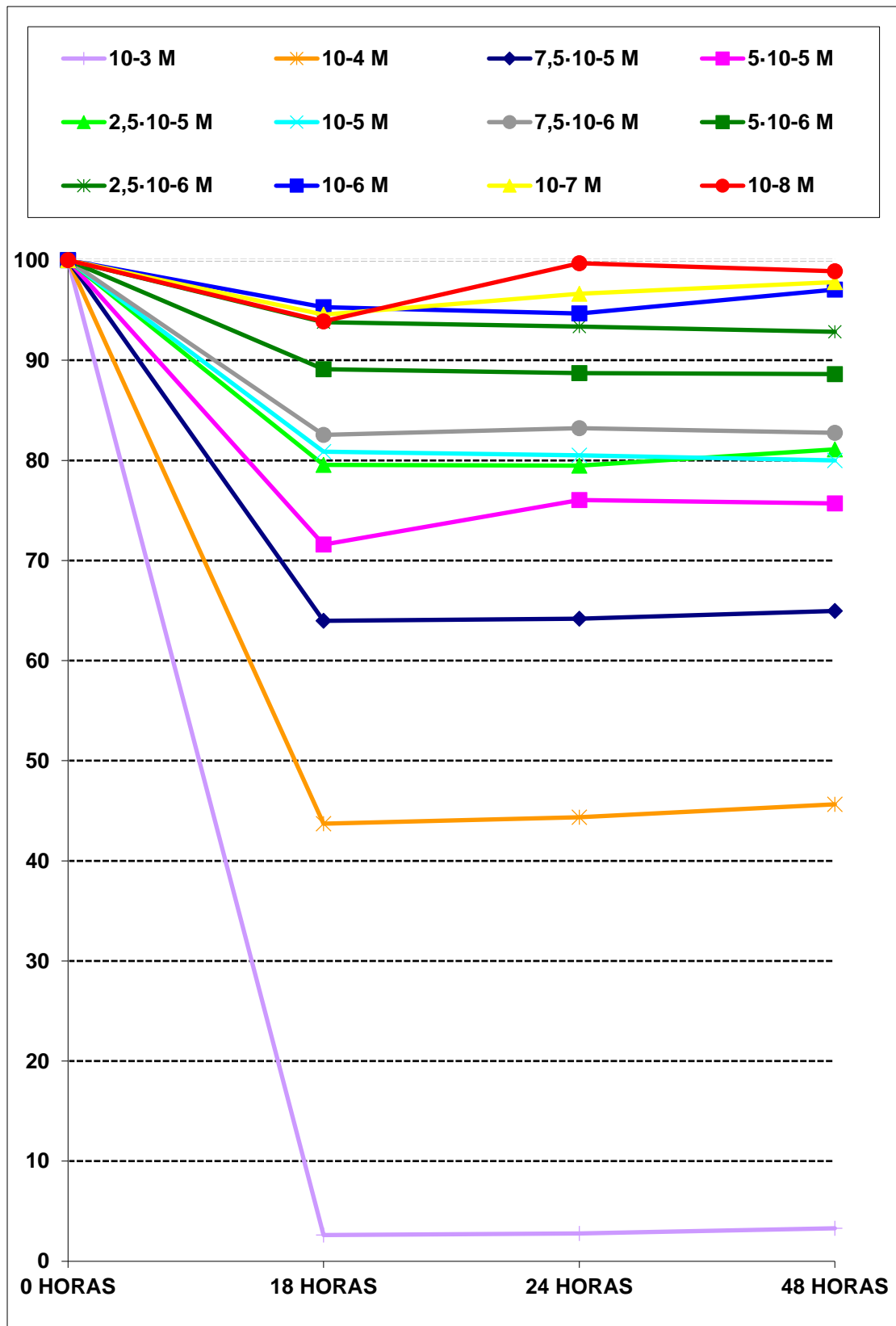


Figura 61. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con verapamil. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

5.4.- EFECTO DEL MIBEFRADIL SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 11 experimentos con concentraciones de MBF entre 10^{-3} y 10^{-8} M. Las concentraciones de MBF $\geq 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de su control a las 18, 24 y 48 horas. Las DI_{50} se situaron en el rango 10^{-5} - $7,5 \cdot 10^{-6}$ M en todos los tiempos del estudio, con unos valores de $9,377 \cdot 10^{-6}$ M, $9,047 \cdot 10^{-6}$ M y $8,666 \cdot 10^{-6}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de MBF $\leq 7,5 \cdot 10^{-7}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 37 y figura 62).

Tabla 37. Proliferación fibroblástica *in vitro* con mibefradil a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

MBF PROLIFERACIÓN	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL	0,636 \pm 0,110 (100)	0,648 \pm 0,100 (100)	0,670 \pm 0,081 (100)
10^{-3} M	0,036 \pm 0,008 (5,660)**	0,039 \pm 0,008 (6,018)**	0,040 \pm 0,009 (5,970)**
10^{-4} M	0,114 \pm 0,010 (17,942)**	0,117 \pm 0,009 (18,055)**	0,119 \pm 0,009 (17,761)**
10^{-5} M	0,302 \pm 0,057 (47,484)**	0,307 \pm 0,058 (47,376)**	0,310 \pm 0,059 (46,268)**
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,331 \pm 0,021 (52,044)**	0,337 \pm 0,021 (52,006)**	0,340 \pm 0,020 (50,746)**
$5 \cdot 10^{-6}$ M	0,332 \pm 0,038 (52,201)**	0,336 \pm 0,035 (51,851)**	0,341 \pm 0,035 (50,895)**
$2,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,428 \pm 0,076 (67,295)**	0,433 \pm 0,075 (66,820)**	0,439 \pm 0,073 (65,522)**
10^{-6} M	0,433 \pm 0,100 (68,081)**	0,440 \pm 0,100 (67,091)**	0,445 \pm 0,098 (66,417)**
$7,5 \cdot 10^{-7}$ M	0,582 \pm 0,112 (91,509)	0,589 \pm 0,110 (90,895)	0,590 \pm 0,110 (88,059)
$5 \cdot 10^{-7}$ M	0,556 \pm 0,083 (87,421)	0,562 \pm 0,083 (86,728)	0,614 \pm 0,047 (91,641)
10^{-7} M	0,585 \pm 0,092 (91,981)	0,588 \pm 0,092 (90,740)	0,621 \pm 0,075 (92,689)
10^{-8} M	0,635 \pm 0,041 (99,842)	0,639 \pm 0,043 (98,611)	0,657 \pm 0,039 (98,059)

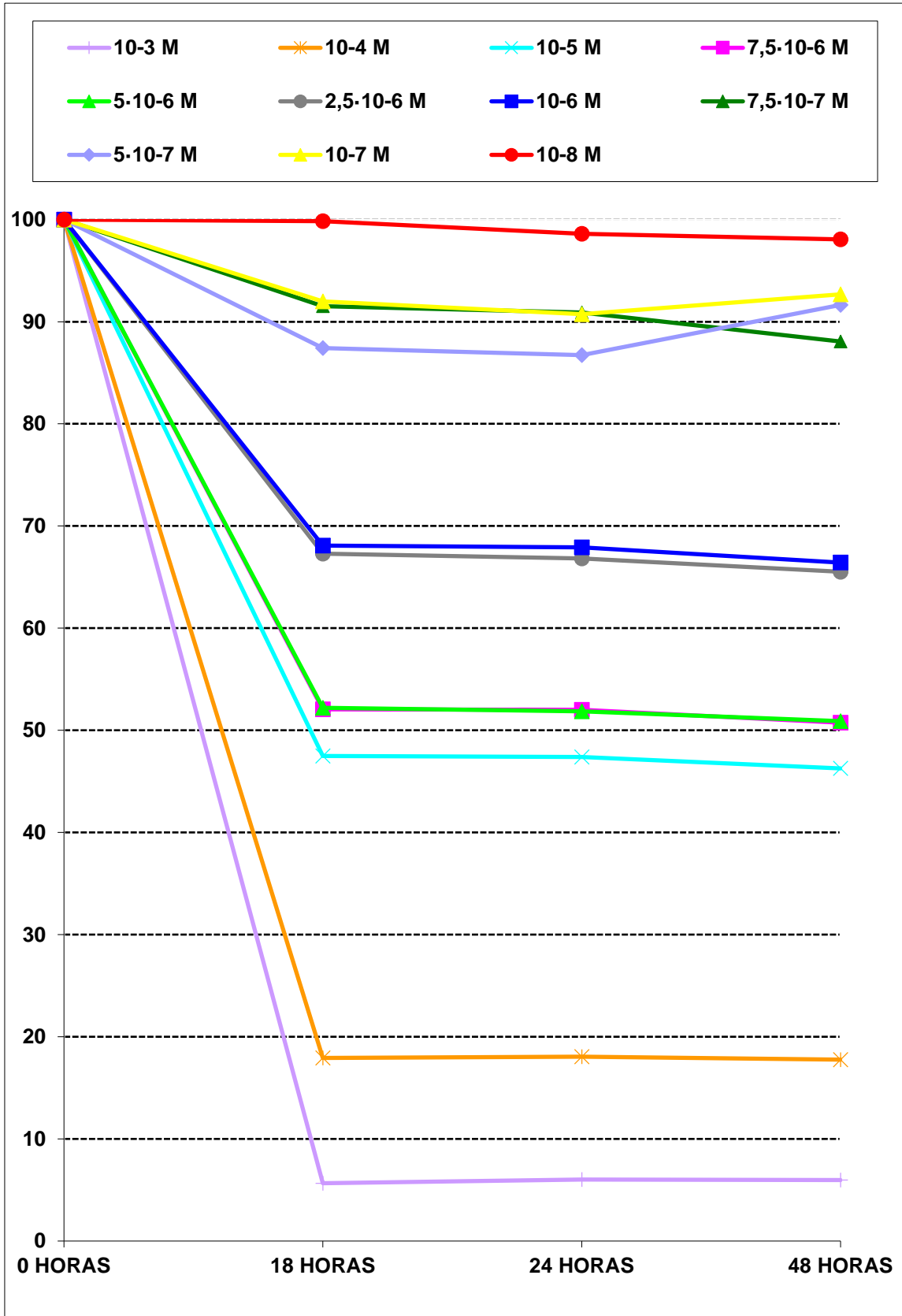


Figura 62. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con mibefradil. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

5.5.- EFECTO DEL NICARDIPINO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 9 experimentos con concentraciones de NIC entre 10^{-4} y 10^{-8} M. Las concentraciones de NIC $\geq 10^{-5}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de su control a las 18 horas. Las concentraciones de NIC $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de sus controles a las 24 y 48 horas. Las DI_{50} se situaron en el rango $7,5 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ M en todos los tiempos del estudio, con unos valores de $5,040 \cdot 10^{-5}$ M, $5,018 \cdot 10^{-5}$ M y $5,782 \cdot 10^{-5}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de NIC $\leq 10^{-6}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 38 y figura 63).

No existieron diferencias significativas entre la proliferación de los controles con etanol (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M), ni entre éstos y el control carente de etanol (tabla 38).

Tabla 38. Proliferación fibroblástica *in vitro* con nicardipino a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIC PROLIFERACIÓN	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL SIN ETANOL	0,415 \pm 0,106	0,441 \pm 0,092	0,461 \pm 0,088
CONTROL- 10^{-4} M	0,426 \pm 0,046 (100)	0,443 \pm 0,067 (100)	0,459 \pm 0,065 (100)
10^{-4} M	0,035 \pm 0,008 (8,215)**	0,039 \pm 0,009 (8,803)**	0,042 \pm 0,011 (9,150)**
CONTROL- $7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,422 \pm 0,076 (100)	0,456 \pm 0,087 (100)	0,474 \pm 0,092 (100)
$7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,095 \pm 0,015 (22,511)**	0,100 \pm 0,018 (21,929)**	0,109 \pm 0,016 (22,995)**
CONTROL- $5 \cdot 10^{-5}$ M	0,452 \pm 0,035 (100)	0,457 \pm 0,051 (100)	0,479 \pm 0,050 (100)
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,230 \pm 0,022 (50,884)**	0,250 \pm 0,016 (54,704)**	0,267 \pm 0,017 (55,741)**
CONTROL- $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,436 \pm 0,052 (100)	0,464 \pm 0,069 (100)	0,471 \pm 0,049 (100)
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,318 \pm 0,016 (72,935)**	0,325 \pm 0,015 (70,043)**	0,341 \pm 0,015 (72,399)**
CONTROL- 10^{-5} M	0,443 \pm 0,058 (100)	0,465 \pm 0,068 (100)	0,477 \pm 0,067 (100)
10^{-5} M	0,375 \pm 0,065 (84,650)*	0,405 \pm 0,051 (87,096)*	0,413 \pm 0,062 (86,582)*
CONTROL- $7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,433 \pm 0,067 (100)	0,455 \pm 0,069 (100)	0,481 \pm 0,065 (100)
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,396 \pm 0,059 (91,454)	0,403 \pm 0,063 (88,571)*	0,433 \pm 0,052 (90,020)*
CONTROL- 10^{-6} M	0,437 \pm 0,066 (100)	0,455 \pm 0,071 (100)	0,478 \pm 0,073 (100)
10^{-6} M	0,424 \pm 0,042 (97,025)	0,454 \pm 0,041 (99,780)	0,464 \pm 0,028 (97,071)
CONTROL- 10^{-7} M	0,417 \pm 0,107 (100)	0,440 \pm 0,092 (100)	0,462 \pm 0,089 (100)
10^{-7} M	0,433 \pm 0,045 (103,836)	0,440 \pm 0,059 (100,000)	0,446 \pm 0,065 (96,536)
CONTROL- 10^{-8} M	0,440 \pm 0,063 (100)	0,465 \pm 0,091 (100)	0,479 \pm 0,092 (100)
10^{-8} M	0,453 \pm 0,044 (102,954)	0,460 \pm 0,053 (99,924)	0,462 \pm 0,093 (96,450)

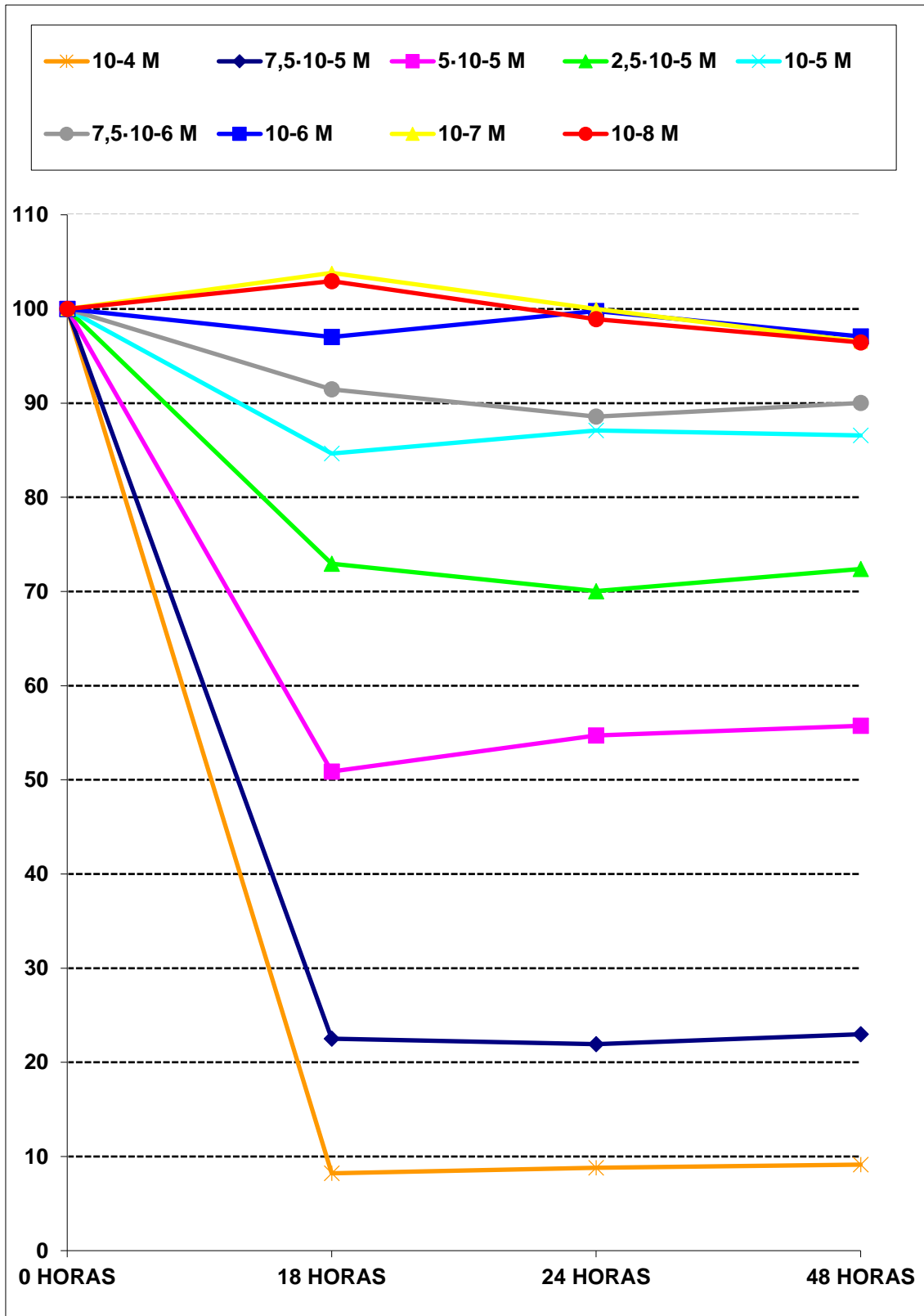


Figura 63. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con nifedipino. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

5.6.- EFECTO DEL NIFEDIPINO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 8 experimentos con concentraciones de NIF entre 10^{-4} y 10^{-8} M. Las concentraciones de NIF $\geq 10^{-5}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de sus controles a las 18, 24 y 48 horas. Las DI_{50} presentaron unos valores de $4,580 \cdot 10^{-4}$ M, $5,004 \cdot 10^{-4}$ M y $3,811 \cdot 10^{-4}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de NIF $\leq 10^{-6}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 39 y figura 64).

Tabla 39. Proliferación fibroblástica *in vitro* con nifedipino a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIF PROLIFERACIÓN	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL 10^{-4} M	0,458 \pm 0,138 (100)	0,484 \pm 0,146 (100)	0,510 \pm 0,158 (100)
10^{-4} M	0,201 \pm 0,027 (43,886)**	0,202 \pm 0,031 (41,735)**	0,207 \pm 0,032 (40,588)**
CONTROL $7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,538 \pm 0,043 (100)	0,553 \pm 0,040 (100)	0,580 \pm 0,042 (100)
$7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,256 \pm 0,022 (47,583)**	0,261 \pm 0,022 (49,179)**	0,270 \pm 0,026 (46,551)**
CONTROL $5 \cdot 10^{-5}$ M	0,554 \pm 0,043 (100)	0,564 \pm 0,041 (100)	0,580 \pm 0,037 (100)
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,342 \pm 0,049 (61,732)**	0,361 \pm 0,037 (64,007)**	0,367 \pm 0,045 (63,275)**
CONTROL $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,515 \pm 0,035 (100)	0,524 \pm 0,032 (100)	0,580 \pm 0,040 (100)
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,464 \pm 0,021 (90,097)**	0,473 \pm 0,029 (90,267)**	0,475 \pm 0,026 (81,896)**
CONTROL 10^{-5} M	0,533 \pm 0,039 (100)	0,539 \pm 0,039 (100)	0,548 \pm 0,041 (100)
10^{-5} M	0,478 \pm 0,056 (89,681)**	0,499 \pm 0,051 (92,578)*	0,504 \pm 0,043 (91,970)*
CONTROL 10^{-6} M	0,528 \pm 0,058 (100)	0,547 \pm 0,061 (100)	0,580 \pm 0,045 (100)
10^{-6} M	0,506 \pm 0,092 (95,833)	0,508 \pm 0,117 (92,870)	0,580 \pm 0,045 (87,758)
CONTROL 10^{-7} M	0,562 \pm 0,045 (100)	0,577 \pm 0,045 (100)	0,591 \pm 0,048 (100)
10^{-7} M	0,556 \pm 0,078 (98,932)	0,562 \pm 0,097 (97,400)	0,566 \pm 0,048 (95,769)
CONTROL 10^{-8} M	0,564 \pm 0,078 (100)	0,566 \pm 0,085 (100)	0,581 \pm 0,052 (100)
10^{-8} M	0,542 \pm 0,082 (96,070)	0,555 \pm 0,083 (97,897)	0,587 \pm 0,060 (100,872)

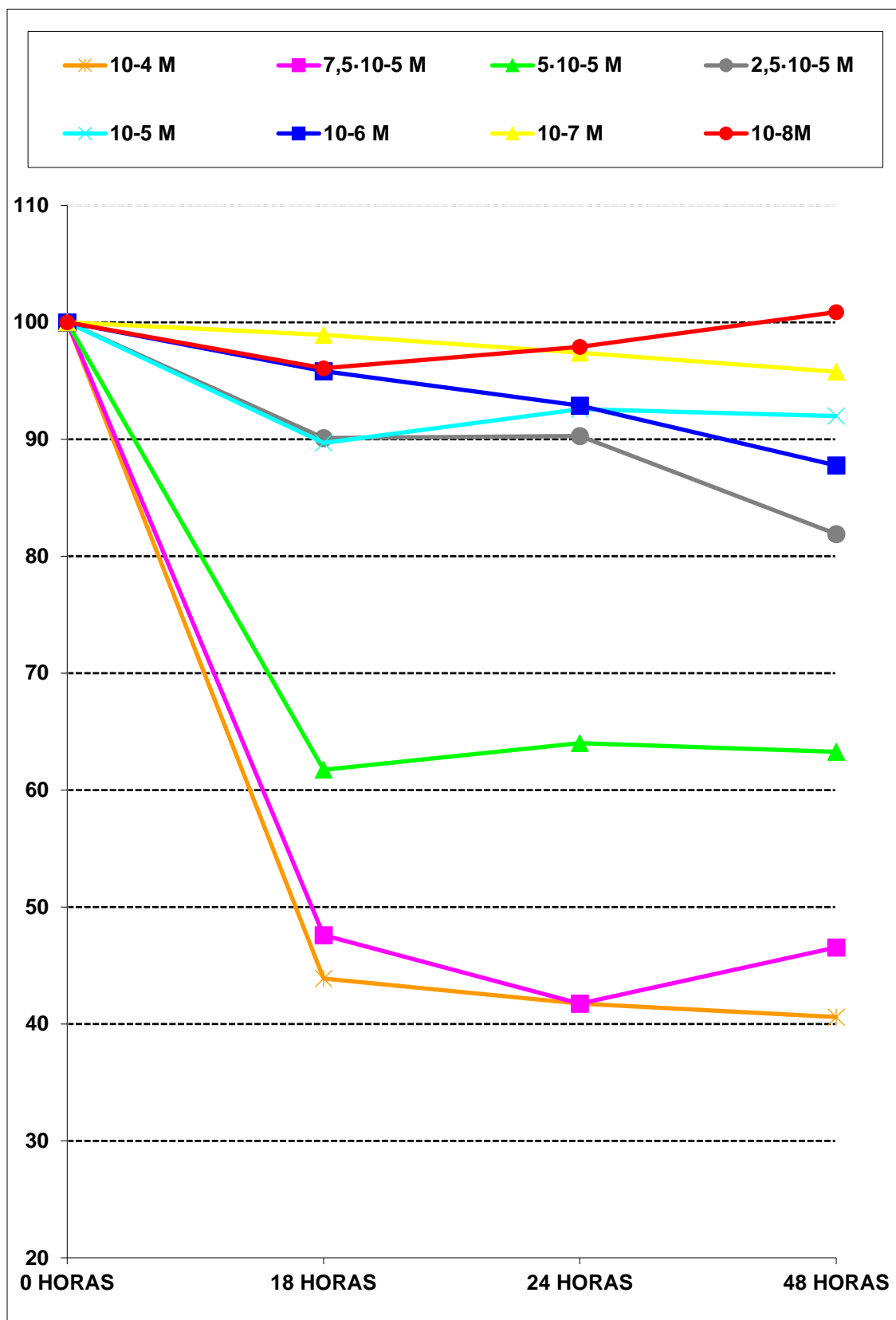


Figura 64. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con nifedipino. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

5.7.- EFECTO DEL NIMODIPINO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 9 experimentos con concentraciones de NIM entre 10^{-4} y 10^{-8} M. Las concentraciones de NIM $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de sus controles a las 18, 24 y 48 horas. Las DI_{50} fueron $2,058 \cdot 10^{-3}$ M, $2,100 \cdot 10^{-3}$ M y $2,376 \cdot 10^{-3}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de NIM $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 40 y figura 65).

Tabla 40. Proliferación fibroblástica *in vitro* con nimodipino a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIM PROLIFERACIÓN	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL 10^{-4} M	0,544 \pm 0,055 (100)	0,639 \pm 0,074 (100)	0,699 \pm 0,045 (100)
10^{-4} M	0,125 \pm 0,045 (22,977)**	0,125 \pm 0,040 (19,561)**	0,131 \pm 0,031 (18,741)**
CONTROL $5 \cdot 10^{-5}$ M	0,633 \pm 0,073 (100)	0,672 \pm 0,073 (100)	0,719 \pm 0,052 (100)
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,298 \pm 0,070 (47,077)**	0,326 \pm 0,071 (48,511)**	0,351 \pm 0,053 (48,817)**
CONTROL $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,624 \pm 0,062 (100)	0,673 \pm 0,065 (100)	0,717 \pm 0,061 (100)
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,504 \pm 0,040 (80,769)**	0,543 \pm 0,041 (80,683)**	0,594 \pm 0,058 (82,845)**
CONTROL 10^{-5} M	0,630 \pm 0,055 (100)	0,654 \pm 0,048 (100)	0,717 \pm 0,061 (100)
10^{-5} M	0,509 \pm 0,040 (80,793)**	0,527 \pm 0,095 (80,581)**	0,581 \pm 0,134 (81,032)*
CONTROL $7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,666 \pm 0,068 (100)	0,696 \pm 0,065 (100)	0,733 \pm 0,040 (100)
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,545 \pm 0,038 (81,831)**	0,554 \pm 0,042 (79,597)**	0,602 \pm 0,101 (82,128)*
CONTROL $5 \cdot 10^{-6}$ M	0,660 \pm 0,043 (100)	0,687 \pm 0,063 (100)	0,731 \pm 0,053 (100)
$5 \cdot 10^{-6}$ M	0,658 \pm 0,071 (99,696)	0,676 \pm 0,073 (98,398)	0,723 \pm 0,066 (98,905)
CONTROL 10^{-6} M	0,660 \pm 0,093 (100)	0,687 \pm 0,109 (100)	0,734 \pm 0,085 (100)
10^{-6} M	0,652 \pm 0,087 (98,787)	0,680 \pm 0,107 (98,981)	0,722 \pm 0,123 (98,365)
CONTROL 10^{-7} M	0,651 \pm 0,133 (100)	0,679 \pm 0,126 (100)	0,734 \pm 0,085 (100)
10^{-7} M	0,656 \pm 0,136 (100,768)	0,691 \pm 0,127 (101,767)	0,728 \pm 0,103 (99,182)
CONTROL 10^{-8} M	0,680 \pm 0,160 (100)	0,683 \pm 0,130 (100)	0,725 \pm 0,035 (100)
10^{-8} M	0,667 \pm 0,145 (98,088)	0,678 \pm 0,130 (99,267)	0,729 \pm 0,085 (100,551)

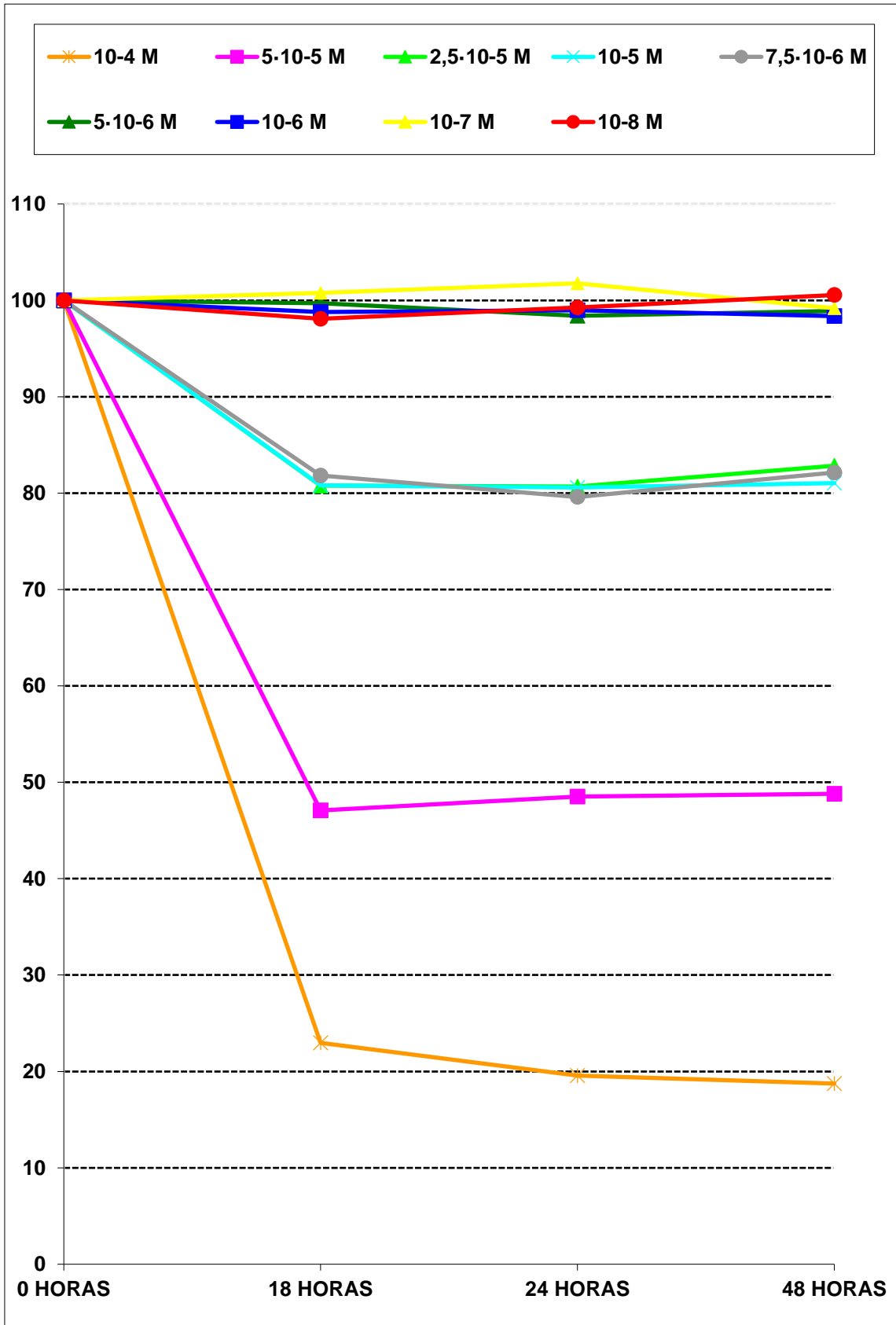


Figura 65. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con nimodipino. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

5.8.- EFECTO DEL NITRENDIPINO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 9 experimentos con concentraciones de NIT entre 10^{-4} y 10^{-8} M. Las concentraciones de NIT $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de sus controles a las 18 y 24 horas. Las concentraciones de NIT $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de su control a las 48 horas. Las DI_{50} fueron $1,303 \cdot 10^{-4}$ M, $1,564 \cdot 10^{-4}$ M y $2,266 \cdot 10^{-4}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de NIT $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 41 y figura 66).

Tabla 41. Proliferación fibroblástica *in vitro* con nitrendipino a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIT PROLIFERACIÓN	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL 10^{-4} M	0,625 \pm 0,093 (100)	0,651 \pm 0,097 (100)	0,681 \pm 0,090 (100)
10^{-4} M	0,079 \pm 0,044 (12,640)**	0,096 \pm 0,034 (14,746)**	0,142 \pm 0,073 (20,851)**
CONTROL $5 \cdot 10^{-5}$ M	0,623 \pm 0,093 (100)	0,646 \pm 0,084 (100)	0,709 \pm 0,060 (100)
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,263 \pm 0,041 (42,215)**	0,288 \pm 0,038 (44,582)**	0,325 \pm 0,032 (45,839)**
CONTROL $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,625 \pm 0,090 (100)	0,650 \pm 0,098 (100)	0,682 \pm 0,088 (100)
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,452 \pm 0,012 (72,320)**	0,462 \pm 0,023 (71,076)**	0,490 \pm 0,015 (71,847)**
CONTROL 10^{-5} M	0,643 \pm 0,117 (100)	0,670 \pm 0,119 (100)	0,716 \pm 0,104 (100)
10^{-5} M	0,559 \pm 0,046 (88,170)	0,588 \pm 0,052 (87,761)	0,626 \pm 0,040 (87,430)**
CONTROL $7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,636 \pm 0,145 (100)	0,695 \pm 0,269 (100)	0,701 \pm 0,151 (100)
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,557 \pm 0,118 (88,578)	0,584 \pm 0,122 (84,028)	0,610 \pm 0,176 (87,018)*
CONTROL $5 \cdot 10^{-6}$ M	0,638 \pm 0,085 (100)	0,660 \pm 0,081 (100)	0,710 \pm 0,076 (100)
$5 \cdot 10^{-6}$ M	0,621 \pm 0,090 (97,335)	0,642 \pm 0,105 (97,272)	0,690 \pm 0,098 (97,183)
CONTROL 10^{-6} M	0,636 \pm 0,087 (100)	0,650 \pm 0,096 (100)	0,697 \pm 0,089 (100)
10^{-6} M	0,613 \pm 0,092 (96,383)	0,647 \pm 0,104 (99,538)	0,582 \pm 0,094 (97,847)
CONTROL 10^{-7} M	0,623 \pm 0,106 (100)	0,661 \pm 0,090 (100)	0,707 \pm 0,085 (100)
10^{-7} M	0,619 \pm 0,114 (99,357)	0,657 \pm 0,102 (99,394)	0,685 \pm 0,094 (96,888)
CONTROL 10^{-8} M	0,649 \pm 0,185 (100)	0,664 \pm 0,141 (100)	0,696 \pm 0,083 (100)
10^{-8} M	0,653 \pm 0,134 (100,616)	0,659 \pm 0,137 (99,246)	0,699 \pm 0,121 (100,431)

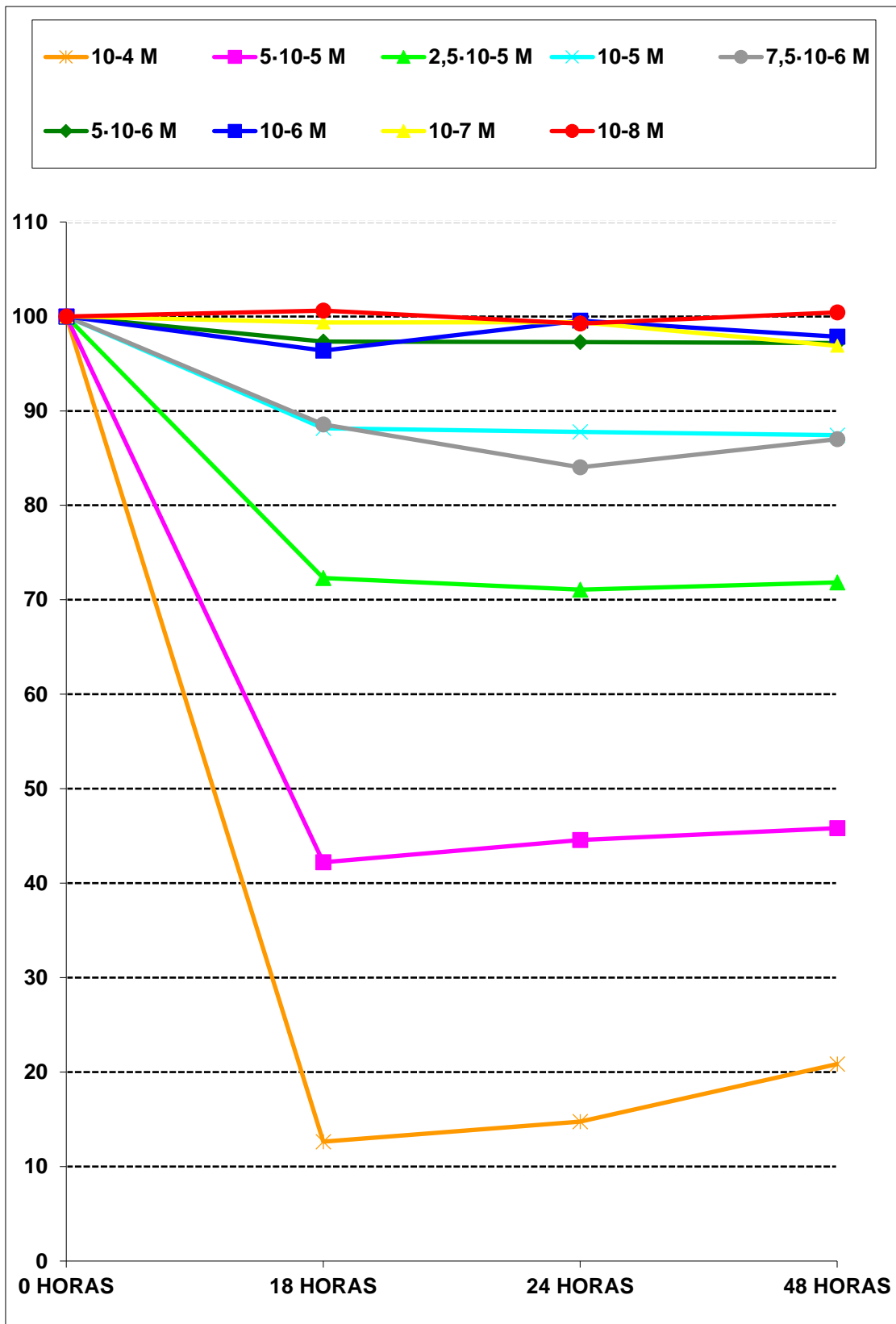


Figura 66. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con nitrendipino. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

5.9.- EFECTO DEL NISOLDIPINO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Fueron realizados 10 experimentos con concentraciones de NIS entre 10^{-4} y 10^{-8} M. Las concentraciones de NIS $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la proliferación celular respecto a la de sus controles a las 18, 24 y 48 horas. Las DI_{50} fueron $2,316 \cdot 10^{-3}$ M, $2,451 \cdot 10^{-3}$ M y $2,180 \cdot 10^{-3}$ M a las 18, 24 y 48 horas respectivamente. Las concentraciones de NIS $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una actividad proliferativa similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 42 y figura 67).

Tabla 42. Proliferación fibroblástica *in vitro* con nisoldipino a las 18, 24 y 48 horas. Valores de absorbancia: media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C).

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIS PROLIFERACION	18 HORAS X \pm DT (%C)	24 HORAS X \pm DT (%C)	48 HORAS X \pm DT (%C)
CONTROL 10^{-4} M	0,489 \pm 0,066	0,523 \pm 0,052	0,556 \pm 0,040
10^{-4} M	0,242 \pm 0,012 (49,488)**	0,250 \pm 0,011 (47,801)**	0,254 \pm 0,011 (45,683)**
CONTROL $7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,478 \pm 0,052	0,494 \pm 0,049	0,509 \pm 0,044
$7,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,233 \pm 0,017 (48,744)**	0,240 \pm 0,016 (48,582)**	0,248 \pm 0,017 (48,722)**
CONTROL $5 \cdot 10^{-5}$ M	0,521 \pm 0,062	0,538 \pm 0,066	0,564 \pm 0,055
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,414 \pm 0,030 (79,462)**	0,441 \pm 0,018 (81,970)**	0,451 \pm 0,016 (79,964)**
CONTROL $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,530 \pm 0,039	0,546 \pm 0,036	0,562 \pm 0,039
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,403 \pm 0,054 (76,037)**	0,408 \pm 0,054 (74,725)**	0,417 \pm 0,056 (74,199)**
CONTROL 10^{-5} M	0,479 \pm 0,058	0,501 \pm 0,070	0,507 \pm 0,050
10^{-5} M	0,429 \pm 0,032 (89,561)*	0,438 \pm 0,026 (87,425)*	0,444 \pm 0,021 (87,573)**
CONTROL $7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,534 \pm 0,056	0,550 \pm 0,061	0,559 \pm 0,061
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,478 \pm 0,041 (89,513)*	0,489 \pm 0,051 (88,909)*	0,500 \pm 0,072 (89,445)*
CONTROL $5 \cdot 10^{-6}$ M	0,508 \pm 0,063	0,521 \pm 0,075	0,554 \pm 0,053
$5 \cdot 10^{-6}$ M	0,492 \pm 0,078 (96,850)	0,508 \pm 0,072 (97,504)	0,519 \pm 0,73 (93,682)
CONTROL 10^{-6} M	0,502 \pm 0,054	0,517 \pm 0,055	0,535 \pm 0,053
10^{-6} M	0,521 \pm 0,083 (103,784)	0,523 \pm 0,081 (101,160)	0,543 \pm 0,079 (101,495)
CONTROL 10^{-7} M	0,510 \pm 0,059	0,545 \pm 0,058	0,564 \pm 0,045
10^{-7} M	0,511 \pm 0,057 (100,980)	0,529 \pm 0,064 (97,064)	0,544 \pm 0,052 (96,453)
CONTROL 10^{-8} M	0,528 \pm 0,056	0,549 \pm 0,074	0,554 \pm 0,071
10^{-8} M	0,525 \pm 0,046 (99,431)	0,537 \pm 0,047 (97,814)	0,547 \pm 0,039 (98,736)

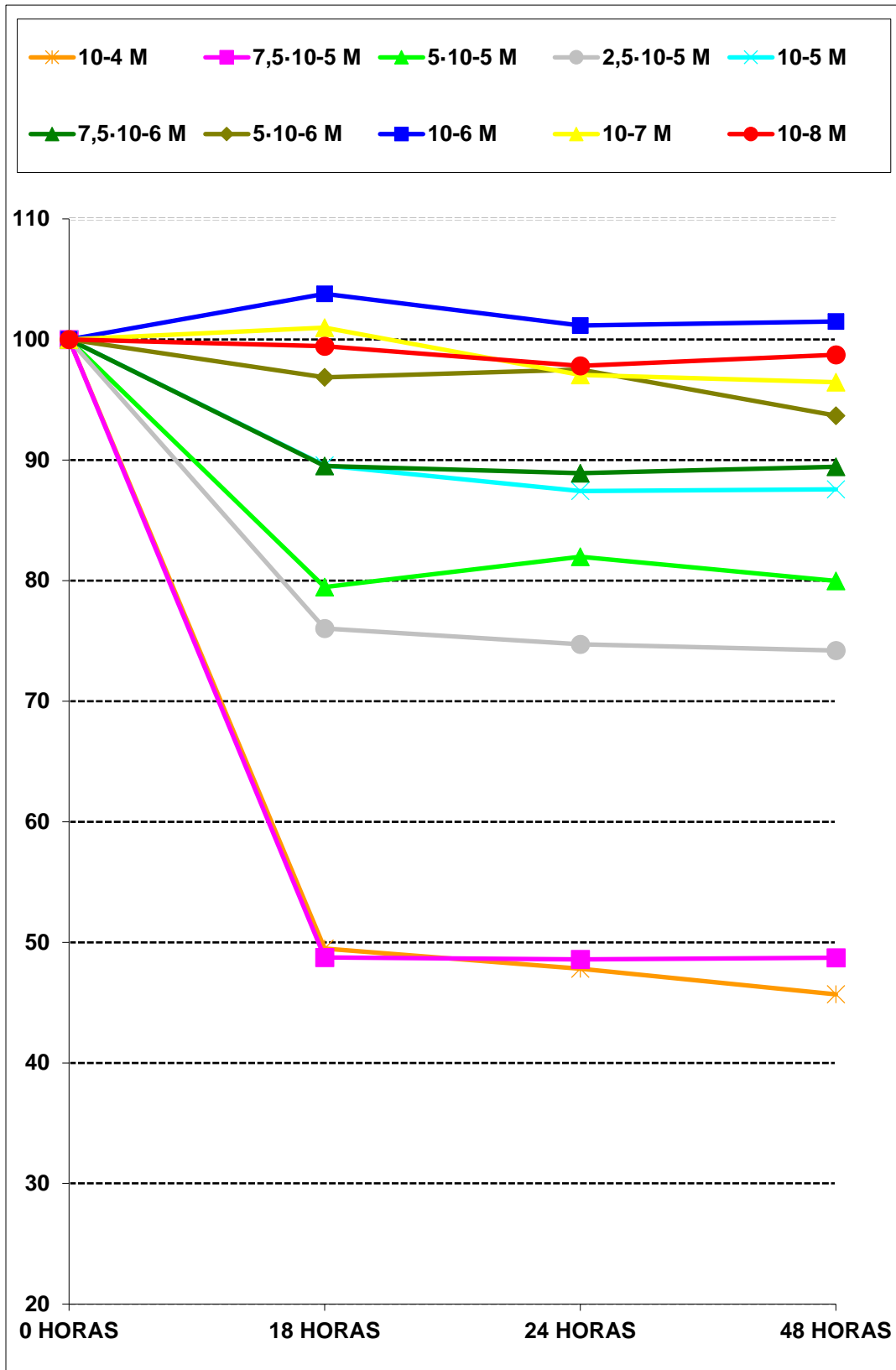


Figura 67. Evolución de la proliferación fibroblástica *in vitro* con nisoldipino. Los valores expresan el porcentaje relativo de la proliferación respecto al control a las 18, 24 y 48 horas.

6.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR *IN VITRO*.

La capacidad de los distintos fármacos para inhibir la adhesividad celular a la placa de cultivo tras 24 horas de incubación se evaluó mediante el test espectrofotométrico WST-1. Se utilizaron las mismas concentraciones que en los experimentos de proliferación celular para todos los fármacos.

6.1.- EFECTO DE LA TRIFLUOPERAZINA SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Las concentraciones de TFP $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la adhesividad celular respecto a la de su control a las 24 horas. La DI_{50} fue $1,289 \cdot 10^{-5}$ M. Las concentraciones de TFP $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una adhesividad similar a la del control en todos los momentos del estudio (tabla 43 y figura 68).

6.2.- EFECTO DEL DILTIAZEM SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Las concentraciones de DTZ $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M produjeron una reducción significativa de la adhesividad celular respecto a la de su control a las 24 horas. La DI_{50} fue $8,322 \cdot 10^{-5}$ M. Las concentraciones de DTZ $\leq 10^{-5}$ M presentaron una adhesividad similar a la del control en todos los momentos del estudio (tabla 44 y figura 69).

6.3.- EFECTO DEL VERAPAMILO SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Las concentraciones de VPM $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M produjeron una reducción significativa de la adhesividad celular respecto a la de su control a las 24 horas. La DI_{50} fue $5,248 \cdot 10^{-5}$ M. Las concentraciones de VPM $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una adhesividad similar a la del control en todos los momentos del estudio (tabla 45 y figura 70).

6.4.- EFECTO DEL MIBEFRADIL SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Concentraciones de MBF $\geq 5 \cdot 10^{-7}$ M produjeron una reducción significativa de la adhesividad celular respecto a la de su control a las 24 horas. La DI_{50} fue $4,307 \cdot 10^{-6}$ M. Concentraciones de MBF $\leq 10^{-7}$ M presentaron una adhesividad similar a la del control en todos los momentos del estudio (tabla 46 y figura 71).

6.5.- EFECTO DEL NICARDIPINO SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Las concentraciones de NIC $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M redujeron significativamente la adhesividad celular respecto a la de sus controles a las 24 horas. La DI_{50} fue $1,525 \cdot 10^{-5}$ M. Las concentraciones de NIC $\leq 10^{-6}$ M presentaron una adhesividad similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 47 y figura 72). No existieron diferencias significativas entre la adhesividad de los controles con etanol (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M), ni entre éstos y el control carente de etanol (tabla 46).

6.6.- EFECTO DEL NIFEDIPINO SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Las concentraciones de NIF $\geq 10^{-5}$ M redujeron significativamente la adhesividad celular respecto a la de sus controles a las 24 horas. La DI_{50} fue $2,218 \cdot 10^{-5}$ M. Las concentraciones de NIF $\leq 10^{-6}$ M presentaron una adhesividad similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 48 y figura 73).

6.7.- EFECTO DEL NIMODIPINO SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Las concentraciones de NIM $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M redujeron significativamente la adhesividad celular respecto a la de sus controles a las 24 horas. La DI_{50} fue $7,485 \cdot 10^{-5}$ M. Las concentraciones de NIM $\leq 5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una adhesividad similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 49 y figura 74).

6.8.- EFECTO DEL NITRENDIPINO SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Concentraciones de NIT $\geq 5 \cdot 10^{-6}$ M redujeron significativamente la adhesividad celular respecto a la de sus controles a las 24 horas. La DI_{50} fue $6,069 \cdot 10^{-5}$ M. Concentraciones de NIT $\leq 10^{-6}$ M presentaron una adhesividad similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 50 y figura 75).

6.9.- EFECTO DEL NISOLDIPINO SOBRE LA ADHESIVIDAD CELULAR.

Las concentraciones de NIS $\geq 5 \cdot 10^{-6}$ M redujeron significativamente la adhesividad celular respecto a la de sus controles a las 24 horas. La DI_{50} fue $3,265 \cdot 10^{-4}$ M. Las concentraciones de NIS $\leq 10^{-6}$ M presentaron una adhesividad similar a la de sus controles en todos los momentos del estudio (tabla 51 y figura 76).

7.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR *IN VITRO*.

El efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular se evaluó con el test WST-1 y mediante recuento celular con tinción de azul tripán (figura 77). Se utilizaron las mismas concentraciones que en los experimentos de proliferación celular para todos los fármacos.

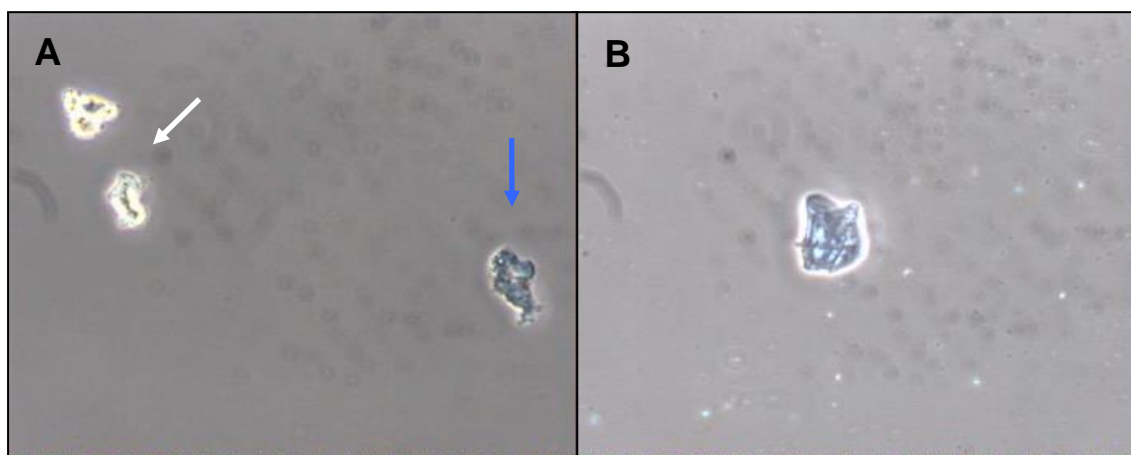


Figura 77. Estudio de viabilidad celular con tinción de azul tripán. A: Se aprecian dos células viables (flecha blanca) y una célula no viable (flecha azul) teñida de azul (10X). B: Célula no viable teñida de azul (20X). Microscopía de inversión de fases.

7.1.- EFECTO DE LA TRIFLUOPERAZINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Con WST-1 las concentraciones de TFP $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M redujeron significativamente la viabilidad celular respecto al control, con una DI_{50} de $2,498 \cdot 10^{-4}$ M. Las concentraciones de TFP $\leq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M no se acompañaron de una reducción significativa de la viabilidad celular. Con tinción de azul tripán el número de fibroblastos teñidos (no viables) fue significativamente superior respecto al control en concentraciones de TFP $\geq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M. La DI_{50} fue $7,127 \cdot 10^{-3}$ M (tabla 43 y figura 68).

7.2.- EFECTO DEL DILTIAZEM SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Con WST-1 las concentraciones de DTZ $\geq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M redujeron significativamente la viabilidad celular respecto al control, con una DI_{50} de $4,047 \cdot 10^{-4}$ M. Las concentraciones de DTZ $\leq 5 \cdot 10^{-5}$ M no se acompañaron de una reducción significativa de la viabilidad celular. Con tinción de azul tripán el número de fibroblastos no viables fue significativamente superior respecto a los del control en concentraciones de DTZ $\geq 10^{-4}$ M. La DI_{50} fue $7,226 \cdot 10^{-3}$ M (tabla 44 y figura 69).

7.3.- EFECTO DEL VERAPAMILO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Con WST-1 las concentraciones de VPM $\geq 10^{-4}$ M redujeron significativamente la viabilidad celular respecto al control. La DI_{50} fue $2,824 \cdot 10^{-4}$ M. Las concentraciones de VPM $\leq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M, no se acompañaron de una reducción significativa de la viabilidad celular. Con tinción de azul tripán el número de fibroblastos no viables fue significativamente superior con las concentraciones de VPM $\geq 10^{-4}$ M. Las concentraciones de VPM $\leq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M, no se acompañaron de una reducción significativa de la viabilidad celular. La DI_{50} fue $2,245 \cdot 10^{-3}$ M (tabla 45 y figura 70).

7.4.- EFECTO DEL MIBEFRADIL SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Con WST-1 las concentraciones de MBF $\geq 10^{-5}$ M redujeron significativamente la viabilidad celular respecto al control, con una DI_{50} de $1,188 \cdot 10^{-4}$ M. Las concentraciones de MBF $\leq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M no se acompañaron de una reducción significativa de la viabilidad celular. Con tinción de azul tripán el número de fibroblastos no viables fue significativamente superior respecto a los del control con las concentraciones de MBF $\geq 10^{-4}$ M. La DI_{50} fue $1,285 \cdot 10^{-3}$ M (tabla 46 y figura 71).

7.5.- EFECTO DEL NICARDIPINO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Con WST-1 las concentraciones de NIC $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M redujeron significativamente la viabilidad celular respecto a la de los controles, con una DI_{50} de $1,018 \cdot 10^{-4}$ M. Las concentraciones de NIC $\leq 10^{-5}$ M no se acompañaron de una reducción significativa de la viabilidad celular. Con tinción de azul tripán el número de fibroblastos no viables fue significativamente superior respecto a los de los controles con las concentraciones de NIC $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M. La DI_{50} fue $1,107 \cdot 10^{-3}$ M (tabla 47 y figura 72). No existieron diferencias significativas entre la viabilidad de los controles con etanol (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M), ni entre éstos y el control carente de etanol con ninguno de los dos métodos (tabla 47).

7.6.- EFECTO DEL NIFEDIPINO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Tanto con WST-1 como con tinción de azul tripán las concentraciones de NIF $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M mostraron una reducción significativa de la viabilidad celular con respecto a los controles. Con WST-1 la DI_{50} fue $3,278 \cdot 10^{-4}$ M y con tinción de azul tripán $4,788 \cdot 10^{-4}$ M. Las concentraciones de NIF $\leq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M no presentaron evidencia de una reducción

significativa de la viabilidad celular con ninguno de los dos métodos (tabla 48 y figura 73).

7.7.- EFECTO DEL NIMODIPINO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Con WST-1 las concentraciones de NIM $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M redujeron significativamente la viabilidad celular respecto a la de los controles, con una DI_{50} de $2,803 \cdot 10^{-3}$ M. Las concentraciones de NIM $\leq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M no se acompañaron de una reducción significativa de la viabilidad celular. Con tinción de azul tripán el número de fibroblastos no viables fue significativamente superior respecto a los de los controles con las concentraciones de NIM $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M. La DI_{50} fue $5,430 \cdot 10^{-3}$ M (tabla 49 y figura 74).

7.8.- EFECTO DEL NITRENDIPINO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Con WST-1 NIT $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M mostraron una reducción significativa de la viabilidad celular con respecto a los controles, con una DI_{50} de $3,342 \cdot 10^{-4}$ M. Las concentraciones de NIT $\leq 10^{-5}$ M no presentaron evidencia de una reducción significativa de la viabilidad celular. Con tinción de azul tripán las concentraciones de NIT $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M mostraron una reducción significativa de la viabilidad celular con respecto a los controles. La DI_{50} fue $2,321 \cdot 10^{-3}$ M (tabla 50 y figura 75).

7.9.- EFECTO DEL NISOLDIPINO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Con WST-1 las concentraciones de NIS $\geq 10^{-5}$ M redujeron significativamente la viabilidad celular respecto a la de los controles, con una DI_{50} de $5,751 \cdot 10^{-3}$ M. Las concentraciones de NIS $\leq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M no se acompañaron de una reducción significativa de la viabilidad celular. Con tinción de azul tripán el número de fibroblastos no viables fue significativamente superior respecto a los de los controles con las concentraciones de NIS $\geq 10^{-5}$ M. La DI_{50} fue $7,277 \cdot 10^{-3}$ M (tabla 51 y figura 76).

Tabla 43. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con trifluoperazina. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

TFP DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		WST-1	
	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C
CONTROL	0,392 \pm 0,081	100	97,58 \pm 3,20	100	0,155 \pm 0,013	100
10 ⁻³ M	0,003 \pm 0,004**	0,765	21,33 \pm 7,45**	21,858	0,001 \pm 0,002**	0,645
10 ⁻⁴ M	0,113 \pm 0,028**	28,826	44,25 \pm 2,96**	45,347	0,021 \pm 0,004**	13,548
7,5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,237 \pm 0,042**	60,459	85,83 \pm 2,41**	87,958	0,022 \pm 0,016**	14,193
5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,289 \pm 0,043**	73,724	96,92 \pm 1,38	99,323	0,030 \pm 0,015**	19,354
2,5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,386 \pm 0,045	98,469	96,58 \pm 1,93	98,975	0,075 \pm 0,020**	48,387
10 ⁻⁵ M	0,388 \pm 0,038	98,979	94,25 \pm 6,88	96,587	0,111 \pm 0,015*	71,612
7,5 \cdot 10 ⁻⁶ M	0,367 \pm 0,043	93,622	95,67 \pm 3,34	98,042	0,115 \pm 0,048*	74,193
5 \cdot 10 ⁻⁶ M	0,362 \pm 0,048	92,346	97,42 \pm 3,18	99,836	0,125 \pm 0,047	80,645
2,5 \cdot 10 ⁻⁶ M	0,356 \pm 0,060	90,816	96,17 \pm 3,41	98,555	0,123 \pm 0,047	79,354
10 ⁻⁶ M	0,380 \pm 0,063	96,938	97,00 \pm 1,91	99,405	0,122 \pm 0,011	78,709
10 ⁻⁷ M	0,395 \pm 0,030	100,765	99,08 \pm 0,79	101,537	0,137 \pm 0,050	88,387
10 ⁻⁸ M	0,411 \pm 0,048	104,846	99,00 \pm 1,65	101,455	0,151 \pm 0,055	97,419

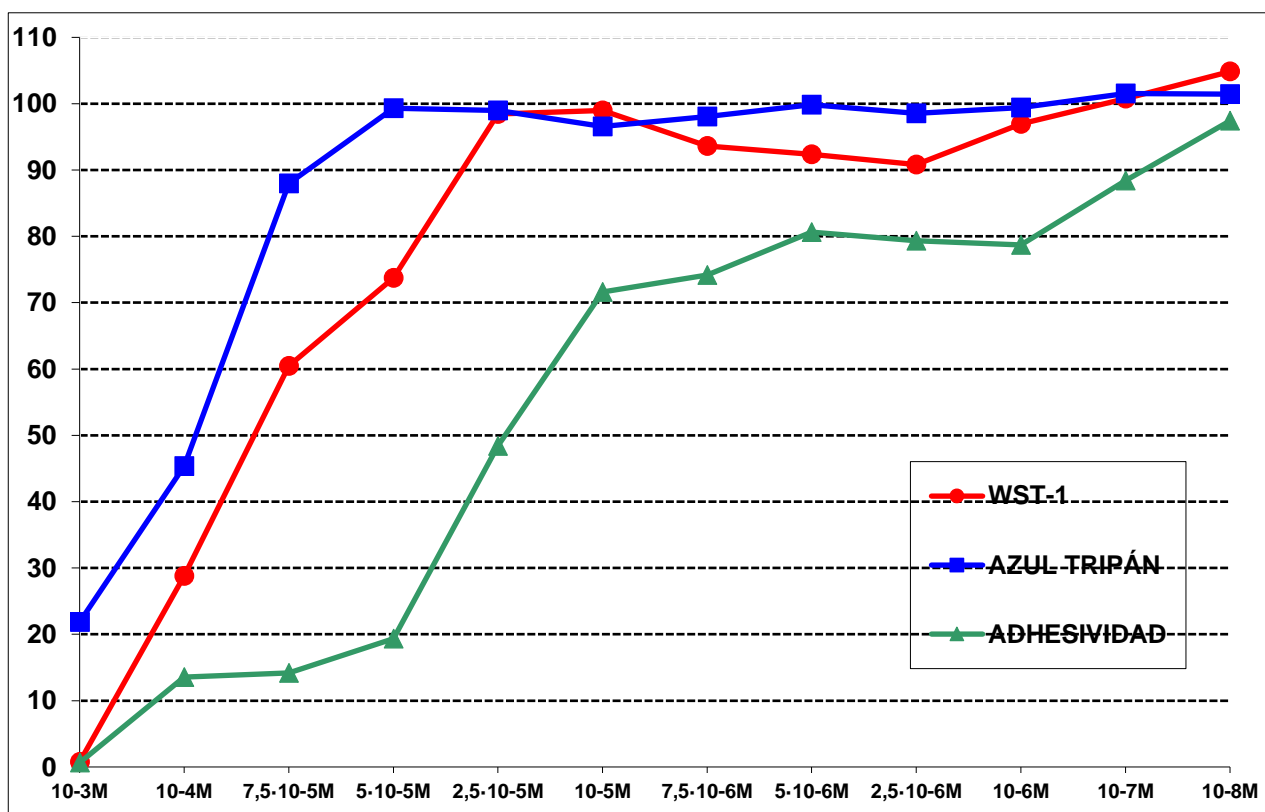


Figura 68. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con trifluoperazina a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control.

Tabla 44. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con diltiazem. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

DTZ DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		WST-1	
	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C
CONTROL	0,386 \pm 0,005	100	96,50 \pm 2,84	100	0,155 \pm 0,045	100
10 ⁻³ M	0,019 \pm 0,008**	4,922	24,67 \pm 8,02**	25,566	0,007 \pm 0,005**	4,516
5 · 10 ⁻⁴ M	0,087 \pm 0,034**	22,538	55,17 \pm 6,13**	57,170	0,034 \pm 0,008**	21,935
10 ⁻⁴ M	0,346 \pm 0,019**	89,637	82,08 \pm 8,50**	85,056	0,076 \pm 0,008**	49,032
7,5 · 10 ⁻⁵ M	0,345 \pm 0,010**	89,378	92,33 \pm 7,43	95,678	0,112 \pm 0,044*	72,258
5 · 10 ⁻⁵ M	0,362 \pm 0,009	93,782	92,67 \pm 5,42	96,031	0,108 \pm 0,031*	69,677
2,5 · 10 ⁻⁵ M	0,373 \pm 0,022	96,632	95,17 \pm 3,24	98,621	0,120 \pm 0,033*	77,419
10 ⁻⁵ M	0,383 \pm 0,007	99,222	88,40 \pm 27,71	91,606	0,130 \pm 0,070	83,870
10 ⁻⁶ M	0,384 \pm 0,012	99,481	98,25 \pm 1,42	101,813	0,153 \pm 0,083	98,709
10 ⁻⁷ M	0,391 \pm 0,039	101,295	97,92 \pm 1,88	101,471	0,166 \pm 0,109	107,096
10 ⁻⁸ M	0,396 \pm 0,009	102,590	98,50 \pm 1,62	102,072	0,157 \pm 0,059	101,290

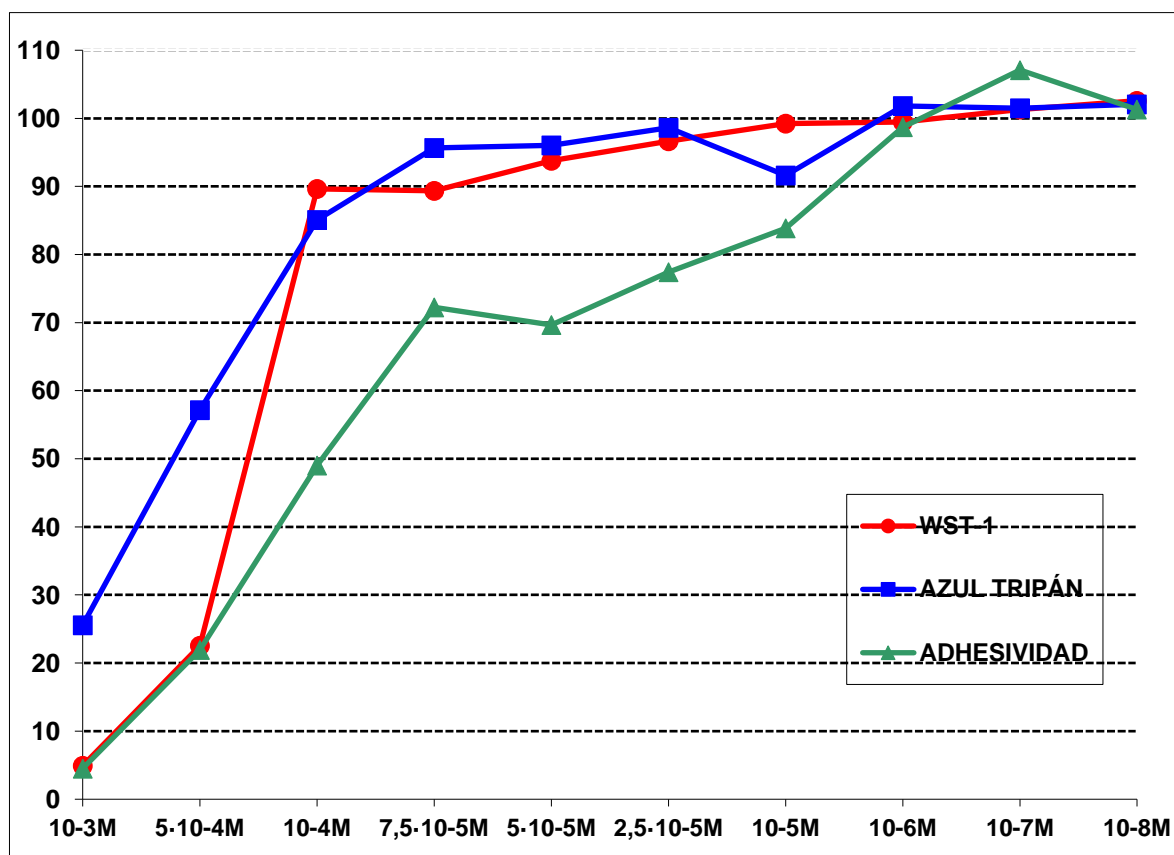


Figura 69. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con diltiazem a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control.

Tabla 45. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con verapamilo. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

VPM DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		WST-1	
	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C
CONTROL	0,314 \pm 0,029	100	98,58 \pm 1,68	100	0,155 \pm 0,013	100
10 ⁻³ M	0,010 \pm 0,004**	3,182	16,75 \pm 3,57**	20,206	0,001 \pm 0,001**	0,587
10 ⁻⁴ M	0,114 \pm 0,014**	36,286	60,08 \pm 8,98**	50,213	0,073 \pm 0,013**	42,878
7,5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,293 \pm 0,012	93,312	97,58 \pm 1,51	66,017	0,086 \pm 0,013**	50,588
5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,297 \pm 0,024	94,585	97,67 \pm 1,50	90,363	0,116 \pm 0,014**	68,235
2,5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,295 \pm 0,022	93,949	97,42 \pm 2,15	97,717	0,126 \pm 0,009**	74,117
10 ⁻⁵ M	0,293 \pm 0,022	93,312	97,67 \pm 2,23	99,076	0,124 \pm 0,017**	72,834
7,5 \cdot 10 ⁻⁶ M	0,305 \pm 0,020	97,081	96,75 \pm 3,39	97,382	0,140 \pm 0,009**	82,232
5 \cdot 10 ⁻⁶ M	0,288 \pm 0,039	91,670	97,17 \pm 2,04	98,569	0,148 \pm 0,007	86,930
2,5 \cdot 10 ⁻⁶ M	0,289 \pm 0,032	91,988	96,83 \pm 2,72	98,224	0,147 \pm 0,025	86,343
10 ⁻⁶ M	0,301 \pm 0,077	95,808	97,33 \pm 2,19	98,731	0,148 \pm 0,039	86,930
10 ⁻⁷ M	0,317 \pm 0,086	100,900	98,58 \pm 1,51	100,000	0,142 \pm 0,027	83,406
10 ⁻⁸ M	0,320 \pm 0,021	101,855	98,67 \pm 1,37	100,091	0,168 \pm 0,045	98,678

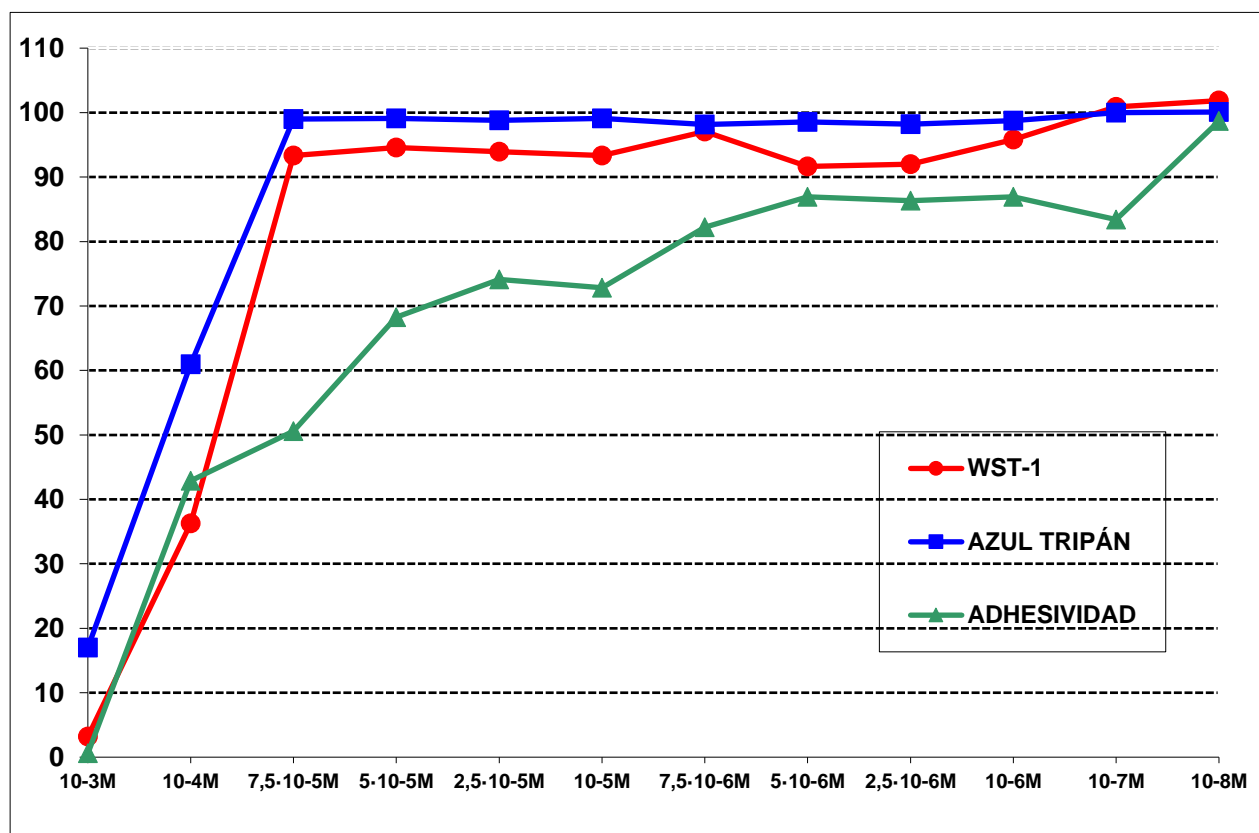


Figura 70. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con verapamilo a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control

Tabla 46. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con mibefradil. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

MBF DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS WST-1	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		X \pm DT	%C
	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C		
CONTROL	0,344 \pm 0,051	100	99,17 \pm 1,03	100	0,170 \pm 0,033	100
10 ⁻³ M	0,034 \pm 0,013**	9,883	21,25 \pm 7,16**	21,427	0,008 \pm 0,005**	4,698
10 ⁻⁴ M	0,113 \pm 0,006**	32,848	50,25 \pm 5,53**	50,670	0,025 \pm 0,014**	14,684
10 ⁻⁵ M	0,272 \pm 0,054**	79,069	98,00 \pm 1,76	98,820	0,066 \pm 0,017**	38,766
7,5 · 10 ⁻⁶ M	0,321 \pm 0,020	93,313	98,33 \pm 1,15	99,152	0,068 \pm 0,005**	39,941
5 · 10 ⁻⁶ M	0,317 \pm 0,031	92,151	98,17 \pm 1,34	98,991	0,070 \pm 0,005**	41,116
2,5 · 10 ⁻⁶ M	0,319 \pm 0,027	92,732	98,67 \pm 0,98	99,495	0,109 \pm 0,005**	64,023
10 ⁻⁶ M	0,320 \pm 0,023	93,023	98,42 \pm 1,24	99,243	0,111 \pm 0,019**	65,198
7,5 · 10 ⁻⁷ M	0,326 \pm 0,033	94,767	98,50 \pm 1,09	99,324	0,114 \pm 0,004**	66,960
5 · 10 ⁻⁷ M	0,318 \pm 0,031	92,441	96,83 \pm 4,53	97,640	0,134 \pm 0,022**	78,707
10 ⁻⁷ M	0,326 \pm 0,021	94,767	99,25 \pm 0,62	100,080	0,142 \pm 0,027	83,406
10 ⁻⁸ M	0,330 \pm 0,025	95,930	98,67 \pm 1,78	99,495	0,165 \pm 0,013	96,916

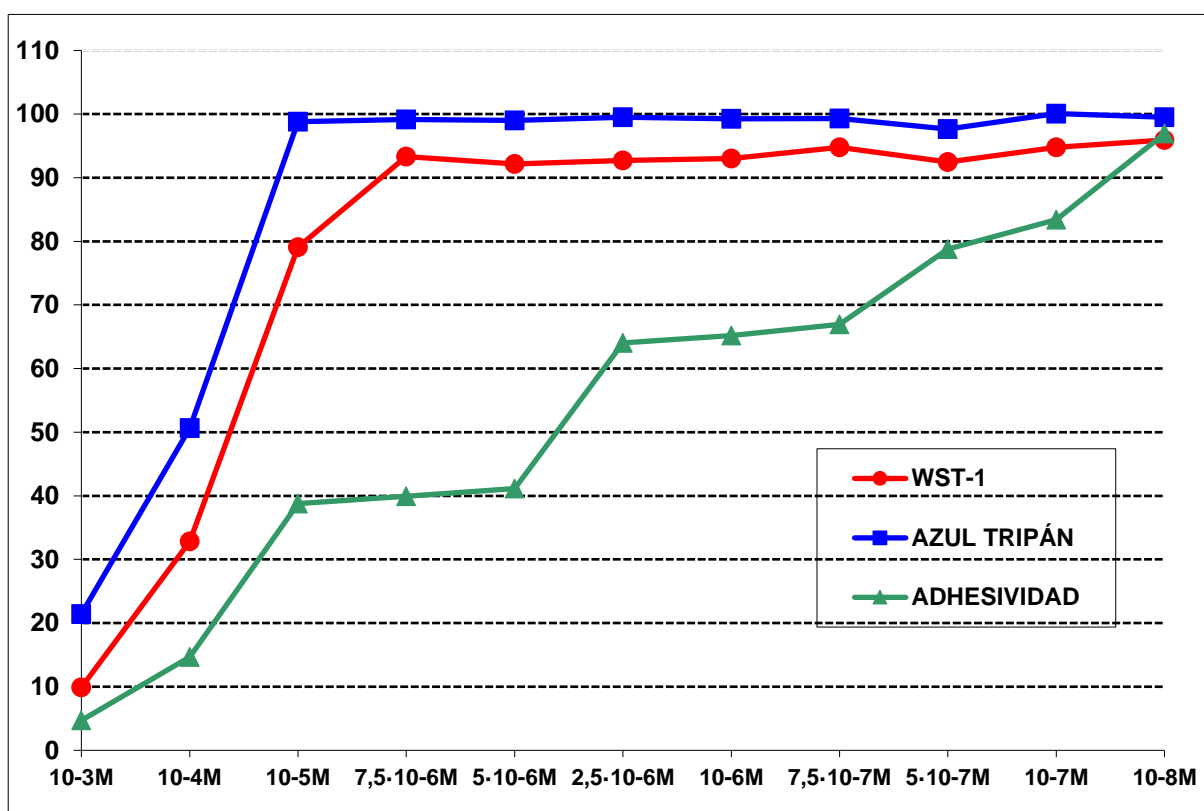


Figura 71. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con mibefradil a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control.

Tabla 47. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nicardipino. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIC DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS WST-1	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		X \pm DT	%C
	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C		
CONTROL SIN ETANOL	0,256 \pm 0,065	-	95,17 \pm 2,12	-	0,131 \pm 0,047	-
CONTROL-10 ⁻⁴ M	0,248 \pm 0,067	100	93,33 \pm 2,93	100	0,126 \pm 0,031	100
10 ⁻⁴ M	0,025 \pm 0,012**	10,080	35,67 \pm 3,77**	38,219	0,004 \pm 0,003**	3,147
CONTROL-7,5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,280 \pm 0,050	100	94,25 \pm 3,25	100	0,127 \pm 0,036	100
7,5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,083 \pm 0,013**	29,042	38,25 \pm 4,45**	40,583	0,028 \pm 0,009**	22,400
CONTROL-5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,276 \pm 0,050	100	93,67 \pm 5,30	100	0,120 \pm 0,044	100
5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,145 \pm 0,024**	52,536	60,25 \pm 9,55**	64,321	0,054 \pm 0,013**	43,200
CONTROL-2,5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,296 \pm 0,046	100	95,00 \pm 4,24	100	0,126 \pm 0,044	100
2,5 \cdot 10 ⁻⁵ M	0,218 \pm 0,016**	73,648	92,00 \pm 4,11	96,482	0,067 \pm 0,015**	53,600
CONTROL-10 ⁻⁵ M	0,266 \pm 0,037	100	97,00 \pm 2,56	100	0,129 \pm 0,049	100
10 ⁻⁵ M	0,265 \pm 0,028	99,624	95,50 \pm 3,66	98,453	0,088 \pm 0,046*	68,217
CONTROL-7,5 \cdot 10 ⁻⁶ M	0,266 \pm 0,037	100	96,50 \pm 2,91	100	0,126 \pm 0,037	100
7,5 \cdot 10 ⁻⁶ M	0,268 \pm 0,023	100,751	95,75 \pm 4,20	99,222	0,094 \pm 0,022*	74,603
CONTROL-10 ⁻⁶ M	0,262 \pm 0,051	100	94,58 \pm 3,42	100	0,125 \pm 0,033	100
10 ⁻⁶ M	0,277 \pm 0,022	105,725	94,58 \pm 3,17	101,765	0,105 \pm 0,021	84,000
CONTROL-10 ⁻⁷ M	0,255 \pm 0,065	100	95,92 \pm 1,88	100	0,119 \pm 0,034	100
10 ⁻⁷ M	0,277 \pm 0,037	108,627	96,25 \pm 2,38	100,344	0,117 \pm 0,051	98,319
CONTROL-10 ⁻⁸ M	0,285 \pm 0,026	100	96,75 \pm 3,25	100	0,127 \pm 0,048	100
10 ⁻⁸ M	0,286 \pm 0,042	100,350	97,92 \pm 1,88	101,209	0,123 \pm 0,058	96,850

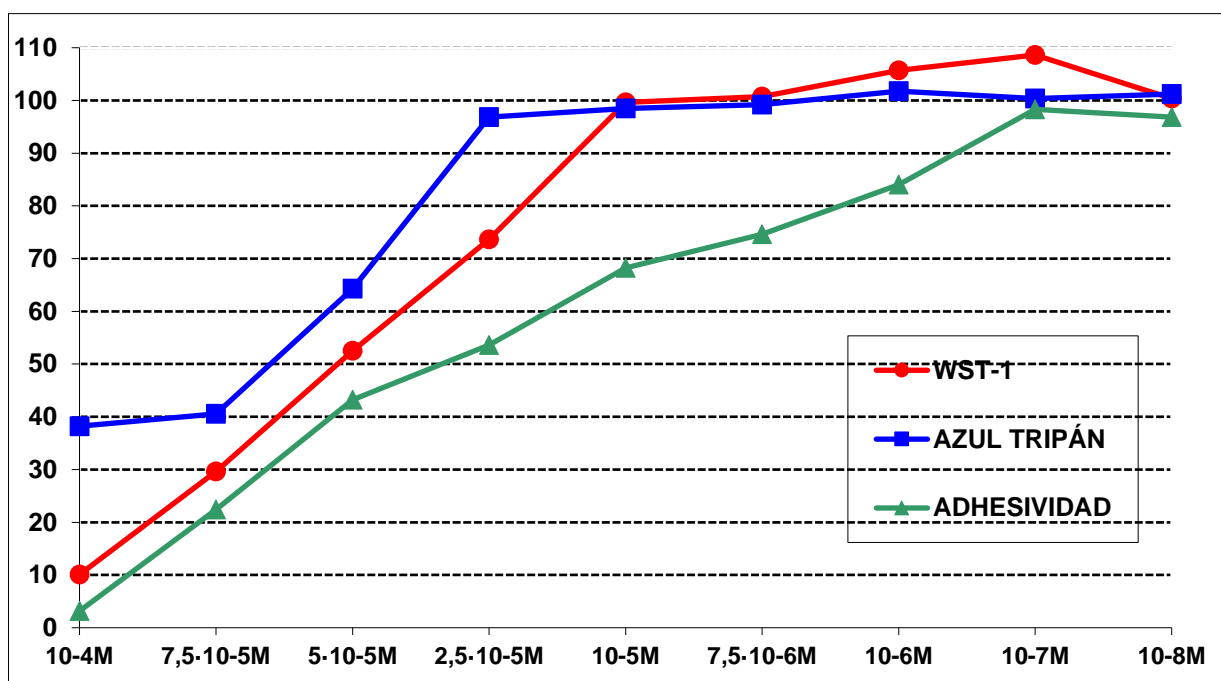


Figura 72. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nicardipino a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control.

Tabla 48. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nifedipino. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIF DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS WST-1	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		X \pm DT	%C
	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C		
CONTROL 10 ⁻⁴ M	0,259 \pm 0,102	100	89,42 \pm 11,81	100	0,157 \pm 0,024	100
10 ⁻⁴ M	0,074 \pm 0,007**	28,571	33,92 \pm 5,38**	37,933	0,049 \pm 0,034**	31,210
CONTROL 7,5·10 ⁻⁵ M	0,321 \pm 0,019	100	92,50 \pm 3,55	100	0,176 \pm 0,033	100
7,5 · 10 ⁻⁵ M	0,109 \pm 0,017**	33,956	36,17 \pm 4,84**	39,102	0,058 \pm 0,027**	32,954
CONTROL 5·10 ⁻⁵ M	0,316 \pm 0,023	100	94,83 \pm 2,29	100	0,180 \pm 0,052	100
5 · 10 ⁻⁵ M	0,219 \pm 0,024**	69,303	62,50 \pm 6,86**	65,907	0,084 \pm 0,011**	46,666
CONTROL 2,5·10 ⁻⁵ M	0,322 \pm 0,032	100	94,00 \pm 3,30	100	0,181 \pm 0,048	100
2,5 · 10 ⁻⁵ M	0,325 \pm 0,078	100,000	86,92 \pm 10,98	92,468	0,079 \pm 0,013**	43,646
CONTROL 10 ⁻⁵ M	0,316 \pm 0,039	100	92,33 \pm 5,91	100	0,170 \pm 0,040	100
10 ⁻⁵ M	0,299 \pm 0,023	94,620	92,92 \pm 5,05	100,639	0,100 \pm 0,012**	58,823
CONTROL 10 ⁻⁶ M	0,315 \pm 0,019	100	96,08 \pm 2,27	100	0,187 \pm 0,036	100
10 ⁻⁶ M	0,312 \pm 0,033	99,047	95,08 \pm 3,37	98,959	0,181 \pm 0,039	96,791
CONTROL 10 ⁻⁷ M	0,320 \pm 0,034	100	96,83 \pm 3,71	100	0,187 \pm 0,050	100
10 ⁻⁷ M	0,329 \pm 0,024	102,812	96,17 \pm 2,86	99,318	0,170 \pm 0,052	90,909
CONTROL 10 ⁻⁸ M	0,322 \pm 0,034	100	97,58 \pm 3,03	100	0,183 \pm 0,091	100
10 ⁻⁸ M	0,336 \pm 0,032	104,186	97,17 \pm 2,41	99,579	0,176 \pm 0,084	96,174

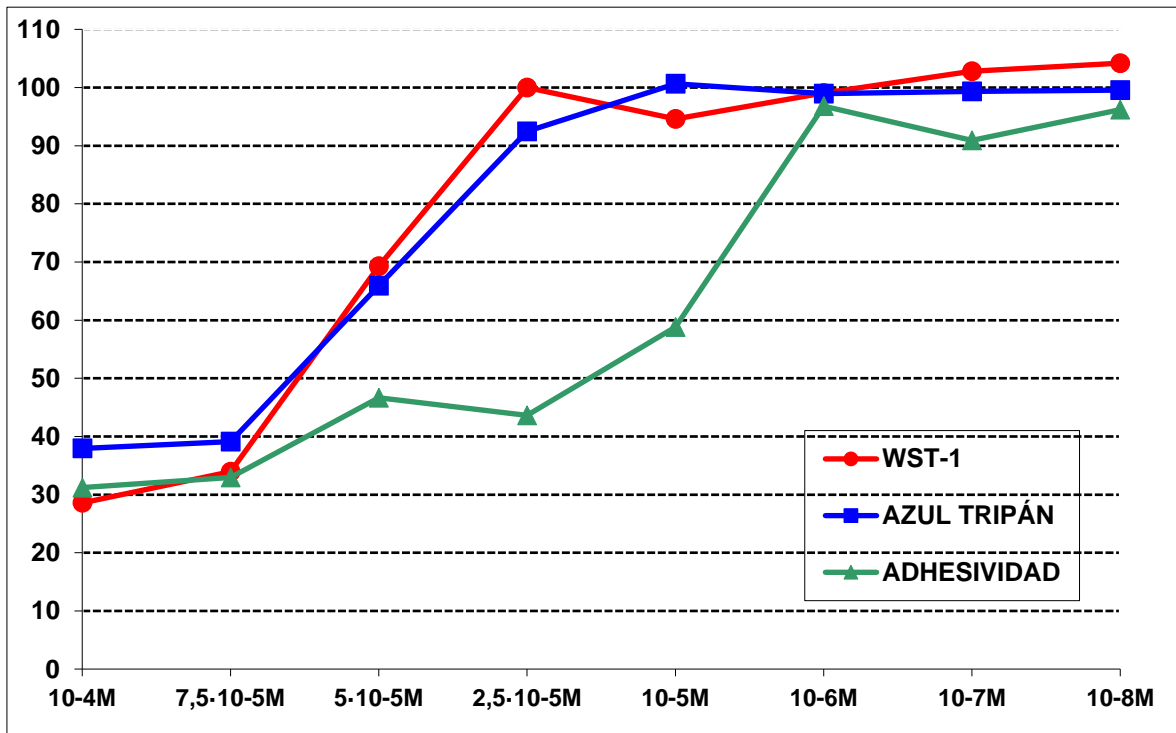


Figura 73. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nifedipino a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control.

Tabla 49. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nimodipino. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIM DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		WST-1	
	$\bar{X} \pm DT$	%C	$\bar{X} \pm DT$	%C	$\bar{X} \pm DT$	%C
CONTROL 10^{-4} M	0,361 \pm 0,067	100	91,75 \pm 6,18	100	0,119 \pm 0,013	100
10^{-4} M	0,091 \pm 0,027**	25,207	35,08 \pm 5,38**	38,234	0,005 \pm 0,007**	4,201
CONTROL $5 \cdot 10^{-5}$ M	0,381 \pm 0,041	100	93,42 \pm 3,85	100	0,135 \pm 0,013	100
$5 \cdot 10^{-5}$ M	0,210 \pm 0,055**	55,118	61,25 \pm 4,77**	65,564	0,056 \pm 0,017**	41,481
CONTROL $2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,403 \pm 0,029	100	95,25 \pm 2,56	100	0,144 \pm 0,021	100
$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	0,402 \pm 0,040	99,751	83,25 \pm 6,00**	87,401	0,097 \pm 0,012**	67,361
CONTROL 10^{-5} M	0,404 \pm 0,025	100	93,75 \pm 2,80	100	0,136 \pm 0,011	100
10^{-5} M	0,400 \pm 0,059	99,009	89,33 \pm 8,94	95,285	0,106 \pm 0,030**	77,941
CONTROL $7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,419 \pm 0,072	100	93,75 \pm 5,94	100	0,145 \pm 0,015	100
$7,5 \cdot 10^{-6}$ M	0,395 \pm 0,053	94,272	91,75 \pm 6,03	97,866	0,114 \pm 0,017**	78,620
CONTROL $5 \cdot 10^{-6}$ M	0,405 \pm 0,026	100	95,92 \pm 2,50	100	0,144 \pm 0,015	100
$5 \cdot 10^{-6}$ M	0,403 \pm 0,033	99,506	96,00 \pm 2,92	100,083	0,135 \pm 0,017	93,750
CONTROL 10^{-6} M	0,402 \pm 0,079	100	97,33 \pm 3,06	100	0,142 \pm 0,015	100
10^{-6} M	0,404 \pm 0,052	99,502	88,08 \pm 26,37	90,496	0,135 \pm 0,009	95,070
CONTROL 10^{-7} M	0,393 \pm 0,079	100	96,92 \pm 3,85	100	0,140 \pm 0,009	100
10^{-7} M	0,403 \pm 0,053	102,544	96,25 \pm 3,44	99,308	0,137 \pm 0,012	97,857
CONTROL 10^{-8} M	0,405 \pm 0,091	100	98,50 \pm 1,51	100	0,141 \pm 0,007	100
10^{-8} M	0,400 \pm 0,039	98,765	97,17 \pm 1,99	98,649	0,138 \pm 0,023	97,354

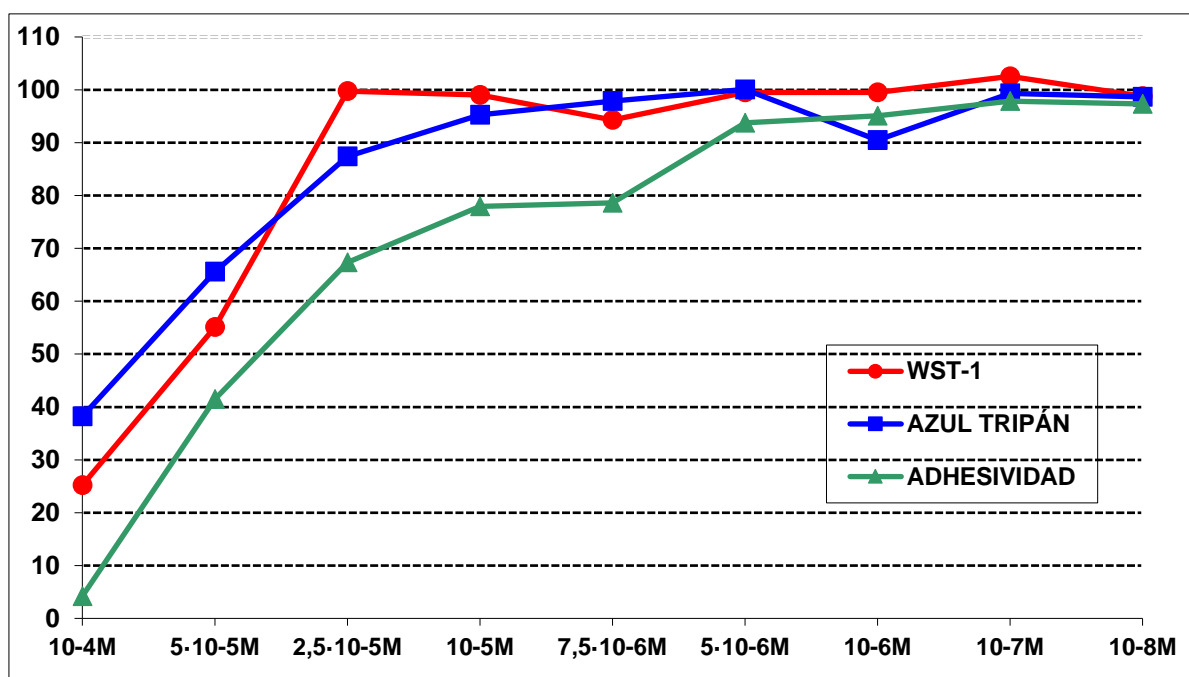


Figura 74. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nimodipino a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control.

Tabla 50. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nitrendipino. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIT DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		WST-1	
	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C
CONTROL 10 ⁻⁴ M	0,377 \pm 0,045	100	91,50 \pm 6,23	100	0,175 \pm 0,029	100
10 ⁻⁴ M	0,063 \pm 0,033**	16,710	30,67 \pm 5,00**	33,519	0,017 \pm 0,008**	9,714
CONTROL 5·10 ⁻⁵ M	0,397 \pm 0,067	100	93,75 \pm 4,16	100	0,172 \pm 0,041	100
5 · 10 ⁻⁵ M	0,147 \pm 0,019**	37,027	47,25 \pm 6,05**	50,400	0,069 \pm 0,018**	40,116
CONTROL 2,5·10 ⁻⁵ M	0,404 \pm 0,052	100	94,92 \pm 2,27	100	0,163 \pm 0,037	100
2,5 · 10 ⁻⁵ M	0,330 \pm 0,012**	81,683	87,67 \pm 27,04	92,361	0,115 \pm 0,024**	70,552
CONTROL 10 ⁻⁵ M	0,403 \pm 0,080	100	93,67 \pm 2,71	100	0,189 \pm 0,045	100
10 ⁻⁵ M	0,395 \pm 0,052	98,014	94,92 \pm 3,65	100,000	0,131 \pm 0,026**	69,312
CONTROL 7,5·10 ⁻⁶ M	0,418 \pm 0,082	100	94,50 \pm 4,03	100	0,168 \pm 0,033	100
7,5 · 10 ⁻⁶ M	0,401 \pm 0,083	95,933	97,33 \pm 2,71	102,944	0,136 \pm 0,034*	80,952
CONTROL 5·10 ⁻⁶ M	0,421 \pm 0,074	100	96,58 \pm 2,43	100	0,185 \pm 0,042	100
5 · 10 ⁻⁶ M	0,400 \pm 0,042	95,011	94,33 \pm 3,11	97,670	0,145 \pm 0,028*	78,378
CONTROL 10 ⁻⁶ M	0,404 \pm 0,100	100	96,92 \pm 3,42	100	0,173 \pm 0,042	100
10 ⁻⁶ M	0,402 \pm 0,082	99,504	94,50 \pm 4,21	97,503	0,161 \pm 0,049	93,063
CONTROL 10 ⁻⁷ M	0,401 \pm 0,070	100	98,50 \pm 1,09	100	0,174 \pm 0,043	100
10 ⁻⁷ M	0,403 \pm 0,069	100,748	96,17 \pm 3,66	97,634	0,159 \pm 0,024	91,379
CONTROL 10 ⁻⁸ M	0,401 \pm 0,097	100	98,67 \pm 1,44	100	0,163 \pm 0,025	100
10 ⁻⁸ M	0,397 \pm 0,069	99,002	97,83 \pm 1,59	99,148	0,163 \pm 0,044	100,000

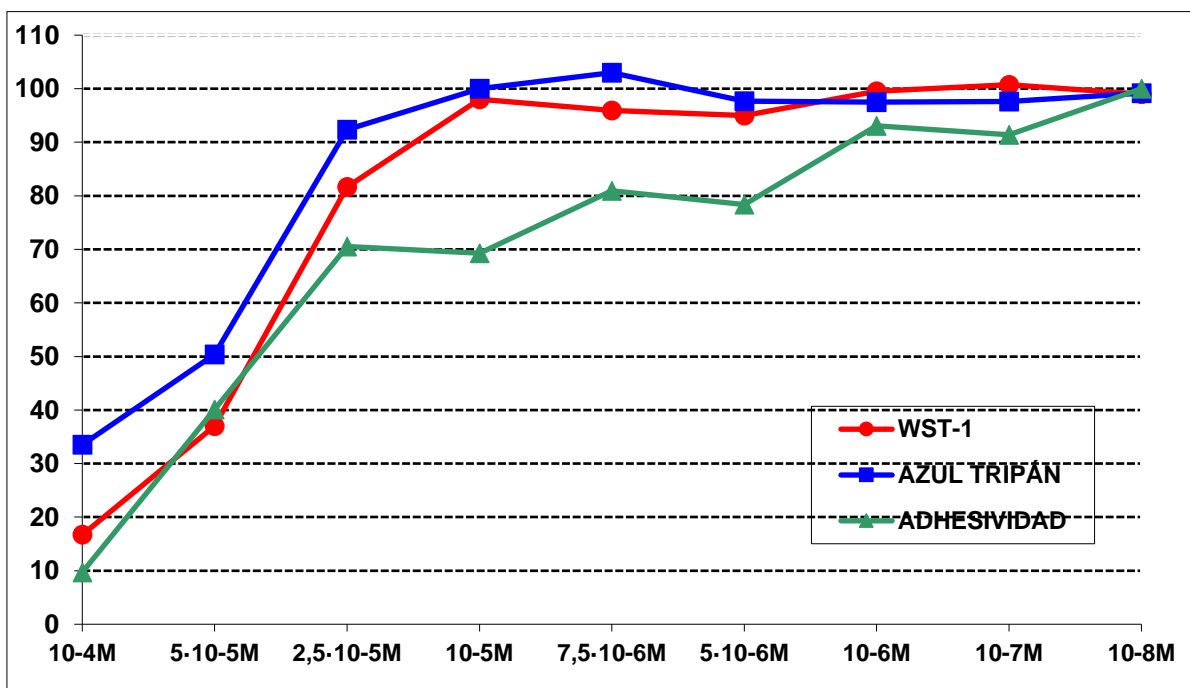


Figura 75. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nitrendipino a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control.

Tabla 51. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nisoldipino. Absorbancia en el test WST-1. Contaje celular con azul tripán. Valores expresados como media \pm desviación típica y valor porcentual respecto al control (%C). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

NIS DOSIS	VIABILIDAD 4 HORAS				ADHESIVIDAD 24 HORAS	
	WST-1		AZUL TRIPÁN		WST-1	
	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C	X \pm DT	%C
CONTROL 10 ⁻⁴ M	0,354 \pm 0,046	100	92,08 \pm 6,39	100	0,144 \pm 0,017	100
10 ⁻⁴ M	0,122 \pm 0,015**	34,463	41,17 \pm 5,34**	44,711	0,051 \pm 0,024**	35,416
CONTROL 7,5·10 ⁻⁵ M	0,330 \pm 0,030	100	94,08 \pm 4,19	100	0,135 \pm 0,028	100
7,5 · 10 ⁻⁵ M	0,222 \pm 0,019**	67,272	58,08 \pm 7,95**	61,734	0,072 \pm 0,021**	53,333
CONTROL 5·10 ⁻⁵ M	0,342 \pm 0,027	100	94,83 \pm 2,59	100	0,133 \pm 0,028	100
5 · 10 ⁻⁵ M	0,280 \pm 0,032**	81,871	71,42 \pm 4,96**	75,313	0,080 \pm 0,019**	60,150
CONTROL 2,5·10 ⁻⁵ M	0,341 \pm 0,020	100	94,33 \pm 2,96	100	0,138 \pm 0,032	100
2,5 · 10 ⁻⁵ M	0,277 \pm 0,025**	81,231	83,92 \pm 8,04**	88,964	0,086 \pm 0,021**	62,318
CONTROL 10 ⁻⁵ M	0,332 \pm 0,032	100	95,33 \pm 3,31	100	0,123 \pm 0,021	100
10 ⁻⁵ M	0,276 \pm 0,032**	83,132	89,00 \pm 6,27*	93,359	0,096 \pm 0,014**	78,048
CONTROL 7,5·10 ⁻⁶ M	0,332 \pm 0,033	100	97,08 \pm 2,23	100	0,134 \pm 0,024	100
7,5 · 10 ⁻⁶ M	0,326 \pm 0,051	98,192	94,17 \pm 4,84	97,002	0,111 \pm 0,024*	82,835
CONTROL 5 · 10 ⁻⁶ M	0,340 \pm 0,032	100	97,25 \pm 3,08	100	0,134 \pm 0,025	100
5 · 10 ⁻⁶ M	0,322 \pm 0,048	94,705	95,17 \pm 4,39	97,861	0,110 \pm 0,024*	82,089
CONTROL 10 ⁻⁶ M	0,346 \pm 0,048	100	98,00 \pm 1,91	100	0,123 \pm 0,028	100
10 ⁻⁶ M	0,323 \pm 0,046	93,352	96,67 \pm 2,77	98,642	0,111 \pm 0,024	90,243
CONTROL 10 ⁻⁷ M	0,336 \pm 0,033	100	98,33 \pm 1,78	100	0,133 \pm 0,033	100
10 ⁻⁷ M	0,341 \pm 0,034	101,488	96,92 \pm 3,18	98,566	0,125 \pm 0,016	93,984
CONTROL 10 ⁻⁸ M	0,349 \pm 0,044	100	97,75 \pm 2,14	100	0,134 \pm 0,033	100
10 ⁻⁸ M	0,338 \pm 0,019	96,848	98,00 \pm 3,95	100,255	0,130 \pm 0,018	97,014

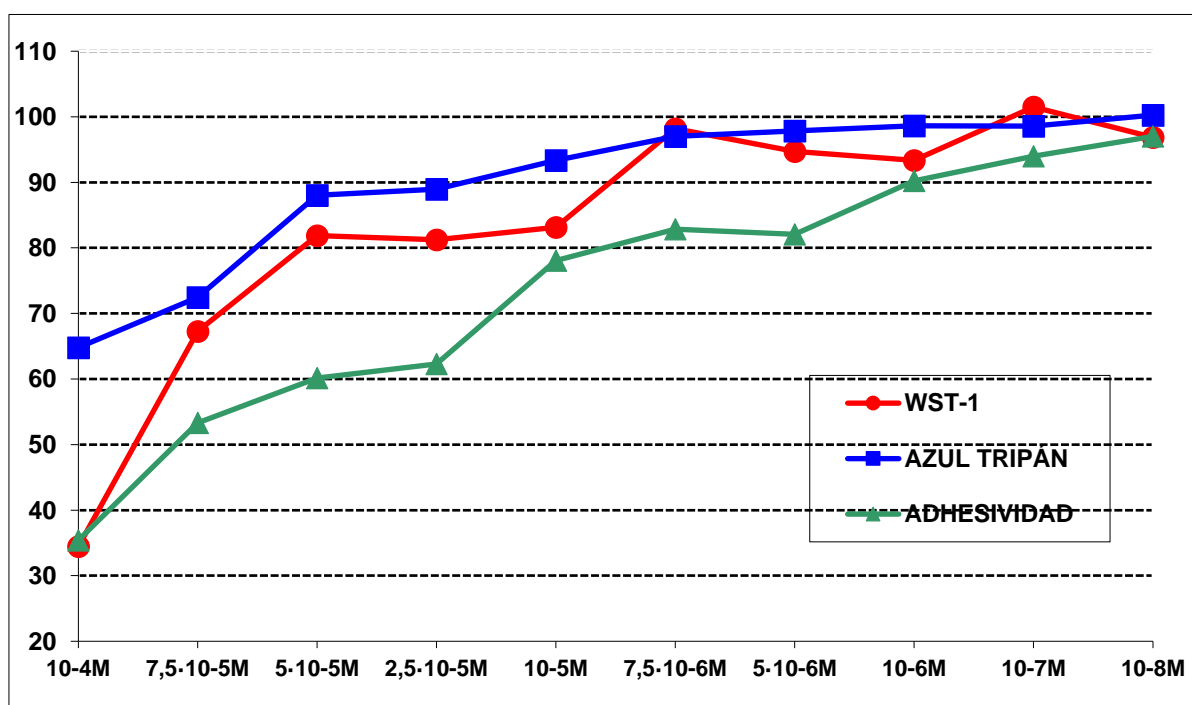


Figura 76. Viabilidad y adhesividad fibroblástica *in vitro* con nisoldipino a las 4 y 24 horas respectivamente. Valores expresados como porcentaje respecto al control.

8.- ESTUDIO CITOPATOLÓGICO.

Las concentraciones de TFP $\geq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M produjeron una alteración de la úlcera y de la monocapa de fibroblastos a las 18 horas que impidió su posterior estudio (figura 78). Las concentraciones de TFP $\leq 5 \cdot 10^{-5}$ M no mostraron alteraciones evidentes mediante microscopía de inversión de fases.

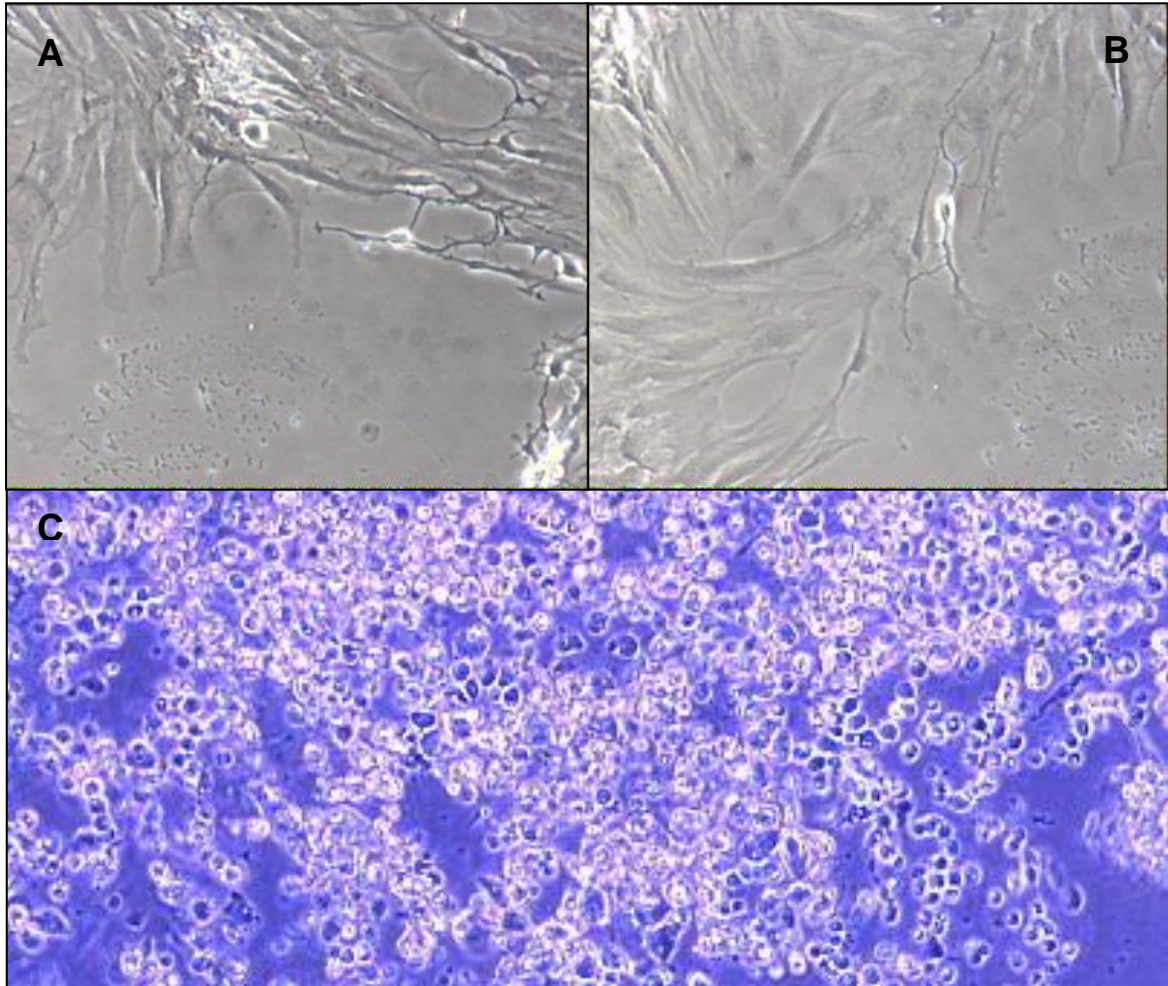


Figura 78. A y B: TFP $7,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 horas. Microscopía de inversión de fases 20X. Células con crecimiento desordenado, pérdida de la confluencia, despegamientos focales de la placa de cultivo, núcleos poco evidentes y citoplasmas muy expandidos. C: TFP 10^{-4} M a las 18 horas. Microscopía de inversión de fases 4X. Alteración y despegamiento de la monocapa de fibroblastos. Se observa un agrupamiento de núcleos (no se evidencian citoplasmas), con anisocariosis e indentaciones nucleares y hendiduras.

En grupos con concentraciones de DTZ 10^{-4} M y $7,5 \cdot 10^{-5}$ M se produjo una alteración de la úlcera y de la monocapa de fibroblastos a las 18 y 48 horas respectivamente, con despegamiento celular (figura 79). Concentraciones de DTZ $\leq 5 \cdot 10^{-5}$ M no mostraron alteraciones evidentes mediante microscopía de inversión de fases.

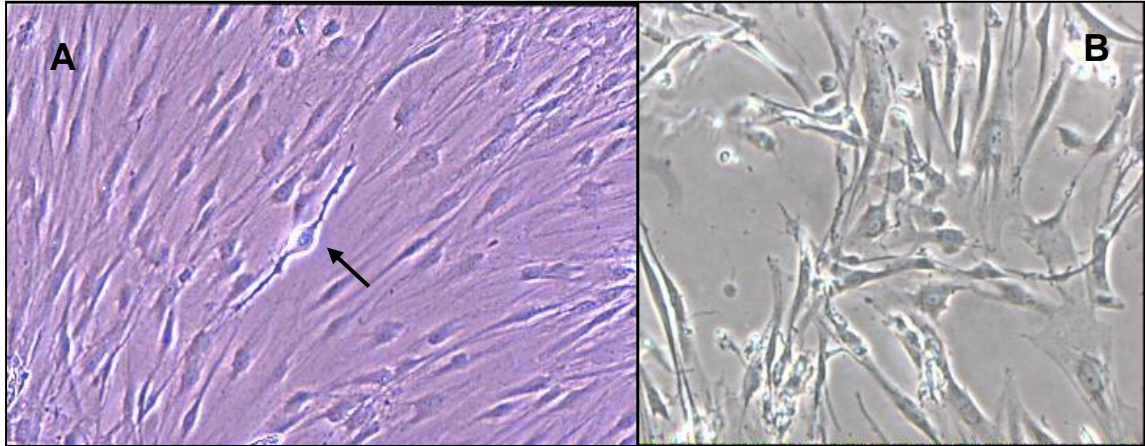


Figura 79. A: DTZ $7,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 48 horas. Monocapa de fibroblastos en la que se evidencian células aisladas mostrando fenómenos de cariorexis (flecha). Microscopía de inversión de fases 10X. B: DTZ 10^{-4} M a las 18 horas. Monocapa de fibroblastos con desorganización en la distribución celular, con tendencia al agrupamiento. Abundante celularidad con citoplasmas alargados, claros, con prolongaciones finas, núcleos monomorfos con nucleolos patentes y ligeras diferencias en el tamaño celular.

El grupo con VPM 10^{-4} M produjo un despegamiento progresivo de los fibroblastos desde las 18 horas, lo que impidió su estudio en tiempos posteriores. Las concentraciones de VPM $\leq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M no mostraron alteraciones (figura 80).

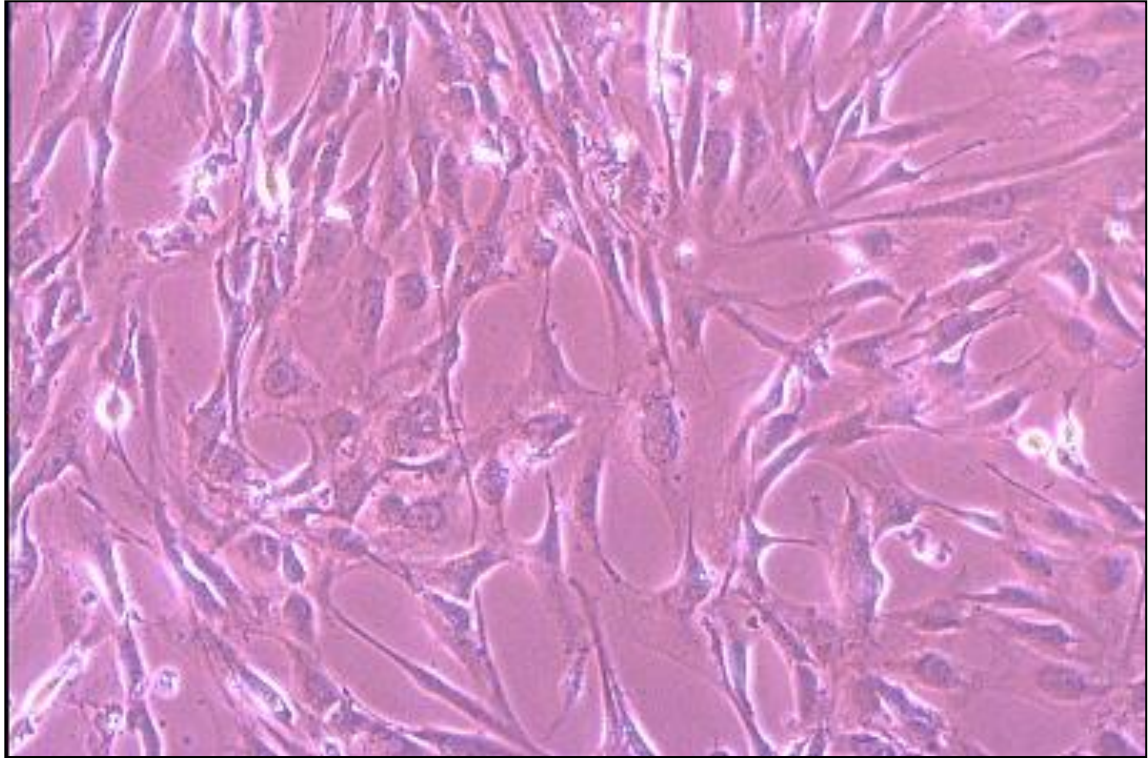


Figura 80. VPM 10^{-4} M a las 18 horas. Microscopía de inversión de fases 20X. Dispersión de la monocapa fibroblástica, inicialmente mucho más confluyente. Células amplias de citoplasmas elongados, en áreas expandidos, con aspecto velamentoso. Núcleos ovales o redondos con membrana nuclear marcada, definida y con nucleolos presentes.

El grupo con MBF 10^{-4} M produjo un despegamiento progresivo de la monocapa de fibroblastos a partir de las 18 horas con una marcada desorientación del crecimiento celular (figura 81).

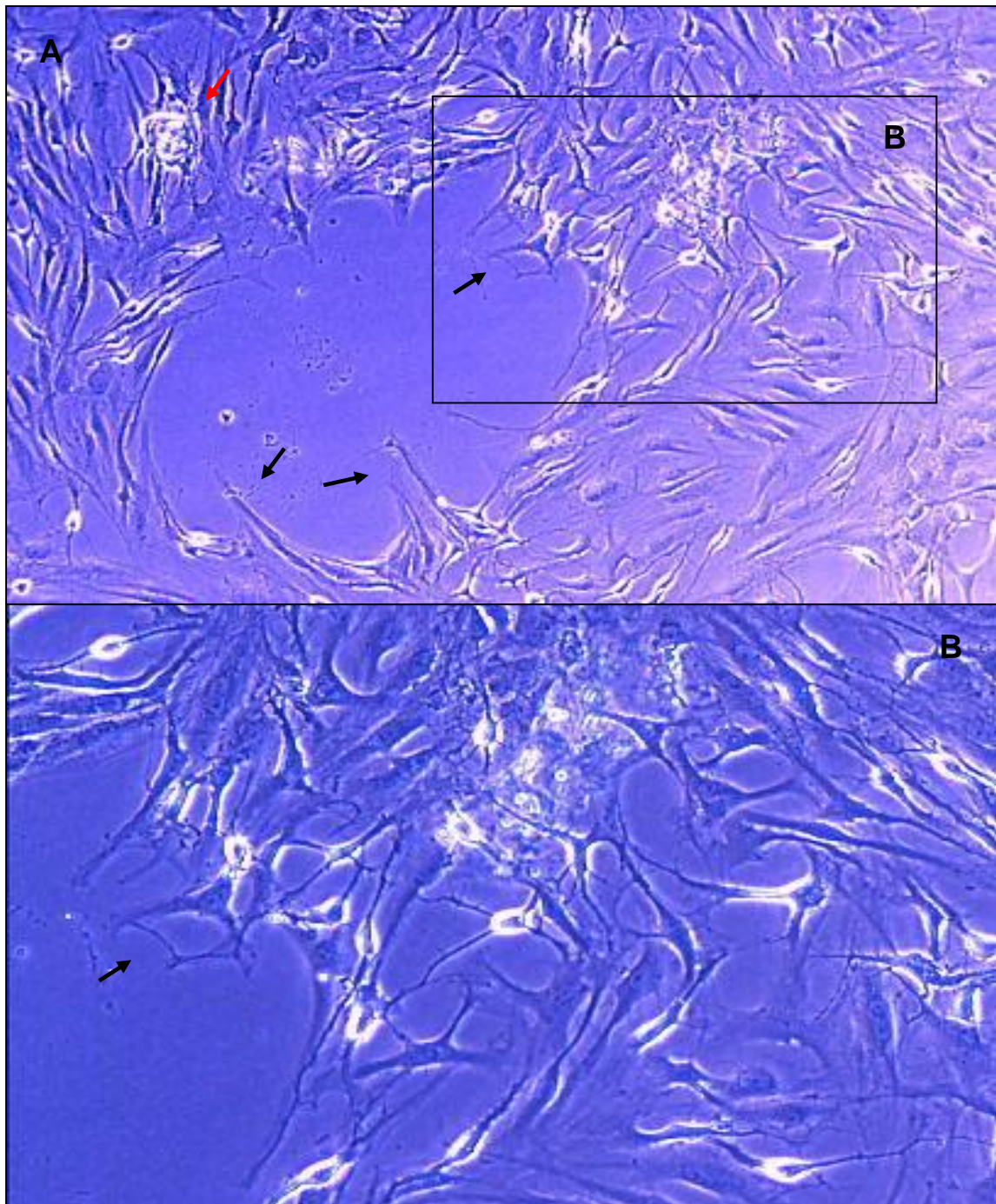


Figura 81. MBF 10^{-4} M a las 18 horas. A: Úlcera central con inicio de la migración fibroblástica (flechas negras) y puntos focales con pérdida de la adhesividad (flecha roja). El área acelular está rodeada por abundantes células que muestran una marcada desorientación. Microscopía de inversión de fases 10X. B: Detalle de la imagen anterior en la que se aprecian abundantes células estrelladas, fusocelulares, de citoplasmas amplios y núcleos redondeados u ovales, con nucleolos patentes. Microscopía de inversión de fases 20X.

Los grupos con NIC 10^{-4} y $7,5 \cdot 10^{-5}$ M produjeron un despegamiento de la monocapa de fibroblastos a las 18 y 24 horas respectivamente (figura 82).

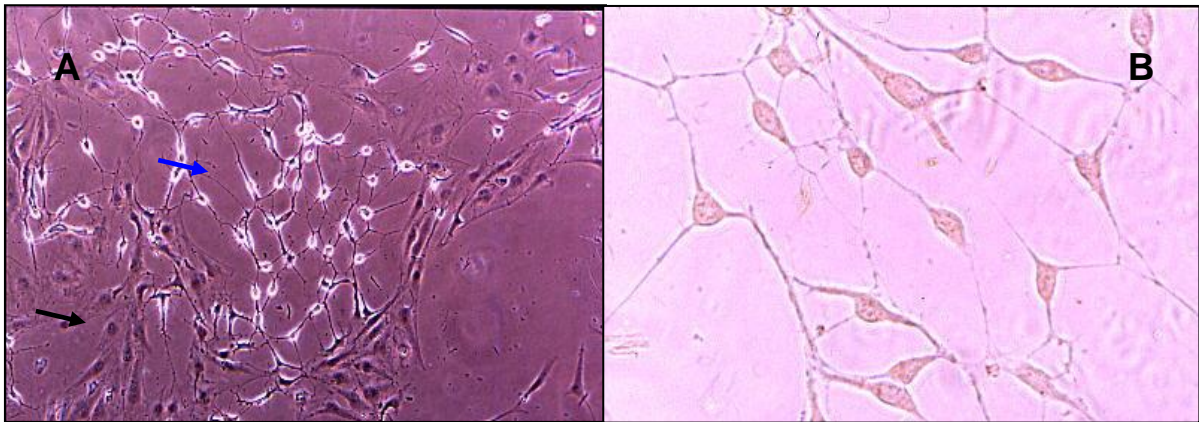


Figura 82. NIC 10^{-4} M a las 18 horas. A: Monocapa de fibroblastos no confluentes en la que se aprecian células con aspecto activo, con amplios citoplasmas estrellados y finos nucleolos (flecha negra) y zonas con células fusiformes con finas prolongaciones celulares (flecha azul). Microscopía de inversión de fases 10X. B: Detalle a mayor aumento de las células fusiformes con finas prolongaciones celulares que se entremezclan conformando un entramado reticular. Núcleos monomorfos, ovals, similares y orientados entre sí. Microscopía de inversión de fases 20X.

En los grupos de NIF, NIM, NIT y NIS no se apreciaron alteraciones (despegamiento, alteración nuclear o déficits de crecimiento irregular) en la monocapa de fibroblastos que rodeaba las úlceras y se estudiaron sin dificultad hasta las 48 horas. En las monocapas de fibroblastos con concentraciones de NIF, NIM, NIT y NIS 10^{-4} M se observaron a las 48 horas células aisladas mostrando fenómenos de cariorexis.

DISCUSIÓN

1.- CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS.

1.1.- ESTUDIO DE FOTOSENSIBILIDAD DE LAS DIHIDROPIRIDINAS.

La investigación, uso y manipulación de los ICC del tipo de las dihidropiridinas es complicada debido a su fotolabilidad y termolabilidad (424). Dado el diferente comportamiento de cada una de estas sustancias y los antecedentes bibliográficos que confirmaban la inestabilidad de NIF y NIT frente a distintos tipos de iluminación, algunos de ellos presentes en el laboratorio donde se realizaron los experimentos con cultivos celulares, fue necesario realizar estudios de fotosensibilidad con NIM, NIC y NIS en una fase previa a su uso en condiciones de investigación y establecer las condiciones lumínicas óptimas de seguridad para su manejo en el laboratorio.

Se realizaron pruebas de fotodegradación frente a tres fuentes de iluminación distintas: luz solar, luz de fluorescente y luz de vapor de sodio. Para ello se utilizó como método analítico de determinación la HPLC junto con un sistema de detección por absorción. Las tres dihidropiridinas estudiadas (NIC, NIM y NIS) mostraron unos espectros de absorción muy semejantes, con un punto máximo de absorbancia para todos ellos en la zona de los 240 nm. En consecuencia, la longitud de onda óptima utilizada para su detección no precisó variación. Las ventajas de la HPLC son su gran sensibilidad, especificidad, precisión y reproductibilidad, a la vez que no son necesarios grandes volúmenes de muestra y los tratamientos previos de la misma utilizados para su procesado analítico no afectan a los analitos a determinar (426). Se trata por lo tanto de una técnica ideal para la determinación de ICC.

1.2.- CONDICIONES DE ILUMINACIÓN.

Los estudios de fotosensibilidad con NIM, NIC y NIS confirmaron su inestabilidad ante fuentes de iluminación convencionales, como un fluorescente, o frente a la luz solar. Por lo tanto, fue necesario practicar medidas de aislamiento lumínico para evitar la entrada de luz al laboratorio y todas las tareas que requerían la manipulación de fármacos se realizaron bajo la única iluminación proporcionada por una lámpara de vapor de sodio, evitando de esta manera la fotodescomposición de los mismos. El resto de las tareas se realizaron bajo la iluminación de fluorescentes convencionales.

Las lámparas de vapor de sódio emiten una radiación luminosa con una longitud de onda superior a 450 nm. Este tipo de iluminación supuso una dificultad añadida en el trabajo de laboratorio ya que, en estas condiciones de iluminación, casi de penumbra,

resulta muy difícil la discriminación de colores (figuras 83 y 84). Tareas que con una iluminación normal resultaban sencillas, como pipetear medio de cultivo o reactivos, o rellenar manualmente las microplacas de 24 ó 96 pocillos, se veían muy dificultadas con la luz de sodio, aumentando enormemente el tiempo de trabajo.

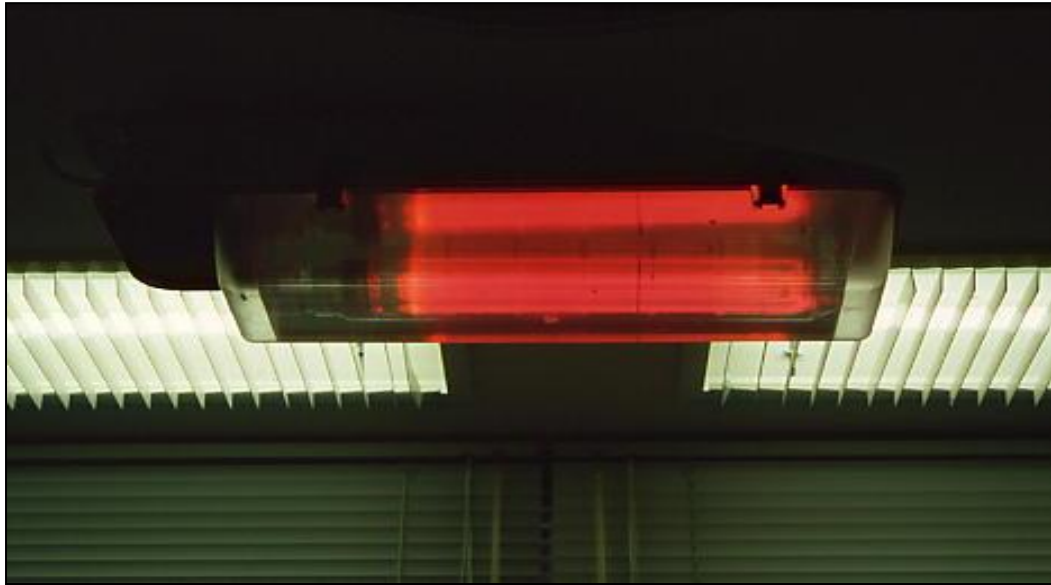


Figura 83. Lámpara de vapor de sodio.

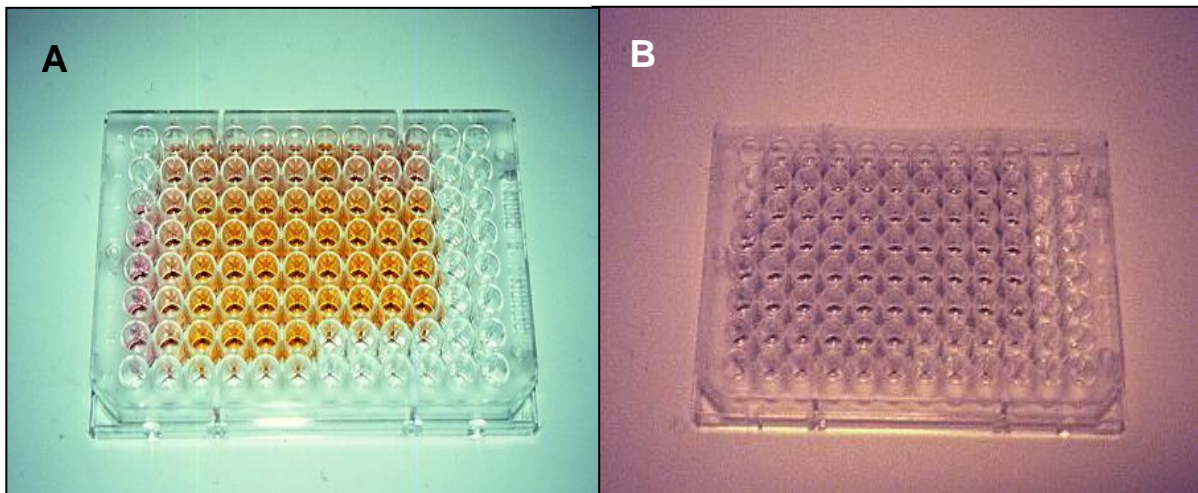


Figura 84. A: Microplaca de 96 pocillos con luz de fluorescente en la que se aprecian con nitidez los distintos colores de los pocillos al adicionar el reactivo WST-1. B: La misma microplaca con luz de vapor de sodio en la que resulta mucho más difícil la discriminación de los colores.

1.3.- PREPARACIÓN DE LOS FÁRMACOS.

El polvo puro de TFP, DTZ, VPM y MBF fue disuelto en medio de cultivo, presentando una buena solubilidad y estabilidad. Sin embargo, las dihidropiridinas son sustancias hidrófobas que requieren para su correcta disolución la utilización de polietilenglicol o etanol. Kang (42) realizó disoluciones de NIC 10^{-3} M directamente en un medio de cultivo similar al utilizado en nuestro trabajo. Siguiendo esta metodología, intentamos inicialmente la disolución de dihiropiridinas directamente en medio de cultivo. Sin embargo, en las disoluciones con concentraciones $\geq 10^{-4}$ M aparecieron cristales de coloración verdosa y morfología variada (trapezoidal, estrellada o combinaciones de ambas) flotando en el medio de cultivo, posiblemente formados por la precipitación de los fármacos (figura 85). Por lo tanto, las dihidropiridinas precisaron la disolución inicial en etanol.

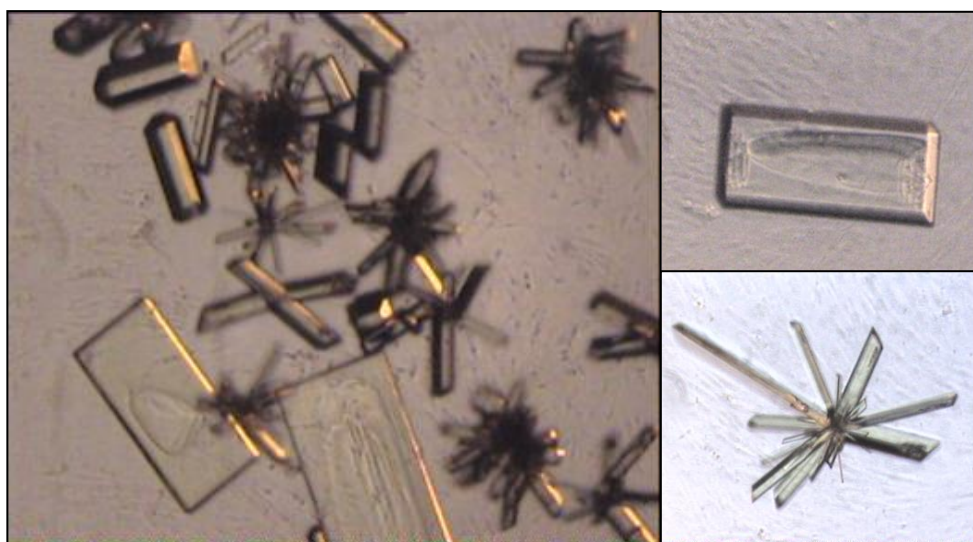


Figura 85. Cristales en la disolución directa de NIF 10^{-4} M en medio de cultivo. Microscopía de inversión de fases 4X.

Wong (232) no encontró diferencias significativas entre controles sin etanol y controles con $0,05 \mu\text{l/ml}$ de etanol al estudiar la proliferación y la cinética de reparación *in vitro* de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon con inhibidores de la angiogénesis. Hoffman (444) tampoco encontró diferencias significativas entre controles sin etanol y controles con $0,1\%$ de etanol al estudiar la proliferación, migración y viabilidad de células del EPR humanas *in vitro*. En nuestros experimentos la cantidad de etanol máxima contenida fue $0,1 \mu\text{l/ml}$ (1:10.000) y no se detectaron diferencias significativas entre la cinética de reparación, proliferación, adhesividad y viabilidad entre los controles con etanol utilizados en los experimentos con la primera dihidropiridina (NIC), ni entre éstos y un control sin etanol (tablas 24, 25, 38 y 47).

1.4.- NECESIDAD Y LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO*.

El *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) (445) promueve y regula el desarrollo de nuevas técnicas de investigación en el campo de las biociencias, que mejoren o que supongan una alternativa a la investigación con animales de experimentación. Según este organismo, los estudios de citotoxicidad por sustancias químicas deben seguir una estrategia en la que los métodos alternativos de investigación, como los estudios de relación estructura-actividad, los modelos de biocinética, diferentes técnicas fisicoquímicas y los estudios *in vitro*, deben ser utilizados secuencialmente antes de iniciar la experimentación animal.

Dado que el objeto del presente estudio era observar los fenómenos de reparación dependientes de un elemento celular clave, el fibroblasto, en el proceso de reparación tisular, resultó interesante realizar experimentos *in vitro*, ya que éstos nos permitieron estudiar de manera selectiva el comportamiento individualizado de un determinado tipo celular y, a la vez, evaluar el efecto de distintas drogas que pudieran interferir con dicho proceso de reparación tisular, obviando así las numerosas interacciones existentes *in vivo*.

La toxicidad *in vivo* es un fenómeno complejo dependiente de factores locales y sistémicos. Ningún experimento aislado desarrollado *in vitro* o *ex vivo* puede ser capaz de reproducir exactamente la complejidad de las respuestas del ser vivo; en consecuencia, la naturaleza de la respuesta celular *in vitro* debe considerarse siempre con cautela. Los factores sistémicos son difíciles de reproducir *in vitro* y, por tanto, estos estudios determinan los efectos producidos directamente a nivel celular. Este fenómeno es conocido como citotoxicidad.

Las diferencias existentes entre la experimentación de toxicidad *in vivo* e *in vitro* deben ser claramente comprendidas para poder interpretar adecuadamente los resultados de la experimentación *in vitro* en términos de respuesta *in vivo*. Estas diferencias afectan a tres aspectos fundamentales (211):

-Farmacocinética: El estudio de la toxicidad *in vitro* es un fenómeno celular. Sería muy difícil recrear *in vitro* los procesos farmacocinéticos que se producen *in vivo* durante la exposición a una droga. Las principales diferencias entre los estudios *in vivo* e *in vitro* se centran en el tiempo de exposición y la concentración, el metabolismo, la penetración tisular, el aclaramiento tisular y la excreción de la droga. Aunque sería posible simular todos estos parámetros utilizando cultivos histotípicos, que recrean la estructura tridimensional de un tejido, la mayoría de los estudios de citotoxicidad se centran en el estudio de las respuestas celulares, ganando de este modo simplicidad y reproductibilidad.

-Metabolismo: Muchas sustancias inicialmente no tóxicas se convierten en tóxicas tras su metabolización hepática y viceversa, muchas sustancias que resultan tóxicas *in vitro*, son inactivadas por las enzimas hepáticas. Para que los estudios de toxicidad *in vitro* sean una alternativa válida a los estudios de toxicidad en el animal de experimentación, debe demostrarse que la droga alcanza las células *in vitro* en el mismo estado de metabolización que lo haría en el ser vivo. Para que esta premisa se cumpla puede requerirse la adición al cultivo de preparaciones con enzimas microsomales hepáticas purificadas, o realizar cocultivos con hepatocitos activados, o bien modificar genéticamente las células diana, introduciendo los genes que codifiquen las enzimas necesarias para el metabolismo de la droga.

-Respuestas sistémicas y tisulares: Un efecto tóxico *in vitro* puede detectarse por cambios en la viabilidad y/o metabolismo celular, mientras que los efectos *in vivo* presentan un carácter más general de tipo tisular o sistémico. Debemos pues asumir, que toda la complejidad de sucesos que componen las reacciones tisulares y sistémicas ante la exposición a una droga no pueden ser simuladas *in vitro*.

La utilización en Oftalmología de drogas con potencial antiproliferativo suele realizarse mediante aplicación local y durante un corto período de tiempo, ya que interesa que ejerzan su actividad antiproliferativa sólo a ese nivel. Esta vía de administración está menos influenciada por la metabolización sistémica que la vía general, por lo que el comportamiento de las sustancias presenta una mayor similitud con la aplicación en cultivos celulares.

1.5.- EL MODELO DE LESIÓN *IN VITRO*.

A pesar de las diferencias del comportamiento celular *in vivo* e *in vitro*, muchas de las funciones celulares especializadas se manifiestan con claridad en el cultivo. Esto nos permitió estudiar en un modelo de lesión *in vitro* varios de los mecanismos de reparación tisular en los que está implicado el fibroblasto.

Para realizar los experimentos se establecieron seis líneas celulares de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. La mayoría de los modelos de reparación *in vitro* utilizados consistieron básicamente en la producción de lesiones en cultivos de células en monocapa. Para estudiar dos de los mecanismos implicados en la cicatrización como son la migración y la proliferación de los fibroblastos, utilizamos un modelo de lesión *in vitro* que consiste básicamente en realizar una lesión de tipo mecánico con una punta rotante de material plástico sobre una monocapa confluyente de fibroblastos en cultivo.

La mayoría de las células de vertebrados mantenidas *in vitro* crecen desarrollando monocapas. Los fibroblastos no son una excepción y, cuando se introducen en frascos que contienen un medio de cultivo tisular, presentan gran capacidad de adherencia a la superficie, se extienden y se dividen (211). En condiciones adecuadas, el crecimiento fibroblástico continúa hasta que se forma una monocapa confluyente en la que las células vecinas se tocan unas a otras. En este momento, sin espacio libre en el que extenderse, los fibroblastos normales dejan de dividirse y entran en fase de quiescencia, fenómeno conocido como inhibición de la división celular por contacto.

Las monocapas formadas *in vitro* por fibroblastos no deben concebirse como la suma de células funcionalmente independientes que en su crecimiento contactan y alcanzan la confluencia por una simple cuestión de espacio físico. De Roos (446) demostró cómo las monocapas generadas *in vitro* a partir de fibroblastos hepáticos de rata, pueden transmitir los potenciales de acción generados por despolarización en un punto de la monocapa hasta otro punto distante en la misma. El potencial se produce por incrementos transitorios y sincrónicos de la concentración de Ca^{++} intracelular en gran número de células, comportándose toda la monocapa como un conjunto excitable que De Roos denomina "sincitio excitable". La propagación intercelular de este potencial se realiza a una velocidad aproximada de 6,1 mm/s y puede ser bloqueada por ICC selectivos para los CCVD-L. Por lo tanto, en las monocapas confluentes de fibroblastos se establecen conexiones intercelulares que permiten la transmisión de señales y que determinan que, ante estímulos concretos, la monocapa ofrezca una respuesta sincrónica multicelular. Además, los fibroblastos *in vitro* presentan capacidad autocrina, ya que son capaces de sintetizar factores de crecimiento como el PDGF, FGFb y FGFa y proteínas de la MEC como colágeno tipo I y III que van a ser determinantes tanto en su crecimiento, como en el establecimiento de las relaciones intercelulares que se generan en el seno de la monocapa.

Si en una monocapa confluyente de fibroblastos se produce una solución de continuidad, generando una zona libre de células sobre la placa, las células de los bordes de esta zona comienzan a migrar hacia el área denudada y, posteriormente, inician la síntesis de ADN y la proliferación, de una forma comparable a la que ocurre en el ser vivo. Estos modelos, con pequeñas variantes, se han utilizado con éxito en diferentes estirpes celulares como células del endotelio vascular, queratinocitos, células epiteliales y fibroblastos entre otras (64, 74-77).

Las diferencias entre los distintos modelos existentes de lesión *in vitro* consisten en la forma de realizar la lesión, así como en la manera de cuantificar la capacidad de

reparación de la misma. La mayoría de los autores que utilizan en sus investigaciones modelos de lesión en monocapa de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon, suelen realizar la lesión por un procedimiento mecánico. Saika (67) ha utilizado con éxito en varios experimentos un modelo de lesión *in vitro* mediante rascado lineal con una punta de goma de silicona (64). Yoshida (447) y Joyce (248) realizaron soluciones de continuidad circulares en el endotelio de córneas de conejo *in vitro* mediante la punta de una micropipeta y bajo la observación con microscopía especular. Posteriormente, Latina (52) y Wong (232) modificaron el método de Joyce y realizaron con éxito soluciones de continuidad circulares en monocapas confluentes de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon mediante la compresión de una zona circunscrita de la monocapa con discos de 3 mm de diámetro de filtro Millipore de 0,2 μm . Mikami (77) utilizó con éxito una punta rotante recubierta de material plástico que aplicó momentáneamente sobre la superficie de una monocapa de células epiteliales de mucosa gástrica de conejo. Murphy (448) y Hoffman (444) utilizaron la hoja de una cuchilla de afeitar para realizar soluciones de continuidad circulares en monocapas de células del EPR *in vitro*.

La capacidad de reparación celular sobre la solución de continuidad producida en la monocapa puede medirse de distintas maneras. Algunos autores lo hacen cuantificando, mediante microscopía de alta magnificación (100X), el número de células presentes en un campo determinado a partir del margen de la lesión, tras fijar y teñir la muestra (444). Otros miden la distancia que han recorrido las células desde el margen de la lesión (67). En los modelos de lesión que producen soluciones de continuidad circulares puede cuantificarse el área libre de células que queda por cubrir mediante observación microscópica o fotografías seriadas (77, 232).

En el presente trabajo, hemos utilizado un modelo de lesión similar al descrito por Mikami (77) en células epiteliales de mucosa gástrica de conejo. La lesión se practicó mediante una punta rotante de material plástico que se aplicó sobre una monocapa confluyente de fibroblastos. La fuerza motriz ejercida por esta punta produjo una solución de continuidad de morfología circular en la que fue posible calcular el área. En estas condiciones, la capacidad de las células para cubrir el área desnuda pudo valorarse, midiendo de una manera secuencial la superficie libre de células que queda por cubrir, a lo largo de diferentes períodos de tiempo (77, 232). En nuestro trabajo hemos utilizado un método similar al propuesto por Wong (232), que calcula la superficie libre de células mediante el tratamiento informático de las imágenes digitalizadas obtenidas de forma seriada mediante microscopía (figura 86).

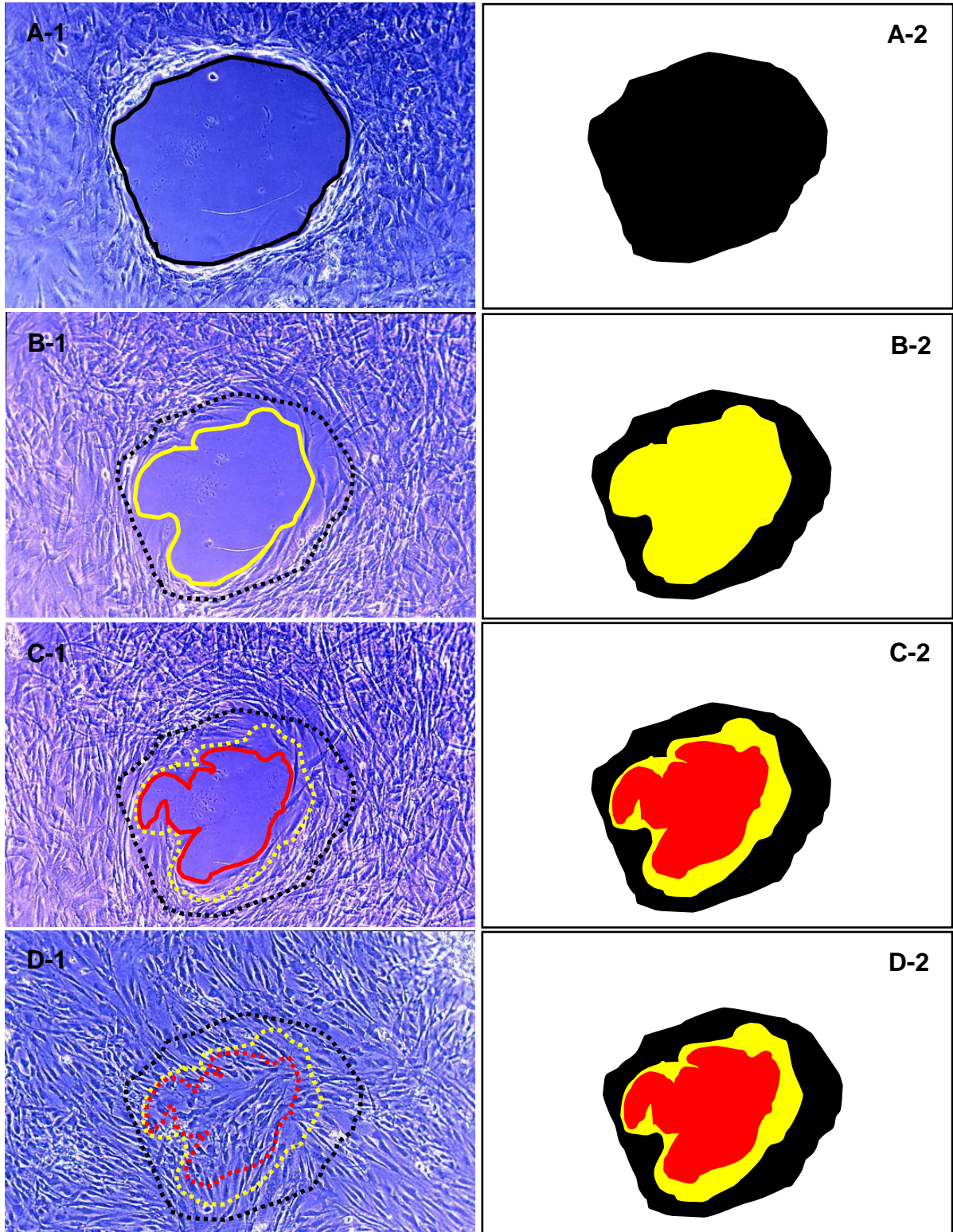


Figura 86. Úlcera de la figura 48. En las imágenes de la izquierda se ha señalado el perímetro de la lesión a las 0 horas (A-1), a las 18 horas (B-1), a las 24 horas (C-1) y a las 48 horas (D-1). En las imágenes de la derecha se observan las áreas libres de fibroblastos: A las 0 horas (A-2) en negro (0,4945 mm²), a las 18 horas (B-2) en amarillo (0,2649 mm²), a las 24 horas (C-2) en rojo (0,1843 mm²). A las 48 horas (D-2) la úlcera está cerrada.

Dado que la reparación de la solución de continuidad en la monocapa implica la migración inicial de los fibroblastos situados en los márgenes de la lesión, seguida de su proliferación (248), estos modelos permiten la valoración de estos dos aspectos fundamentales de la reparación fibroblástica. El inicio de la migración fibroblástica puede observarse en las primeras 18 horas tras producir la lesión (figura 87) y, posteriormente, a los fenómenos de migración se une la síntesis de ADN y la proliferación, de una forma comparable a la que tiene lugar *in vivo*.

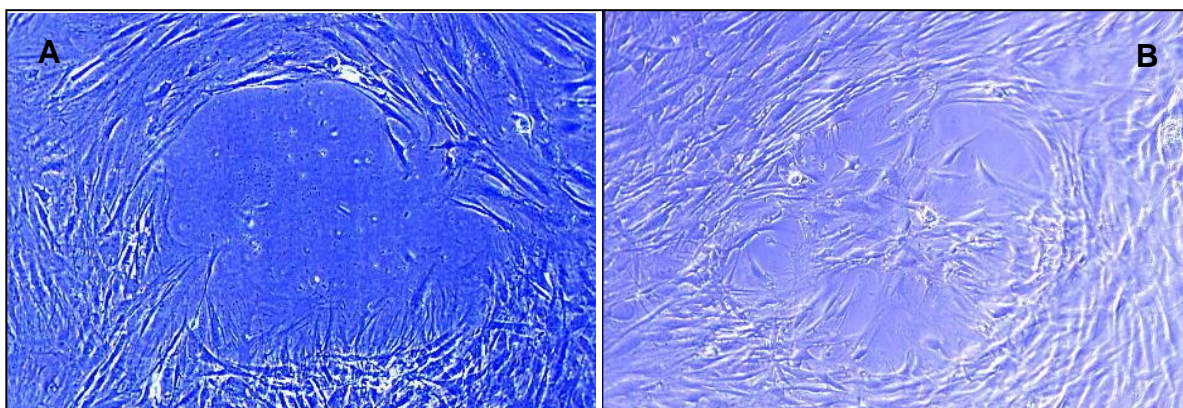


Figura 87. A: Úlcera a las 18 horas en la que se aprecia el inicio de la migración fibroblástica desde los márgenes inferiores. B: La misma úlcera a las 24 horas en la que se aprecia una mayor migración de fibroblastos desde los márgenes de la lesión, invadiendo el área que anteriormente estaba vacía. Microscopía de inversión de fases (10X).

Las células en cultivo, y particularmente los fibroblastos, son móviles y pueden migrar distancias significativas sobre el sustrato en el que se encuentran. Esta movilidad dependerá de la densidad celular y del espacio disponible en el cultivo, de la superficie de cultivo y de la presencia de estímulos favorecedores (factores de crecimiento) o perturbadores (citotóxicos). La motilidad se hace evidente al comprobar la modificación de la morfología de la membrana celular mediante observación periódica. Calcular la cantidad de movimiento es complejo, pero puede determinarse por la realización de fotografías seriadas, mediante el análisis de las huellas producidas por la fagocitosis celular en su desplazamiento por placas recubiertas de oro coloidal (230) o mediante el estudio de la invasión fibroblástica de membranas porosas (policarbonato, Anopore™, etc), de filtros recubiertos con Matrigel® u otros componentes de la MEC implantados en diferentes tipos de placas y cámaras de cultivo (231). La metodología utilizada en varios estudios que valoran la motilidad de fibroblastos de cápsula de Tenon *in vitro* se exponen en la tabla 52.

Tabla 52. Comparación de la metodología de los trabajos que han estudiado el efecto de fármacos y factores del crecimiento sobre la motilidad de fibroblastos de cápsula de Tenon *in vitro*.

Autor	Revista y año	Tipo celular	Fármacos estudiados	Metodología
Soong H, et al (311)	IOVS 1985	Células epiteliales corneales de rata y conejo	Inhibidores de la Cm: TFP W-7 Citocalasina B	Migración sobre placa de cultivo con rejilla y sobre colágeno. Cuantificación de la migración por observación en microscopio y medida de la distancia recorrida
Yamamoto T, et al (68)	Ophthalmology 1990	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	MMC 5-FU	Migración en gel de agarosa
Latina M, et al (52)	IOVS 1991	FHCT	Interferón gamma	Modelo de lesión circular <i>in vitro</i> por compresión con filtros de 3 mm de Milipore. Cuantificación de la migración mediante fotografías digitalizadas seriadas y cálculo del área libre de células mediante tratamiento informatizado
Wong J, et al (232)	Exp Eye Res 1994	FHCT	Inhibidores de la angiogénesis: AGM-1470 HC21P BCD-TDS	Modelo de lesión circular <i>in vitro</i> por compresión con filtros de 3 mm de Milipore. Cuantificación de la migración mediante fotografías digitalizadas seriadas y cálculo del área libre de células mediante tratamiento informatizado
Saika S, et al (64)	Ophthal Res 1995	Fibroblastos subconjuntivales y queratinocitos de conejo	Etil-3,5-dihidroxibenzoato	Modelo de lesión lineal <i>in vitro</i> por rascado con punta de goma de silicona
Saika S, et al (67)	Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1995	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	Minoxidil	Modelo de lesión lineal <i>in vitro</i> por rascado con punta de goma de silicona. Cuantificación de la migración por observación en microscopio y medida de la distancia recorrida
Daniels J, et al (229)	Exp Eye Res 1999	FHCT	MMC 5-FU	Migración sobre membranas porosas (<i>transwell chambers</i>)
Cordeiro M, et al (58)	IOVS 1999	FHCT	Anticuerpo monoclonal anti TGF β 2	Migración sobre membranas porosas (<i>transwell chambers</i>)
Cordeiro M, et al (53)	IOVS 2000	FHCT	Factores de crecimiento: TGF- β 1, - β 2 y - β 3	Migración sobre membranas porosas (<i>transwell chambers</i>)
Pinilla I, et al (449)	Arch Soc Esp Oftalmol 2000	FHCT	NIC	Modelo de lesión circular <i>in vitro</i> por punta rotante de polivinilo. Cuantificación de la migración por observación microscópica mediante medición y cálculo del área libre de células

FHCT: Fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. IOVS: Invest Ophthalmol Vis Sci.

Según nuestra experiencia, el modelo de lesión circular presenta una serie de ventajas respecto a los anteriormente descritos. Por una parte, la lesión se practica con un objeto de material plástico que presenta una superficie relativamente blanda, suave y regular, evitando de esta manera la producción de importantes desperfectos en la superficie de la placa de cultivo. Las soluciones de continuidad producidas mediante rascado pueden resultar más traumáticas para la monocapa de fibroblastos y para la placa

de cultivo, pudiendo producir con el movimiento de arrastre el despegamiento parcial de la monocapa y/o irregularidades en la superficie de cultivo que podrían alterar la migración celular. En nuestros experimentos pudimos observar, en un reducido número de lesiones, pequeñas líneas o erosiones situadas en el centro de la úlcera, en el punto de contacto entre la superficie de cultivo y la punta rotante. Sin embargo, este hecho no supuso ningún impedimento para la migración inicial de los fibroblastos desde los márgenes de la úlcera, ya que las erosiones se situaban en el centro de la lesión y, posteriormente, durante su crecimiento, los fibroblastos cubrían estas zonas sin ninguna dificultad (figura 88).

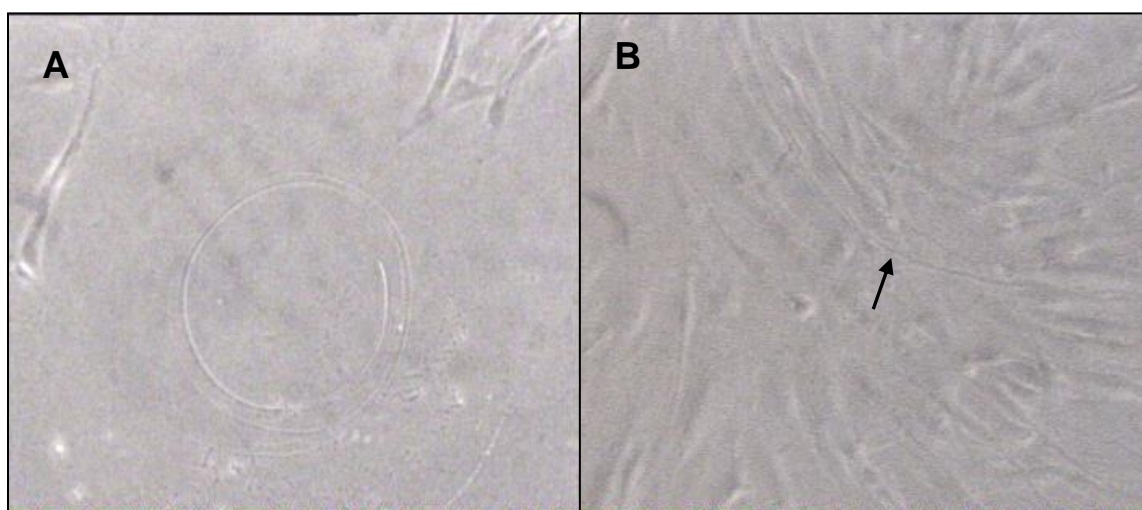


Figura 88. A: Microerosión con morfología circular en la superficie de la placa de cultivo en el centro de una úlcera. B: La misma microerosión (flecha) de la figura A, 48 horas después, recubierta por los fibroblastos en su migración y proliferación. Microscopía de inversión de fases (20X).

Por otro lado, debido a la peculiar forma que tienen los fibroblastos de migrar, en el modelo de lesión lineal, resulta en ocasiones complicado establecer la distancia lineal máxima que han alcanzado los fibroblastos en su movimiento. Además, debido a que los fibroblastos, a diferencia de otros tipos de células como las epiteliales, no migran en bloque, sino que lo hacen de forma individualizada, en este mismo modelo resulta frecuentemente difícil la elección del área en la que realizar el recuento celular, puesto que la migración fibroblástica puede presentar una distribución no homogénea. En nuestro modelo, debido a la morfología redondeada de la lesión, los fibroblastos migran de una forma más ordenada y homogénea y la posibilidad de calcular el área libre de células conforme los fibroblastos la van cubriendo, hace que la cuantificación de la reparación resulte más exacta y dependa menos de la interpretación del observador, como lo demuestra el alto índice de correlación que se obtuvo entre las mediciones efectuadas por observadores independientes.

Como hemos comentado anteriormente, la lesión se practicó mediante una punta rotante de material plástico mantenida de forma manual con la mayor firmeza y precisión posibles. A pesar de aplicar la misma técnica para realizar la lesión, la punta rotante produjo lesiones con morfología ligeramente diferente en dependencia de la destreza y precisión mostradas por el experimentador durante la maniobra. De un total de 2.736 lesiones realizadas, 1.722 fueron consideradas como válidas (figuras 45-49). El resto fueron excluidas del estudio por no presentar morfología redondeada o elíptica, por su tamaño excesivamente grande o pequeño, o por cualquier otra circunstancia que dificultara el cálculo de su área (figura 89). De esta manera se consiguió una mayor uniformidad en la morfología de las úlceras que permitió su comparación.

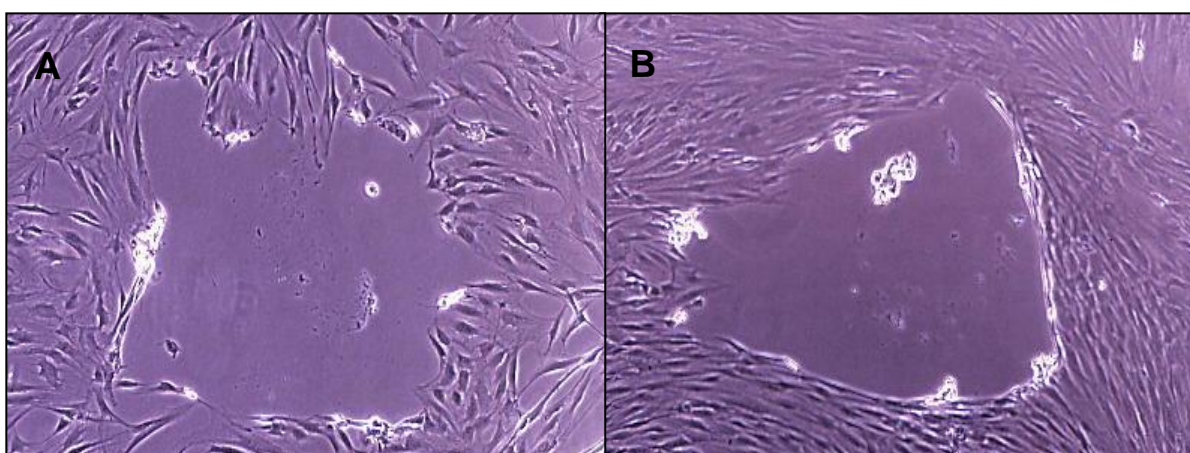


Figura 89. A: Úlcera no válida con morfología irregular. B: Úlcera no válida con morfología no circular y restos de detritus celulares en su superficie. Microscopía de inversión de fases (10X).

1.6.- ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CON EL REACTIVO WST-1.

La toxicidad de una droga *in vitro* puede valorarse con experimentos de diferente naturaleza (211):

-Viabilidad celular: Valora la proporción de células viables tras la aplicación de la droga. La viabilidad viene determinada por los efectos que se producen de forma inmediata o en un período de tiempo corto y que afectan a la permeabilidad de la membrana citoplasmática o que alteran una vía metabólica concreta fundamental para la supervivencia celular.

-Supervivencia: Valora la conservación de la capacidad de renovación celular a largo plazo (5-10 generaciones o más).

-Tests metabólicos: Valoran diferentes aspectos del metabolismo celular como la funcionalidad de las deshidrogenasas de la cadena respiratoria mitocondrial (sales de

tetrazolio), la síntesis de ADN (timidina-[³H*]), la síntesis de ARN (BrdU*) o proteínas, etc, durante la exposición a la droga, inmediatamente o varias generaciones después.

-Transformación: Valora la supervivencia como un proceso patológico por mutación genética o transformación maligna.

-Irritabilidad: Es una respuesta semejante a la inflamación o a la alergia que acontecen *in vivo*. Son situaciones difíciles de reproducir *in vitro*, pero pueden estimarse mediante el estudio de la producción de citoquinas por el cultivo.

La cuantificación de la viabilidad y proliferación celular son dos aspectos fundamentales dentro de la experimentación celular *in vitro*. La mayoría de los experimentos de viabilidad celular se basan en la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática demostrable por la captación de diversos colorantes (azul tripán, eritrosina, etc), frente a los cuales la membrana normal se muestra impermeable, o por la ausencia de captación de colorantes (rojo neutro, diacetil-fluoresceína, etc) que en condiciones normales son captados y retenidos por la célula. Sin embargo el efecto tóxico inmediato de una droga puede alterar solo momentáneamente la membrana celular y, por lo tanto, los resultados de estas pruebas, no siempre predicen con exactitud la viabilidad real de la célula. En nuestros experimentos utilizamos la tinción con azul tripán para valorar la viabilidad celular (tabla 53). Se trata de un método engorroso en su realización si lo comparamos al WST-1, pero sencillo en su valoración, ya que la diferenciación entre células teñidas y no teñidas puede realizarse sin dificultad con microscopía a una magnificación 20X (figura 77). Sin embargo, algunos autores consideran que esta técnica tiende a sobreestimar la viabilidad celular (211). En nuestro estudio la viabilidad celular cuantificada mediante tinción con azul tripán fue, en general, discretamente superior a la cuantificada con el reactivo WST-1 (figuras 68-76).

Tabla 53. Comparación de la metodología de los trabajos que han estudiado el efecto de fármacos sobre la viabilidad de fibroblastos de cápsula de Tenon *in vitro*.

Autor	Revista y año	Tipo celular	Fármacos estudiados	Metodología
Wong V, et al (452)	J Ocul Pharmacol 1991	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	5-FU Citarabina	Tinción con azul tripán
Williams D, et al (57)	IOVS 1992	FHCT	Timolol Betaxolol Levobunolol	Tinción con azul tripán
Handa J, et al (63)	IOVS 1993	FHCT. Células del EPR	Minoxidil	Tinción con azul tripán
Hershkoviz R, et al (55)	IOVS 1994	FHCT	Análogos no peptídicos de la secuencia RGD: SF-6,5 NS-11	Tinción con azul tripán
Saika S, et al (64)	Ophthal Res 1995	Fibroblastos subconjuntivales y queratinocitos de conejo	Etil-3,5-dihidroxi benzoato	Tinción con azul tripán
Cheng Q, et al (54)	Exp Eye Res 1995	FHCT	Aciclovir Amantadina Vidaravina Zidovudina	Tinción con azul tripán
Saika S, et al (56)	Ophthal Res 1997	FHCT	MMC Doxorrubicina	Sales de tetrazolio (MTT)
Paikal D, et al (237)	Exp Eye Res 2000	FHCT	Anticuerpos monoclonales anti integrinas: anti α 2, anti α 3 anti receptor de α 5 (α 5/FnR)	Tinción con azul tripán

FHCT: Fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. IOVS: Invest Ophthalmol Vis Sci.

Las pruebas de incorporación de timidina-[^3H]* al ADN (54, 450) o de la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU*) al ARN, y el test de la hexosaminidasa (N-acetil- β -D-hexosaminidasa) (234) han sido durante mucho tiempo las "pruebas patrón" para estudiar la proliferación celular *in vitro*. En los últimos años se han utilizado con éxito diferentes sales de tetrazolio (MTT, XTT, MTS) para cuantificar la viabilidad y proliferación celular (235). Las sales de tetrazolio son metabolizadas a formazán por las deshidrogenasas de la cadena respiratoria mitocondrial de las células metabólicamente activas contenidas en el cultivo. Un aumento en el número de células produce un incremento paralelo de la actividad enzimática total, y este incremento enzimático se traduce en un aumento de la cantidad de formazán generado. El formazán generado presenta un color rojo-púrpura (más oscuro) y puede cuantificarse midiendo la absorbancia de la solución mediante un espectrofotómetro (lector de ELISA) a una longitud de onda adecuada (442).

El agente más novedoso de este grupo es el WST-1. Este reactivo puede utilizarse para cuantificar la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas,

mitógenos, nutrientes y otros estimuladores del crecimiento, o para valorar el efecto inhibitor del crecimiento o el efecto citotóxico de anticuerpos, drogas, otros mediadores fisiológicos, etc. El WST-1 aporta importantes ventajas frente a sus predecesores (442):

-A diferencia del MTT que es metabolizado a formazán en forma de cristales insolubles en agua y que tiene que ser solubilizado antes de realizar las lecturas de absorbancia, el WST-1, al igual que el XTT y el MTS, es metabolizado a formazán soluble en agua y no precisa reacciones de solubilización previas para ser cuantificado. La reacción completa puede realizarse en un solo paso, no precisa la utilización de disolventes orgánicos volátiles y puede realizarse en una sola microplaca de 96 pocillos.

-El WST-1 posee un tiempo de reacción corto, produciendo una variación del color de la suspensión mucho más rápida que el XTT. Se estima que la reacción es completa en 4 horas con un volumen de $0,7 \cdot 10^4$ células por pocillo. Si se utiliza un número de células superior, no se requieren tiempos de reacción más prolongados.

-El WST-1 no requiere grandes cantidades de células para la reacción. Concentraciones celulares entre $5 \cdot 10^4$ - $10^5/100 \mu\text{l}$ en cada pocillo son adecuadas para una correcta reacción.

-El WST-1 es más termoestable que el XTT y el MTS. El WST-1 se presenta en una solución líquida de color rojo-anaranjado, lista para ser usada y puede conservarse en un rango de temperatura que oscila entre 2°C y -8°C durante varias semanas sin que se produzca una degradación significativa. Esta estabilidad permite que la placa pueda introducirse varias veces a la incubadora para realizar lecturas seriadas de absorbancia. Su metabolito (formazán) presenta un color rojo más oscuro, pudiendo cuantificarse por espectrofotometría a una longitud de onda entre 420 y 480 nm (absorbancia máxima a 440 nm). La estabilidad del color se mantiene durante días.

-El WST-1 es más sensible que el MTT y al menos tan sensible como el XTT (236), ofertando una fuerte correlación entre los valores de absorbancia y el número de células viables.

-Frente a las pruebas con timidina- $^{[3}\text{H}]^*$ y BrdU*, el WST-1 ofrece la seguridad de no precisar la manipulación de sustancias radioactivas.

El WST-1 se ha mostrado útil para cuantificar la proliferación de diferentes tipos celulares (236). Givens (451) evaluó las sales de tetrazolio (MTT), la hexosaminidasa y la captación del rojo neutro como pruebas colorimétricas útiles para realizar estudios de proliferación y viabilidad con fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. Saika (56) utilizó sales de tetrazolio (MTT) en fibroblastos humanos de cápsula de Tenon para valorar el efecto *in vitro* de la doxorubicina y la MMC. Estudios más recientes, realizados por

Cordeiro (53, 58) y Daniels (314), han utilizado con éxito el WST-1 para valorar la proliferación de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. Todo lo anteriormente expuesto, nos decidió a utilizar este método de cuantificación celular, obteniendo unos resultados muy satisfactorios.

Los valores absolutos de absorbancia obtenidos por este método pueden expresarse gráficamente en valores absolutos, pero para que sean significativos deben compararse siempre con los valores de absorbancia obtenidos por los controles. Freshney (211) considera que la forma de expresión gráfica más comprensible son las denominadas "curvas de porcentaje de inhibición" ya que normalizan los valores de absorbancia de cada experimento en función de los valores de absorbancia obtenidos por el control. En nuestro trabajo hemos expresado los resultados de viabilidad e inhibición de la adhesividad como curvas de porcentaje de inhibición.

Para los estudios de proliferación celular los fibroblastos se sembraron en estado subconfluyente y se mantuvieron en incubación durante sólo 24 horas, a diferencia de los estudios de cinética de reparación donde se incubaron durante 48 horas, tiempo en el que alcanzaron la confluencia. El estado subconfluyente es ideal para los estudios de proliferación, ya que las células no contactan con las vecinas, quedando espacio libre para que se adhieran las nuevas células recién divididas, en oposición a las células confluentes que sufren inhibición por contacto y dejan de dividirse. Para poder evaluar los efectos antiproliferativos de los fármacos, tanto en los experimentos de cinética de reparación, como en los de proliferación celular, es deseable que el cultivo celular esté bajo la influencia de algún factor estimulador del crecimiento, por lo que se utilizó medio de cultivo con SBF al 10%, tanto en los pocos casos, como en los controles.

La metodología utilizada en varios estudios de proliferación celular con fibroblastos de cápsula de Tenon se expone en la tabla 54.

Tabla 54. Comparación de la metodología de los trabajos que han estudiado el efecto de fármacos sobre la proliferación de fibroblastos de cápsula de Tenon *in vitro*.

Autor	Revista y año	Tipo celular	Fármacos estudiados	Metodología
Mallick K, et al (66)	Arch Ophthalmol 1985	Fibroblastos subconjuntivales y células epiteliales corneales de conejo	5-FU Citarabina	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>)
Lee D, et al (244)	IOVS 1990	FHCT	MMC Mitramicina Daunorrubicina Bleomicina	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>) Hexosaminidasa Timidina-[³ H*]
Yamamoto T, et al (68)	Ophthalmology 1990	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	MMC 5-FU	Recuento con hemocitómetro

FHCT: Fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. IOVS: Invest Ophthalmol Vis Sci.

Tabla 54. Comparación de la metodología de los trabajos que han estudiado el efecto de fármacos sobre la proliferación de fibroblastos de cápsula de Tenon *in vitro* (continuación).

Autor	Revista y año	Tipo celular	Fármacos estudiados	Metodología
Latina M, et al (52)	IOVS 1991	FHCT	Interferón gamma	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter multisizer</i>)
Wong V, et al (452)	J Ocul Pharmacol 1991	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	5-FU Citarabina	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>) Timidina-[³ H*]
Wilkerson M, et al (47)	IOVS 1992	FHCT	5-FU Inmunotoxina	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>)
Williams D, et al (57)	IOVS 1992	FHCT	Timolol Betaxolol Levobunolol	Timidina-[³ H*] Hexosaminidasa
Handa J, et al (63)	IOVS 1993	FHCT. Células del EPR	Minoxidil	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>)
Hershkoviz R, et al (55)	IOVS 1994	FHCT	Análogos no peptídicos de la secuencia RGD: SF-6,5 y NS-11	Recuento en rejilla con microscopio
Wong J, et al (232)	Exp Eye Res 1994	FHCT	Inhibidores de la angiogénesis: AGM-1470, HC21P y BCD-TDS	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>)
Saika S, et al (64)	Ophthal Res 1995	Fibroblastos subconjuntivales y queratinocitos de conejo	Etil-3,5-dihidroxibenzoato	Recuento con hemocitómetro
Saika S, et al (67)	Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1995	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	Minoxidil	Recuento con hemocitómetro
Cheng Q, et al (54)	Exp Eye Res 1995	FHCT	Aciclovir Amantadina Vidaravina Zidovudina	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>) Hexosaminidasa Timidina-[³ H*]
Saika S, et al (50)	Ophthal Res 1996	Fibroblastos humanos de cápsula de Tenon	Pentoxifilina Pentifilina	Recuento con hemocitómetro
Saika S, et al (49).	Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1996	FHCT	Fibrostatina C	Recuento con hemocitómetro
Saika S, et al (56).	Ophthal Res 1997	FHCT	MMC Doxorrubicina	BrdU*
Kang Y, et al (42)	Exp Eye Res 1997	FHCT	TFP DTZ VPM NIC Dantroleno	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>) Hexosaminidasa Timidina-[³ H*]
Daniels J, et al (229)	Exp Eye Res 1999	FHCT	MMC 5-FU	Recuento en rejilla con microscopio de inversión de fases
Cordeiro M, et al (58)	IOVS 1999	FHCT	Anticuerpo monoclonal anti TGFβ2	WST-1
Paikal D, et al (237).	Exp Eye Res 2000	FHCT	Anticuerpos monoclonales anti integrinas: anti α2, anti α3 y anti receptor de α5 (α5/FnR)	Recuento celular automatizado (<i>Coulter counter</i>) Hexosaminidasa Timidina-[³ H*]
Cordeiro M, et al (53)	IOVS 2000	FHCT	Factores de crecimiento: TGF-β1, -β2 y -β3	WST-1 BrdU*
Daniels J, et al (314)	IOVS 2003	FHCT	Ilomastat	WST-1

FHCT: Fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. IOVS: Invest Ophthalmol Vis Sci.

1.7.- ESTUDIOS DE ADHESIVIDAD CON EL REACTIVO WST-1.

La mayoría de los trabajos que estudian la actividad de una droga sobre la adhesividad fibroblástica *in vitro*, lo hacen adicionando la droga estudiada en el mismo momento o inmediatamente después de realizar la siembra de fibroblastos (42, 54, 57, 237). Tras un periodo de tiempo determinado se procede a aspirar el medio de cultivo, eliminando los fibroblastos no adheridos. Si se realizan lavados posteriores se eliminan totalmente las células no adheridas (tabla 55). Posteriormente puede calcularse el número de células adherentes mediante diversas pruebas de cuantificación celular.

Tabla 55. Comparación de la metodología de los trabajos que han estudiado el efecto de fármacos sobre la adhesividad de fibroblastos de cápsula de Tenon *in vitro*.

Autor	Revista y año	Tipo celular	Fármacos estudiados	Metodología
Wong V, et al (452)	J Ocul Pharmacol 1991	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	5-FU Citarabina	Adición de los fármacos durante la siembra, lavado y cuantificación celular mediante recuento en rejilla, hexosaminidasa y timidina-[³ H*]
Williams D, et al (57)	IOVS 1992	FHCT	Timolol Betaxolol Levobunolol	Adición de los fármacos durante la siembra, lavado y recuento celular con hexosaminidasa
Hershkoviz R, et al (55)	IOVS 1994	FHCT	Análogos no peptídicos de la secuencia RGD: SF-6,5 NS-11	Superficie de cultivo recubierta con laminina y fibronectina. Recuento celular con metionina-[³³ S*]
Cheng Q, et al (54)	Exp Eye Res 1995	FHCT	Aciclovir Amantadina Vidaravina Zidovudina	Adición de los fármacos durante la siembra, lavado y cuantificación celular mediante recuento en rejilla, hexosaminidasa y timidina-[³ H*]
Kang Y, et al (42)	Exp Eye Res 1997	FHCT	TFP DTZ VPM NIC Dantroleno	Adición de los fármacos durante la siembra, lavado y cuantificación celular mediante recuento en rejilla y hexosaminidasa
Paikal D, et al (237)	Exp Eye Res 2000	FHCT	Anticuerpos monoclonales anti integrinas: anti α 2, anti α 3 anti receptor de α 5 (α 5/FnR)	Adición de los anticuerpos durante la siembra, lavado y cuantificación celular mediante recuento en rejilla y hexosaminidasa
Beck R, et al (238)	Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2001	Células epiteliales cristalinas	MBF	Microscopía y estudio de la morfología celular sobre la cápsula posterior del cristalino. Estudio de receptores de integrinas con citometría de flujo. Arquitectura del citoesqueleto y distribución de las subunidades de integrinas β 1 y α 3 con inmunofluorescencia

FHCT: Fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. IOVS: Invest Ophthalmol Vis Sci.

1.8.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Las pruebas de evaluación estadística seleccionadas fueron en su mayoría no paramétricas. Este tipo de pruebas es el elegido por la mayoría de los autores al proporcionar una menor posibilidad de error en grupos pequeños como los que se valoran en el presente estudio.

1.9.- COMPLICACIONES.

La principal complicación durante el periodo de realización de los experimentos con cultivos celulares fue la contaminación de una línea celular, en segundo pase, por *Oerskovia spp.* Se trata de una bacteria Gram (+), perteneciente al grupo de los *Actinomycetos*, cuya presencia fue rápidamente detectada por la gran movilidad que presentaba en el cultivo y por la aparición de despegamientos focales de fibroblastos (figura 90). Esta circunstancia nos obligó a eliminar la línea contaminada, todo el material de cultivo utilizado hasta ese momento y reiniciar una nueva línea celular.

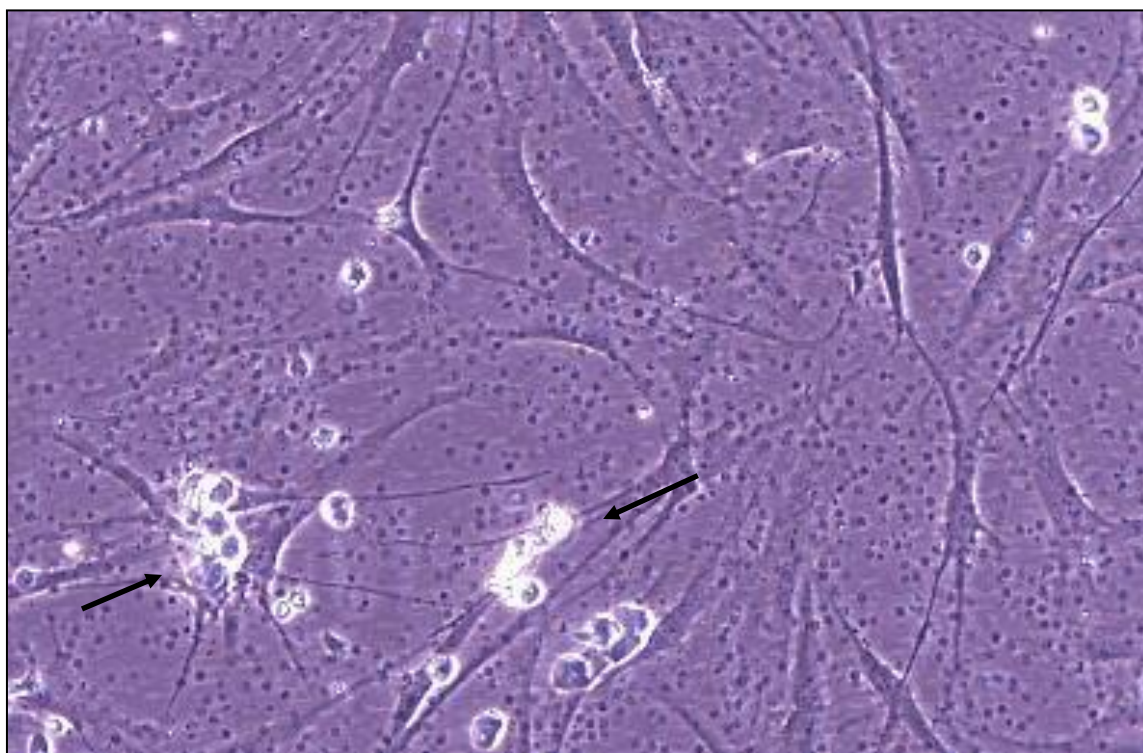


Figura 90. Contaminación por *Oerskovia*. Monocapa no confluyente de fibroblastos en la que se aprecian despegamientos focales de los fibroblastos de la superficie de cultivo (flechas negras) y un fino punteado oscuro correspondiente a las bacterias. Microscopía de inversión de fases (20X).

2.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO SOBRE LA CINÉTICA DE REPARACIÓN *IN VITRO*.

Una vez establecido el modelo, evaluamos la cinética de reparación cuantificando el área libre de fibroblastos de una manera secuencial a las 18, 24 y 48 horas después de realizar la lesión.

Existen muy pocos trabajos en la literatura que hayan estudiado el comportamiento de células humanas de origen ocular en modelos de lesión *in vitro*, y muchos menos que lo hayan hecho con fibroblastos humanos de cápsula de Tenon (tabla 56). Sólo Pinilla (449), en nuestro grupo de trabajo, ha estudiado el efecto de un ICC (NIC) sobre la cinética de reparación celular *in vitro* sobre monocapas de fibroblastos.

Hoffman (444) estudió el efecto de los ICC sobre un modelo de lesión *in vitro* con células de origen ocular. Este autor realizó lesiones circulares en monocapas confluentes de células del EPR con la hoja de una cuchilla de afeitar para estudiar el efecto de DTZ, VPM y NIF sobre la migración celular. Tras 24 horas realizó una fijación con paraformaldehído, seguida de tinción de Richardson y recuento celular del área denudada. En este estudio el VPM inhibió significativamente la migración de las células del EPR en un rango de concentraciones entre 10^{-5} M (inhibición máxima de la migración, con un 57%) y 10^{-7} M (inhibición del 30%). A diferencia del VPM, el DTZ y el NIF, no presentaron ningún efecto significativo sobre la migración de las células del EPR en el rango de concentraciones 10^{-5} - 10^{-7} M. Utilizando una metodología diferente, Uchihori (61) estudió el efecto del NIF (1-10 μ M) sobre los fenómenos de proliferación y quimiotaxis *in vitro* de células neurogliales de retina humana sometidas a estimulación por el PDGF (32 ng/ml). El NIF redujo la quimiotaxis en membranas de policarbonato, con un patrón dosis dependiente y una DI_{50} aproximada de 5 μ M. La viabilidad celular, cuantificada mediante tinción de azul tripán, no se redujo significativamente tras la exposición a 10 μ M de NIF durante 48 horas.

Tabla 56. Metodología de los estudios que han utilizado modelos de lesión *in vitro* sobre células de origen ocular.

Autor	Revista Año	Tipo celular	Fármacos estudiados	Metodología de realización de la lesión	Metodología de estudio de la cinética de reparación
Yoshida A, et al (447)	IOVS 1989	Células endoteliales corneales de conejo. Córneas completas transferidas <i>in vitro</i>	Indometacina EGF	Traumatismo con punta de micropipeta bajo observación con microscopía especular	Fotografías digitalizadas y cálculo del área mediante programa informático
Joyce N, et al (248)	IOVS 1989	Células endoteliales corneales de conejo. Córneas completas transferidas <i>in vitro</i>	Indometacina EGF	Traumatismo con punta de micropipeta bajo observación con microscopía especular	Fotografías digitalizadas y cálculo del área mediante programa informático
Latina M, et al (52)	IOVS 1991	FHCT	Interferón gamma	Lesión circular por compresión de una monocapa confluyente de fibroblastos con discos de Millipore	Fotografías digitalizadas y cálculo del área mediante programa informático
Wong J, et al (232)	Exp Eye Res 1994	FHCT	Inhibidores de la angiogénesis: AGM-1470 HC21P BCD-TDS	Lesión circular por compresión de una monocapa confluyente de fibroblastos con discos de Millipore	Fotografías digitalizadas y cálculo del área mediante programa informático
Saika S, et al (67)	Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1995	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	Minoxidil	Lesión lineal por rascado de una monocapa confluyente de fibroblastos con punta de silicona	Fotografías con microscopio y medición de la distancia recorrida
Saika S, et al (64)	Ophthalmic Res 1995	Fibroblastos subconjuntivales de conejo	Etil-3,4- dihidroxibenzoato	Lesión lineal por rascado de una monocapa confluyente de fibroblastos con punta de silicona	Fotografías con microscopio y medición de la distancia recorrida
Hoffman S, et al (444)	Exp Eye Res 1998	Células del EPR humanas	DTZ VPM NIF	Lesión circular de una monocapa confluyente de fibroblastos con una hoja de cuchilla de afeitar	A las 24 horas fijación con paraformaldehído, tinción de Richardson y recuento celular del área denudada
Pinilla I, et al (449)	Arch Soc Esp Oftalmol 2000	FHCT	NIC	Lesión circular por punta rotante de polivinilo.	Observación microscópica y medición y cálculo del área libre de células

FHCT: Fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. IOVS: Invest Ophthalmol Vis Sci.

En nuestro modelo de lesión con fibroblastos, el VPM inhibió significativamente la migración a las 24 horas con concentraciones discretamente superiores ($\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 horas, $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 24 horas y $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 48 horas), pero en menor proporción que la observada por Hoffman (444) para las células del EPR. El efecto máximo lo presentó VPM $5 \cdot 10^{-5}$ M con una inhibición respecto al control del 18% a las 18 horas, 23% a las 24 horas y 35% a las 48 horas (tablas 20 y 21). Al igual que en ocurrió en nuestros

experimentos, Hoffman describe la pérdida de adhesividad celular con VPM 10^{-4} M. Los resultados obtenidos por Hoffman (444) con DTZ y NIF son similares a los obtenidos en nuestro trabajo, ya que en nuestro modelo de lesión *in vitro*, el DTZ y el NIF sólo inhibieron la migración fibroblástica a las 24 y 48 horas con concentraciones $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M. Las concentraciones de DTZ y NIF $\leq 10^{-5}$ M no presentaron diferencias significativas respecto al control en ninguno de los tres momentos del estudio. El resto de las dihidropiridinas estudiadas en nuestro trabajo presentaron un patrón de comportamiento muy similar en cuanto a su influencia sobre la cinética de reparación *in vitro*. A las 18 horas las concentraciones de NIC y NIM $\geq 10^{-5}$ M, y de NIF, NIT y NIS $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M redujeron significativamente la migración fibroblástica. Al final del experimento (48 horas) el NIM, NIT y NIS presentaron diferencias significativas respecto al control con concentraciones $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M.

Los niveles de Ca^{++} intracelular y la C_m son dos de los principales mediadores de los fenómenos de adhesividad y, por lo tanto, de migración de las células. La motilidad celular puede modularse por fármacos que reducen el Ca^{++} intracelular o que bloquean la C_m (455). Soong (311) demostró como varios inhibidores de la C_m , entre ellos la TFP, en un rango de concentración entre 10 y 20 μ M en 48 horas, era capaz de inhibir la migración de las células epiteliales corneales de rata *in vitro*. Grabski (59) ha demostrado la capacidad de dos fenotiazinas, TFP y clorpromazina, para reducir la migración de los linfocitos T sobre monocapas de fibroblastos por mecanismos diferentes a la inhibición de la actividad del CaC_m . La inhibición de la migración fue significativa con concentraciones de TFP $\geq 2,25$ μ M. En nuestro trabajo la TFP también inhibió la migración fibroblástica a las 18 horas con concentraciones $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M, con una reducción superior al 28% respecto al control. Tras 48 horas de exposición, las diferencias significativas respecto al control llegaron hasta las concentraciones de TFP $\geq 5 \cdot 10^{-6}$ M.

En nuestro trabajo el MBF fue el inhibidor de la migración, proliferación y adhesividad fibroblástica más potente de todos los fármacos estudiados. El MBF inhibió significativamente la migración fibroblástica con concentraciones $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 18 horas (migración un 30% menor que el control), $\geq 5 \cdot 10^{-6}$ M a las 24 horas y $\geq 10^{-6}$ M a las 48 horas sin afectar la viabilidad celular.

3.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DEL CALCIO COMO INHIBIDORES DE LA PROLIFERACIÓN Y ADHESIVIDAD FIBROBLÁSTICAS *IN VITRO*.

Numerosos estudios han demostrado la capacidad de los ICC como inhibidores de la proliferación y adhesividad celulares. Aunque la mayoría de las investigaciones se han centrado en el estudio de sus efectos sobre el aparato cardiovascular, los ICC presentan potencial antiproliferativo sobre células de otros orígenes. Por el momento son escasos los trabajos que han investigado la actividad antiproliferativa de los ICC sobre células humanas de origen ocular *in vitro* (tabla 57).

La inhibición del complejo CaCm y otros mecanismos de acción, diferentes a los presentados por otros ICC y actualmente mal definidos, pueden explicar por qué la TFP requiere concentraciones inferiores a la mayoría de los ICC para demostrar su actividad antiproliferativa. MacNeil (453) demostró la correlación directa existente entre la potencia de una droga para inhibir la actividad de la Cm y su actividad inhibidora de la proliferación de queratinocitos dérmicos. El complejo CaCm activa diversas proteíncinasas vitales para la proliferación celular (45). El aumento de la concentración de Cm reduce la cantidad de Ca⁺⁺ necesario para activar las enzimas CaCm dependientes. De la misma forma, el aumento de la concentración de Ca⁺⁺ reduce la cantidad de Cm necesaria para activar las enzimas CaCm dependientes (454). La TFP, inhibiendo la actividad de la Cm, aumenta la cantidad de Ca⁺⁺ precisa para la proliferación celular.

Los niveles de Ca⁺⁺ intracelular y la Cm son dos de los principales mediadores de los fenómenos de adhesividad entre las células, como las células del EPR y las proteínas de la MEC. Esta adhesividad puede modularse por fármacos que reducen el Ca⁺⁺ intracelular o que bloquean la Cm (455). Sin embargo, Grabski (59) ha demostrado la capacidad de dos fenotiazinas, TFP y clorpromazina, para reducir la migración de los linfocitos T sobre monocapas de fibroblastos por mecanismos diferentes a la inhibición de la actividad del CaCm.

Entre los mecanismos antiproliferativos de la TFP también se encuentra la inhibición directa de la PKC (392), la inhibición del metabolismo del IP₃ y el bloqueo de los canales del Ca⁺⁺ y K⁺ (59). La TFP 10⁻⁵ M interfiere la organización de los microfilamentos intracelulares, la morfología externa celular, la formación de microvellosidades, la motilidad y el crecimiento celular de múltiples tipos de células. El estudio mediante anticuerpos fluorescentes anti-actina revela que la TFP induce una organización aberrante de los filamentos de la actina, proteína que es fundamental para la formación y organización del citoesqueleto y que está implicada en los fenómenos de motilidad celular (310). La TFP también inhibe la formación y maduración de los hemidesmosomas (312).

Tabla 57. Trabajos que han estudiado el efecto de los inhibidores del calcio sobre los mecanismos reparativos de células humanas de origen ocular *in vitro*.

Autor	Revista Año	Tipo celular	Fármacos estudiados	Mecanismo estudiado	Metodología
Uchihori Y, et al (61)	IOVS 1991	Células neurogliales de la retina	PDGF NIF	Proliferación	BrdU*
				Migración (quimiotaxis)	Membrana de policarbonato (<i>Boyden chamber</i>)
				Viabilidad	Azul tripán
Hoffman S, et al (415)	IOVS 1996	Células del EPR	VPM	Proliferación	Recuento celular con hemocitómetro
				Viabilidad	Azul tripán
Singh K, et al (473)	IOVS 1997	Fibroblastos de cápsula de Tenon	Indometazina Claritromicina Colchicina VPM Captopril	Proliferación	Timidina-[³ H*]
				Producción de colágeno	Hidroxiprolina-[³ H*]
Kang Y, et al (42)	Exp Eye Res 1997	Fibroblastos de cápsula de Tenon	TFP DTZ VPM NIC Dantroleno	Proliferación	Recuento celular con microcopio Timidina-[³ H*] Hexosaminidasa
				Adhesividad	Adición del fármaco durante la siembra, lavado y recuento celular con microscopio y hexosaminidasa
Hoffman S, et al (444)	Exp Eye Res 1998	Células del EPR	DTZ VPM NIF	Proliferación	Recuento celular con hemocitómetro. Timidina-[³ H*]
				Migración	Lesión circular con hoja de cuchilla de afeitar en monocapa confluyente. A las 24 horas fijación con paraformaldehído, tinción de Richardson y recuento celular del área denudada
				Viabilidad	Azul tripán
Smith-Thomas L, et al (46)	Curr Eye Res 1998	Células del EPR	VPM TMB8 Tamoxifeno J8	Proliferación	MTT BrdU*
				Pigmentación	Espectrofotometría
Pinilla I, et al (449)	Arch Soc Esp Oftalmol 2000	FHCT	NIC	Migración	Modelo de lesión circular <i>in vitro</i> por punta rotante de polivinilo. Cuantificación por observación microscópica y cálculo del área libre de células las primeras 18 horas
				Migración y proliferación	Cuantificación por observación microscópica y cálculo del área libre de células entre las 24 y 48 horas
Beck R, et al (238)	Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2001	Células epiteliales cristalinas	MBF	Adhesividad	Microscopía y estudio de la morfología celular sobre la cápsula posterior del cristalino
				Receptores de integrinas	Citometría de flujo
				Arquitectura del citoesqueleto y distribución de las subunidades de integrinas $\beta 1$ y $\alpha 3$	Inmunofluorescencia

IOVS: Invest Ophthalmol Vis Sci.

La TFP inhibe la proliferación de células pulmonares tumorales A549 y embrionarias. También inhibe la proliferación de las células acinares de la glándula parótida. Con una DI_{50} de 5 mM, la TFP inhibe la proliferación de fibroblastos procedentes de tumoraciones prostáticas (456).

La mayoría de los autores que han estudiado el efecto de la TFP sobre células de origen ocular se han centrado en el epitelio corneal y en células del EPR. La TFP (10-20 μ M) es capaz de inhibir la migración de las células epiteliales corneales de rata *in vitro*, pero no las de conejo, por un mecanismo dependiente de la inhibición del metabolismo de la actina (311). Van-Bockxmeer (457) demostró cómo la TFP inhibía la proliferación y contracción celular en un modelo tridimensional de retinopatía proliferante *in vitro*. Matsumura (458) estudió cómo varias fenotiazinas, entre ellas la TFP, a concentraciones 10^{-5} - 10^{-14} M inhibían *in vitro* la fagocitosis de partículas de látex por células del EPR de pollo. Más recientemente, Smith-Thomas (46) estudió el efecto de dos ICC (VPM y TMB8) y de dos antagonistas de la Cm (tamoxifeno y J8), por separado o en combinación, sobre la proliferación y pigmentación *in vitro* de las células del EPR sometidas a la estimulación por diversos mitógenos (PDGF, $TGF\beta 1$) en un ambiente de cultivo similar al gel vítreo. Las cuatro drogas por separado inhibieron significativamente la proliferación de las células del EPR. La combinación de J8 (40 μ M) y VPM (50 μ M) mostró la inhibición más efectiva, sugiriendo que los ICC y los inhibidores de la Cm tienen un efecto aditivo como inhibidores de la proliferación celular.

En nuestro grupo de trabajo, Izaguirre (459) estudió el efecto antiproliferativo *in vitro* de la inyección subconjuntival postquirúrgica de TFP 10^{-2} - 10^{-4} M en la cirugía filtrante del conejo. Las biopsias conjuntivales y esclerales, obtenidas una hora después de la inyección en la zona tratada y a 90° , fueron incubadas durante 12 días. Los grupos tratados con TFP mostraron una reducción de la proliferación fibroblástica, tanto en las muestras esclerales, como conjuntivales. Las diferencias respecto al control, fueron significativas en todo el rango de concentración estudiado a los 3, 6, 9 y 12 días.

Kang (42) demostró la capacidad de la TFP para inhibir la proliferación de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon *in vitro*. La TFP fue más potente que DTZ, VPM y NIC ya que su rango de actividad se situó en concentraciones inferiores a las presentadas por estos tres fármacos. La TFP inhibió significativamente la proliferación fibroblástica, con unas DI_{50} en el rango $5 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-7}$ M, con una DI_{50} de $7,917 \cdot 10^{-7}$ M a las 24 horas con la prueba de la captación de timidina- $[^3H^*]$, siendo muy superiores las obtenidas mediante recuento celular ($DI_{50} = 2,634 \cdot 10^{-5}$ M) y hexosaminidasa ($DI_{50} = 4,303 \cdot 10^{-5}$ M). La TFP también fue más potente que DTZ, VPM y NIC como inhibidora de

la adhesividad fibroblástica, con una DI_{50} de $3,208 \cdot 10^{-5}$ M con la prueba de la hexosaminidasa y $2,597 \cdot 10^{-5}$ M con técnica de recuento celular a las 24 horas, presentando una inhibición de la adhesividad del 95% con la concentración 10^{-3} M.

En nuestra experiencia la TFP se comportó de manera similar respecto al DTZ, VPM y NIC, ya que, de las cuatro drogas, fue la que mejor inhibió la proliferación y adhesividad fibroblásticas. La proliferación fue significativamente inferior a la del control con concentraciones de TFP $\geq 2,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 24 horas, con una DI_{50} de $3,186 \cdot 10^{-5}$ M, valor intermedio al determinado por Kang mediante recuento celular y hexosaminidasa. En nuestro trabajo, las concentraciones de TFP, VPM y NIC $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M presentaron una inhibición de la adhesividad significativamente superior a la del control. Sin embargo, la DI_{50} requerida por TFP ($DI_{50} = 1,289 \cdot 10^{-5}$ M) fue muy inferior respecto a la de VPM ($DI_{50} = 5,248 \cdot 10^{-5}$ M) y discretamente inferior a la de NIC ($DI_{50} = 1,525 \cdot 10^{-5}$ M). La inhibición de la adhesividad del 95% se consiguió en el rango de concentraciones 10^{-3} - 10^{-4} M.

En concentraciones de 10 mM, el DTZ inhibe la síntesis de ADN inducida por angiotensina II y PDGF en células musculares lisas de origen vascular (460). El DTZ en concentraciones 10^{-5} M, presenta menor potencial que el VPM como inhibidor de la proliferación de células mesangiales (sólo un 30% frente al 80% de VPM) (417). El DTZ reduce el crecimiento de las células de meningiomas en cultivo con una intensidad dosis dependiente (414).

El DTZ también inhibe *in vitro* la producción de colágeno por fibroblastos y células musculares lisas vasculares en concentraciones nM (420). Wada (461) estudió el efecto del DTZ sobre la proliferación *in vitro* de células musculares lisas vasculares sometidas a estimulación con PDGF (10 ng/ml). La prueba de captación de BrdU* demostró que el DTZ (10^{-5} - 10^{-6} M) inhibió la proliferación celular con un patrón dosis dependiente y redujo la actividad colagenolítica de la metaloproteinasa-1 cuatificada por *Western blot*. En fibroblastos NIH 3T3, el DTZ requiere concentraciones superiores al VPM (concentraciones de 10^{-4} M para el DTZ, frente a 10^{-5} M para el VPM) para inhibir la síntesis de ARN (462).

El efecto del DTZ ha sido estudiado sobre células del EPR y fibroblastos de cápsula de Tenon humanos *in vitro*. Kirmani (72) estudió la relajación producida por DTZ (10^{-5} M) sobre las membranas fibrocelulares generadas en un modelo de vitreorretinopatía proliferante postraumática en el conejo. Hoffman (444) demostró cómo el DTZ es capaz de inhibir la proliferación de células del EPR humano con concentraciones 100 μ M (superiores a las requeridas por VPM), con una DI_{50} de 95 μ M. El DTZ no inhibió la migración de este tipo celular en el rango de concentraciones 10-0,1 μ M. Únicamente Kang ha valorado el

potencial antiproliferativo del DTZ en fibroblastos humanos de cápsula de Tenon *in vitro* (42). Su rango de actividad se situó entre 10^{-4} y 10^{-5} M. El DTZ inhibió significativamente la proliferación fibroblástica en las primeras 24 horas del estudio, con unas DI_{50} de $2,478 \cdot 10^{-4}$ M con la prueba de la captación de timidina- $[^3H^*]$, de $2,119 \cdot 10^{-4}$ M mediante recuento celular y $3,622 \cdot 10^{-4}$ M por el test de la hexosaminidasa, y también redujo la adhesividad celular con una DI_{50} de $3,745 \cdot 10^{-4}$ M con la prueba de la hexosaminidasa y $2,184 \cdot 10^{-4}$ M con técnica de recuento celular. Al igual que ocurre con VPM, estas concentraciones inhibitorias son, en general, superiores a las requeridas por otros tipos de células, como las células del EPR (444).

En nuestro trabajo el DTZ inhibió significativamente la proliferación fibroblástica a las 24 horas con concentraciones $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M, con una DI_{50} de $1,086 \cdot 10^{-4}$ M, muy similar a la obtenida por Kang (42) y discretamente superior a la obtenida por Hoffman (444) con células del EPR. En nuestro estudio el DTZ inhibió la adhesividad de forma significativa en concentraciones $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M (inhibición del 23,5%), con una DI_{50} de $8,322 \cdot 10^{-5}$ M, una inhibición discretamente superior a la observada por Kang, pero con porcentajes de inhibición respecto al control muy similares en la concentración 10^{-3} M (95,5% en nuestro estudio y 98% en el estudio de Kang) (42).

El mecanismo de acción antiproliferativo del DTZ debe ser múltiple y muy similar al que presenta el VPM. El DTZ se ha mostrado efectivo para inhibir el crecimiento de los fibroblastos Swiss 3T3. Este tipo de fibroblastos no expresan en su membrana citoplasmática el CCVD-L, lo cual sugiere que deben existir otros mecanismos de acción alternativos, además de la inhibición de los CCVD, por los cuales el DTZ interfiere la proliferación celular (444). El DTZ puede actuar inhibiendo la unión de diferentes factores estimuladores de la mitosis celular con sus receptores en la membrana citoplasmática y/o puede producir un desajuste en el acoplamiento entre la activación del receptor y el sistema de transmisión de señales que transmite la información a través de la membrana citoplasmática. En células endoteliales procedentes de la arteria umbilical de fetos humanos, estimuladas con FGFb, el DTZ es capaz de reducir la proliferación celular, estudiada con las pruebas de timidina- $[^3H^*]$ y BrdU*, y bloquea la progresión del ciclo celular en fase G0/G1 (463). En las plaquetas, el DTZ bloquea la unión de varios agentes α -adrenérgicos con sus receptores de membrana y reduce la entrada de Ca^{++} mediada por los receptores α -adrenérgicos (principalmente α 1-adrenérgicos). El DTZ inhibe la producción de IP_3 , DG, reduce el incremento de Ca^{++} citosólico mediado por PDGF e inhibe la activación de la PLA_2 (464).

A concentraciones que oscilan entre 10^{-6} y 10^{-4} M el VPM *in vitro* inhibe la proliferación celular y la síntesis de colágeno en células procedentes de la lámina íntima de la arteria aorta y la migración de las células endoteliales vasculares (465). En concentraciones de 100 mM inhibe la síntesis de ADN y la proliferación de células musculares lisas (466). El VPM también inhibe la proliferación de células musculares lisas y la hiperplasia de la íntima de *by-pass* venosos, mejorando su índice de permeabilidad a largo plazo (467).

El VPM en concentraciones 10^{-5} M es capaz de inhibir la proliferación de las células mesangiales del glomérulo renal en un 80% (417). A concentraciones entre 1 y 100 mM el VPM inhibe la proliferación y la formación de rosetas por los linfocitos humanos de sangre periférica (468). En las plaquetas, el VPM inhibe la síntesis de TXA_2 , factor necesario para la activación de las mismas.

El VPM reduce el crecimiento de las células de meningiomas en cultivo con una intensidad dosis dependiente (414). El VPM es también capaz de inhibir el crecimiento de otros tipos de células tumorales cerebrales, o de otros orígenes, *in vitro*.

El VPM también ha demostrado actividad antiproliferativa frente a los fibroblastos. Batra (456) demostró que el VPM inhibe *in vitro* la proliferación de fibroblastos humanos obtenidos de tumoraciones prostáticas con una DI_{50} de $5,5 \cdot 10^{-2}$ M. En concentraciones de 10^{-5} M, el VPM inhibe la proliferación celular cuantificada por el test de BrdU* en fibroblastos NIH 3T3 (462). Levine (469) y otros autores han utilizado con buenos resultados inyecciones intralesionales de VPM en las placas de fibrosis presentes en la enfermedad de Peyronie.

Lee y Ping (470), utilizando radioligandos, demostraron que el VPM a una concentración de 100 mM inhibe en un 80% la incorporación de prolina a la matriz de colágeno sintetizado en un cultivo de fibroblastos de origen bovino. La interacción que los ICC, entre ellos el VPM, ejercen sobre el metabolismo de la MEC generada por fibroblastos y células musculares lisas vasculares en cultivo también ha sido recientemente demostrada por Roth (420).

El VPM ha demostrado su capacidad antiproliferativa en células de origen ocular. A concentraciones de 0,25 mg/ml ($\approx 5,5 \cdot 10^{-4}$ M) el VPM inhibe *in vitro* el crecimiento de explantes obtenidos a partir de membranas epirretinianas, prerretinianas y subretinianas extraídas por vitrectomía *vía pars plana* (471). El efecto del VPM, DTZ y NIF sobre la proliferación, migración de células del EPR humanas *in vitro* fue estudiado por Hoffman (444). El VPM consiguió una inhibición de la proliferación superior a la de DTZ y NIF, en un rango de concentraciones entre 10 y 100 μM , con unas DI_{50} de 14,6 μM por recuento

celular y de 11,3 μM mediante la incorporación de timidina- $[\text{}^3\text{H}^*]$, sin afectar la viabilidad celular en ese rango de concentraciones. El VPM también fue el inhibidor de la migración más potente en un rango de concentraciones de 0,1-10 μM . Otros estudios también han demostrado la inhibición de la proliferación de las células del EPR *in vitro* con VPM solo, o en combinación con otros fármacos. Smith-Thomas (46) demostró la inhibición de la proliferación de células del EPR *in vitro* con VPM (50 μM). La combinación de VPM (50 μM) y el inhibidor de la Cm J8 (40 μM) presentó una inhibición muy superior, demostrando el efecto sinérgico, sobre la proliferación celular, de la combinación de un bloqueador de los CCVD-L y un inhibidor de la Cm. El VPM también ha demostrado su potencial como inhibidor de la contracción de las células del EPR de conejo en cultivo (472). Por lo tanto, la inhibición farmacológica que el VPM ejerce sobre la proliferación, migración y contracción de las células del EPR podría tener una potencial aplicación en el tratamiento de la vitreorretinopatía proliferante.

Por el momento, existen muy pocos trabajos que hayan estudiado el potencial antiproliferativo de VPM en fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. Kang (42) demostró la inhibición de la proliferación y adhesividad celular *in vitro* con VPM en concentraciones situadas en el intervalo $5 \cdot 10^{-5}$ - 10^{-4} M. El VPM sólo inhibió significativamente la proliferación fibroblástica durante las primeras 24 horas, presentando unas DI_{50} de $4,100 \cdot 10^{-5}$ M con la prueba de captación de timidina- $[\text{}^3\text{H}^*]$, $2,816 \cdot 10^{-4}$ M por recuento celular y $2,208 \cdot 10^{-4}$ M por la prueba de la hexosaminidasa. La inhibición de la adhesividad a las 24 horas presentó una DI_{50} de $2,922 \cdot 10^{-4}$ M con el test de la hexosaminidasa y $2,664 \cdot 10^{-4}$ M con técnicas de recuento celular. Estas concentraciones inhibitorias son, en general, superiores a las requeridas por otros tipos de células, como las células del EPR (444). Singh (473) demostró, mediante las pruebas de incorporación de timidina- $[\text{}^3\text{H}^*]$ e hidroxiprolina- $[\text{}^3\text{H}^*]$, cómo el VPM reducía la proliferación de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon y su producción de colágeno *in vitro* tras 1 y 3 días de exposición.

En nuestro trabajo el VPM redujo significativamente la proliferación fibroblástica con concentraciones $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 24 horas con una DI_{50} de $9,456 \cdot 10^{-5}$ M, valor intermedio a los obtenidos por Kang (42) con timidina- $[\text{}^3\text{H}^*]$ y con recuento celular y hexosaminidasa, y discretamente superior a los obtenidos por Hoffman (444). La adhesividad fibroblástica fue significativamente inferior a la del control con concentraciones de VPM $\geq 7,5 \cdot 10^{-6}$ M (inhibición del 18%), con una DI_{50} de $5,248 \cdot 10^{-5}$ M.

El mecanismo por el cual el VPM ejerce su actividad antiproliferativa es actualmente desconocido en su totalidad. El VPM, al igual que el DTZ, también se ha mostrado efectivo

para inhibir el crecimiento de los fibroblastos Swiss 3T3. Por lo tanto, deben existir otros mecanismos de acción alternativos, además de la inhibición de los CCVD, por los cuales el VPM interfiere la proliferación celular (444). Al igual que ocurre con el DTZ, el VPM puede actuar inhibiendo la unión de diferentes factores estimuladores de la mitosis celular con sus receptores en la membrana citoplasmática y/o puede producir un desajuste en el acoplamiento entre la activación de receptor y el sistema de transmisión de señales que transmite la información a través de la membrana citoplasmática. En células endoteliales procedentes de la arteria umbilical de fetos humanos, estimuladas con FGFb, el VPM es capaz de reducir la proliferación celular y bloquear la progresión del ciclo celular en fase G0/G1 (463).

En las plaquetas, el VPM puede bloquear la unión de varios agentes α -adrenérgicos con sus receptores de membrana y reducir la entrada de Ca^{++} mediada por los receptores α -adrenérgicos (principalmente α 1-adrenérgicos) (464). En las células musculares lisas vasculares el VPM inhibe el metabolismo del IP_3 , la producción de DG y, en último término, el incremento de Ca^{++} citosólico que, en condiciones normales, induce el PDGF. Como ya vimos con anterioridad, el IP_3 y el DG son segundos mensajeros intracelulares que promueven la liberación de Ca^{++} desde sus depósitos intracelulares y la entrada de Ca^{++} extracelular a través de los canales de membrana. El DG estimula la PKC, y ésta, a su vez, activa las proteínas necesarias para la proliferación celular. Algunos estudios sugieren la capacidad del VPM para inhibir de forma reversible la actividad de la PKC (392). Este hecho es, según algunos autores, uno de los factores fundamentales que puede explicar el mayor poder antiproliferativo del VPM respecto a otros ICC (444). Sin embargo, el mecanismo exacto por el que el VPM inhibe la PKC es desconocido.

Por lo tanto, el VPM inhibe varios de los mecanismos que intervienen en la proliferación celular y en la cicatrización. Varios modelos de experimentación quirúrgica animal han demostrado que los ICC pueden reducir los fenómenos cicatriciales consecuentes a la cirugía. Steinleitner (422) demostró en un modelo quirúrgico experimental en el conejo, consistente en la sección del cuerno uterino izquierdo, la utilidad de la inyección postquirúrgica intraperitoneal de VPM 2,5 mg/Kg/hora para prevenir la formación de adherencias intraabdominales postquirúrgicas. En una experiencia similar, Kappas (474) demostró la utilidad de 1 mg/Kg de VPM intravenoso para reducir las adherencias peritoneales postquirúrgicas un modelo experimental en ratas.

Siegner (407) estudió la farmacocinética ocular del VPM en el conejo. Sus resultados demuestran cómo el VPM administrado tópicamente es rápidamente absorbido y puede ser detectado mediante HPLC en el humor acuoso, humor vítreo y sangre. La presencia de

norverapamilo, el metabolito activo del VPM, en humor acuoso y vítreo sugiere la degradación enzimática intraocular del VPM. Hasta el momento sólo Gupta (313, 475) ha estudiado la aplicación de VPM en la cirugía filtrante en un modelo experimental animal en conejos. Administró VPM (1,25 mg en 0,5 ml) en inyección subconjuntival a 180° del lugar de la cirugía durante los 6 días posteriores a la realización de cirugía filtrante. El VPM superó significativamente al control durante más de 20 días tras la cirugía en la reducción de la PIO y en el mantenimiento de la ampolla de filtración sin mostrar signos de toxicidad importantes. En las muestras histológicas el VPM redujo significativamente el grosor del tejido cicatricial y el estudio inmunohistoquímico reveló una reducción en el número de fibroblastos marcados con BrdU* en el área de la esclerotomía.

Recientemente, Shin (476) no encontró diferencias significativas respecto al placebo en los seis primeros meses del postoperatorio de 56 ojos de 56 pacientes con glaucoma crónico simple, sometidos a trabeculectomía, revisión de trabeculectomía tras cirugía fallida, trabeculectomía combinada con cirugía de catarata o implantación de un sistema de drenaje tipo Molteno, en los que administró VPM 0,25% tópico cuatro veces al día durante el primer mes tras la intervención.

El MBF es una fenilalquilamina-benzoimidazol, con capacidad para bloquear los CCVD-T y -L. A concentraciones superiores, el MBF también bloquea los CCVD-N, -Q y -R, y los canales de K⁺ y Cl⁻. El MBF presenta selectividad sobre los CCVD-T. En cultivos de células musculares vasculares de rata el MBF, a concentraciones de 1-10 µM/l, bloquea el 100% de los CCVD-T y un 25-70% de los CCVD-L (477).

Recientes estudios han demostrado las propiedades antiproliferativas del MBF en el aparato cardiovascular. Para algunos autores como Schmitt (478), la capacidad del MBF para inhibir la proliferación de las células musculares lisas vasculares *in vitro* e *in vivo* depende de su capacidad para bloquear los CCVD-T. Estos canales se expresan en las membranas citoplasmáticas de las células que presentan altos índices de replicación (479). En un modelo de lesión vascular en la rata mediante compresión con balón de la arteria carótida, el MBF redujo en un 54% el área de neointima formada tras 14 días de compresión y redujo el número de células musculares lisas que proliferaron *in vitro* en un 50% respecto al control (436). El MBF en ratas espontáneamente hipertensas, reduce la hipertrofia y la fibrosis miocárdica por acción directa sobre el cardiomiocito y el fibroblasto y previene la infiltración por células mononucleares del subendotelio de la aorta. En estos animales, el MBF (30 mg/kg/día por vía oral) reduce el grosor de las arterias cerebrales y de la aorta, y elimina la aparición de necrosis fibrinoide en la íntima (480). Por el contrario, los ICC que actúan sobre los CCVD-L, como el VPM, o las dihidropiridinas amlodipino o

felodipino, no previenen la formación de neoíntima a las dosis que producen una reducción similar de la presión arterial. Por lo tanto, es posible que los CCVD-T promuevan el crecimiento y la proliferación celular (432, 437). El MBF (20 μ M) inhibe en un 43% la formación de microtúbulos en las células endoteliales vasculares de rata mantenidas en cultivo con Matrigel® y a concentraciones 10-30 μ M inhibe la proliferación de células endoteliales humanas en cultivos de fibrina sometidas a estimulación del crecimiento con FGFb y TNF α (481).

Bertolesi (482) demostró cómo la proliferación de algunas líneas celulares con alto índice mitogénico que expresan en su membrana el CCVD-T, como las células Y79 y WERI-Rb1 del retinoblastoma y las células MCF7 del cancer epitelial de pulmón, es inhibida por el MBF y la pimozida, con unas DI₅₀ entre 0,6 y 1,5 μ M. Sin embargo, las células C6 del glioma, que presentan una expresión menor en su membrana del CCVD-T, son menos sensibles al efecto antiproliferativo del MBF, con una DI₅₀ de 5 μ M, lo que demuestra la existencia de una fuerte correlación entre la expresión del CCVD-T en la membrana y la inhibición del crecimiento por MBF. El bloqueo de los CCVD-T producido por estos dos fármacos conjuntamente es aditivo, mientras que su potencial antiproliferativo es sinérgico. Además, el MBF mantiene su potencial antiproliferativo frente a las células Y79 en las que se ha modificado genéticamente el CCVD-T, originando un canal insensible al MBF y frente a las células Y79 diferenciadas, que presentan un menor número de CCVD-T en su membrana. Por lo tanto, deben existir otros mecanismos, además del bloqueo de los CCVD-T, por los cuales el MBF ejerce su acción antiproliferativa. El MBF también tiene propiedades reguladoras sobre la agregación plaquetar (439).

Además de sus propiedades antiproliferativas en el aparato cardiovascular, el MBF ha demostrado su capacidad para inhibir o modular la actividad de células del sistema inmune. El MBF por vía oral 50 mg/día durante una semana redujo la incorporación de timidina-[³H*] al ADN, la incorporación de uridina-[³H*] al ARN y la incorporación de leucina-[³H*] a las proteínas sintetizados *de novo* en células mononucleares de sangre periférica de sujetos normales, lo que indica una reducción de la proliferación de estas células (416). Blaheta (438) demostró la capacidad del MBF para reducir la adhesión, migración y penetración de los linfocitos T CD4+ y CD8+ sobre células endoteliales *in vitro*. El MBF redujo la adhesividad y penetración con un patrón dosis dependiente, con valores de DI₅₀ en el rango μ M. La inhibición sobre la motilidad linfocitaria puede explicarse por el bloqueo del metabolismo de la F-actina. Nebe (483) estudió *in vitro* el efecto del MBF, VPM y amlodipino sobre la adhesividad de leucocitos de sangre periférica al endotelio

vascular. Sólo el MBF fue capaz de reducir la adhesividad leucocitaria, posiblemente mediante la reducción de la expresión de integrinas ($\beta 2$ y L-selectina) de la membrana citoplasmática. Los estudios más recientes se centran en la posible utilización del MBF en combinación con otras drogas inmunomoduladoras, en el tratamiento y profilaxis del rechazo en el trasplante de órganos (437). Por lo tanto, el MBF, además de su actividad antiproliferativa, también ha demostrado propiedades inmunomoduladoras. Esta acción depresora de la actividad de los leucocitos y linfocitos T podría utilizarse para reducir la intensidad de la fase inflamatoria inicial de la respuesta cicatricial postquirúrgica.

El único estudio que ha valorado la actividad del MBF sobre células de origen ocular no tumorales, es el realizado por Beck (238) con células epiteliales del cristalino humano tras realizar cirugía de la catarata. Este autor estudió la adhesividad celular mediante microscopía de la cápsula anterior del cristalino, la expresión de las integrinas de membrana mediante citometría de flujo y la distribución de éstas y la organización del citoesqueleto mediante microscopía de inmunofluorescencia. Beck comprobó cómo el MBF en concentraciones 10-100 μM inhibía la adhesividad de las células epiteliales a la pared de la cápsula. Las células expresaban en su superficie las subunidades $\beta 1$ y $\alpha 3$ de integrinas pero, en presencia del MBF, su distribución en la superficie celular estaba alterada. La inmunofluorescencia resultó positiva para componentes del citoesqueleto, como la actina, vimentina y citoqueratinas, pero se observó una alteración de la organización estructural de los filamentos de actina y vimentina y una marcada fragmentación de los filamentos de actina. No existen estudios que hayan valorado la actividad del MBF sobre fibroblastos de cápsula de Tenon de origen animal o humano a excepción de una experiencia previa realizada por nuestro grupo de trabajo, en la que el MBF demostró capacidad antiproliferativa sobre este tipo celular (484).

En el presente trabajo el MBF fue el inhibidor de la migración, proliferación y adhesividad fibroblástica más potente de los nueve fármacos estudiados. El MBF inhibió significativamente la proliferación con concentraciones $\geq 10^{-6}$ M desde las 18 a las 48 horas, con una DI_{50} de $9,047 \cdot 10^{-6}$ M a las 24 horas. La adhesividad fue significativamente inferior a la del control con concentraciones $\geq 5 \cdot 10^{-7}$ M y una DI_{50} de $4,307 \cdot 10^{-6}$ M. En ninguna de estas concentraciones el MBF redujo significativamente la viabilidad celular.

Al igual que ocurre con el resto de los ICC, los efectos antiproliferativos de las dihidropiridinas han sido ampliamente estudiados en células de origen vascular. Sin embargo, este efecto se extiende a otros tipos celulares.

Las dihidropiridinas han demostrado su efecto antiproliferativo sobre diferentes tipos de células tumorales. El NIF reduce el crecimiento de las células de meningiomas en

cultivo con una intensidad dosis dependiente (414). El NIC demostró, mediante la prueba del MTT, una inhibición completa de la estimulación del crecimiento ejercida por el EGF sobre las células humanas U251MG del glioma maligno humano (485).

Los estudios realizados sobre células del aparato cardiovascular han demostrado la capacidad de las dihidropiridinas para inhibir la proliferación celular, la síntesis de componentes de la MEC y la síntesis de factores de crecimiento. Hérembert (44) investigó el efecto del NIF sobre la proliferación y síntesis de ADN *in vitro* en fibroblastos procedentes de la adventicia de aorta de ratas espontáneamente hipertensas y de ratas normotensas, así como su efecto sobre la proliferación celular en dependencia de la fase del ciclo celular en la que se encontraban los fibroblastos. El NIF a una concentración de 10 μ M retardó la progresión de fase G0/G1 a fase S del ciclo celular, e inhibió la proliferación fibroblástica y la síntesis de ADN cuantificada por la prueba de la timidina- $[^3\text{H}^*]$. En una experiencia similar, Zeitler (463) estudió cómo en células endoteliales procedentes de la arteria umbilical de fetos humanos, estimuladas con FGFb, el NIF y el isradipino reducen la proliferación celular y bloquean la progresión del ciclo celular en fase G0/G1. El tratamiento oral con NIC en pacientes con arteriosclerosis coronaria se ha mostrado efectivo para reducir la progresión de las lesiones mínimas (con estenosis $\leq 20\%$).

Roth (420) estudió el efecto de cinco ICC (las dihidropiridinas amlodipino, felodipino, manidipino, junto con el VPM y el DTZ) sobre diferentes aspectos del metabolismo de la MEC generada *in vitro* por monocapas subconfluentes de fibroblastos pulmonares y de células musculares lisas vasculares humanas sometidas a estimulación con PDGF. Todos los ICC demostraron mediante *Western blot* su capacidad para reducir la producción total de colágeno y la síntesis del ARNm codificador de las moléculas de procolageno tipo I, III y IV, con un patrón dosis dependiente. El fármaco más potente fue el manidipino. Además, todos los fármacos incrementaron la actividad enzimática de la colagenasa tipo IV de 72 kD (también denominada metaloproteinasa-2) producida por las células musculares lisas vasculares, e inhibieron la transcripción genética de factores tisulares inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP), como el TIMP-2, producido por los fibroblastos y las células musculares lisas vasculares. Todos estos efectos fueron constatados en rangos de concentración nanomolar (10^{-8} - 10^{-9} M). Lee y Ping (470) demostraron que el NIF inhibe la incorporación de prolina a la matriz de colágeno sintetizado en un cultivo de fibroblastos de origen bovino. Fitscha (486) estudió como otra dihidropiridina, el isradipino, reduce la incorporación de prolina y sulfato al colágeno y proteoglicanos de la MEC en un modelo animal de lesión vascular.

Sugiura (487) estudió el efecto de dos dihidropiridinas, el NIF y el cilnidipino, sobre células mesangiales de rata estimuladas por medio de cultivo enriquecido con SBF al 5%. Las dos dihidropiridinas inhibieron con un patrón dosis dependiente la proliferación celular, cuantificada por la prueba de incorporación de timidina- $^{3}\text{H}^*$, y la producción de proteínas de la MEC, cuantificada por la prueba de captación de prolina- $^{3}\text{H}^*$. El análisis *Northern blot* detectó una reducción de la producción de ARNm codificador de TGF β y fibronectina. En una experiencia similar, Lai (488) demostró cómo el amlodipino es capaz de reducir la proliferación celular y la producción de ARNm codificador del PDGF, TGF β 1 y FGFb en cultivos de células musculares lisas vasculares de ratas espontáneamente hipertensas. En las plaquetas, el NIC inhibe la síntesis de TXA $_2$, factor necesario para la activación de las mismas. El NIF inhibe la activación de la PLA $_2$ en fibroblastos (489).

Todas estas experiencias demuestran cómo las dihidropiridinas modulan los fenómenos de proliferación celular y de síntesis y remodelación de la MEC por su capacidad para modificar la producción de factores del crecimiento y no sólo por su capacidad de modificar las condiciones hemodinámicas.

En Oftalmología, la mayoría de los estudios con dihidropiridinas se centran en su efecto hipotensor ocular (403) y en su actividad vasodilatadora arterial y potencial aplicación en el glaucoma normotensivo (101, 102). Existen muy pocos trabajos en la literatura que hayan estudiado el comportamiento de células de origen ocular bajo la influencia de dihidropiridinas. Uchihori (61) estudió el efecto del NIF (10 μM) sobre los fenómenos de proliferación y quimiotaxis *in vitro* de células neurogliales de retina humana sometidas a estimulación por el PDGF (32 ng/ml). El NIF redujo las respuestas mitogénicas, cuantificadas por la prueba de incorporación de BrdU*, y la quimiotaxis en membranas de policarbonato, con un patrón dosis dependiente y una DI_{50} aproximada de 5 μM . La viabilidad celular cuantificada mediante tinción de azul tripán no se redujo significativamente tras la exposición a 10 μM de NIF durante 48 horas. Hoffman (444) no detectó diferencias significativas respecto al control al estudiar el efecto inhibitorio del NIF sobre la proliferación y migración de células del EPR *in vitro* con concentraciones de 100 μM y 10-0,1 μM respectivamente.

Hasta el momento sólo existen dos trabajos que hayan estudiado el efecto de una dihidropiridina, el NIC, sobre el comportamiento de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. No existen trabajos que hayan valorado el potencial antiproliferativo del NIF, NIM, NIT o NIS en fibroblastos humanos de cápsula de Tenon. Kang (42) constató el efecto inhibitorio de NIC sobre la proliferación fibroblástica tras 24 horas de exposición con unas DI_{50} de $1,198 \cdot 10^{-4}$ M con la prueba de captación de timidina- $^{3}\text{H}^*$, $2,884 \cdot 10^{-4}$ M mediante

recuento celular y $1,738 \cdot 10^{-4}$ M con la prueba de la hexosaminidasa. La inhibición de la adhesividad a las 24 horas presentó una DI_{50} de $2,580 \cdot 10^{-4}$ M con el tet de la hexosaminidasa y, con técnicas de recuento celular, ascendió a $2,912 \cdot 10^{-4}$ M. Estas concentraciones inhibitorias son, según Kang, superiores a las requeridas con otros tipos de células, como las células neurogliales retinianas o las células del endotelio vascular. Pinilla (449), en nuestro grupo de trabajo, detectó, en una experiencia previa, una reducción significativa de la migración fibroblástica *in vitro* con $NIC \geq 5 \cdot 10^{-5}$ M, y de la proliferación con $NIC \geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M tras 48 horas de exposición.

El rango de actividad antiproliferativa de las dihidropiridinas sobre células de origen vascular propuesto por Hérembert (44) sería el siguiente: $NIF > NIS > NIT \approx NIM$. Hérembert no incluye el NIC en sus valoraciones.

En el presente trabajo, el rango de actividad antiproliferativa de las dihidropiridinas sobre los fibroblastos fue el siguiente: $NIC > NIT \approx NIM > NIF > NIS$. Este orden relativo fue similar a las 18, 24 y 48 horas. La dihidropiridina que mostró mayor poder antiproliferativo en todos los tiempos estudiados fue el NIC, con una DI_{50} de $5,782 \cdot 10^{-5}$ M a las 48 horas. Al igual que en la escala propuesta por Hérembert, el NIT y el NIM presentaron una actividad antiproliferativa similar, con unas DI_{50} a las 48 horas de $2,266 \cdot 10^{-4}$ M y $2,376 \cdot 10^{-4}$ M respectivamente. A diferencia de la escala propuesta por Hérembert, el NIF y el NIM mostraron menor poder antiproliferativo que el NIT y el NIM. Sin embargo, estos dos fármacos mantuvieron su orden relativo, ya que el NIF presentó una DI_{50} a las 48 horas de $3,811 \cdot 10^{-4}$ M, inferior la que mostró el NIS ($DI_{50} = 2,810 \cdot 10^{-3}$ M a las 48 horas), la mayor de los nueve fármacos estudiados. En cuanto a la inhibición de la adhesividad fibroblástica, todas las dihidropiridinas presentaron diferencias significativas respecto al control con concentraciones $\geq 5 \cdot 10^{-6}$ M. Nuevamente las dihidropiridinas con mayor y menor poder inhibidor de la adhesividad fibroblástica fueron el NIC y el NIS respectivamente.

Mallick (66) precisó concentraciones de 5-FU 0,5 mg/l ($\approx 3,8 \cdot 10^{-6}$ M) para inhibir en un 50% la proliferación de fibroblastos subconjuntivales de conejo *in vitro* cuantificada mediante recuento celular automatizado. Esta DI_{50} es muy inferior a las presentadas por los ICC. La DI_{50} más próxima fue la del MBF ($DI_{50} = 9,047 \cdot 10^{-6}$ M a las 24 horas). Wilkerson (47) estudió el efecto del 5-FU sobre monocapas confluentes y no confluentes de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon mediante recuento celular tras 7 días de exposición. La inhibición de la proliferación $\geq 90\%$ se detectó con concentraciones $\geq 10^4$ ng/ml ($\approx 7,5 \cdot 10^{-5}$ M) en las monocapas no confluentes. Fueron necesarias concentraciones $\geq 10^6$ ng/ml ($\approx 7,5 \cdot 10^{-3}$ M) para conseguir la misma proporción de inhibición en las monocapas confluentes.

Yamamoto (68) estudió el efecto de la MMC y del 5-FU sobre la migración en gel de agarosa y la proliferación, mediante recuento celular automatizado, de fibroblastos subconjuntivales de conejo *in vitro*. El 5-FU inhibió la proliferación fibroblástica de forma reversible con concentraciones de 0,33 mg/l durante 2 días. La MMC inhibió la proliferación fibroblástica de forma reversible con concentraciones de 10^{-3} mg/l durante 4 días. Concentraciones o tiempos de exposición superiores de 5-FU o MMC determinaron una irreversibilidad de su efecto antiproliferativo. Concentraciones de 5-FU entre 0,1 y 10 mg/l, y de MMC entre 10^{-4} y 10^{-2} mg/l, no redujeron significativamente la motilidad fibroblástica.

Saika (56) estudió el efecto de la MMC sobre la proliferación de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon *in vitro* mediante la prueba de incorporación de BrdU*, obteniendo unas DI_{50} de aproximadamente $9,5 \cdot 10^{-7}$ M a las 3 horas y 10^{-6} M a las 24 horas (inferiores a todas las DI_{50} presentadas por los ICC estudiados). La MMC también redujo significativamente la síntesis de colágeno, presentando una DI_{50} de $9,5 \cdot 10^{-6}$ M mediante el estudio de los péptidos -COOH terminales del procolágeno tipo I. Trabajos como el de Lee (244) han confirmado el poder antiproliferativo de la MMC sobre los fibroblastos humanos de cápsula de Tenon *in vitro*, pero también han demostrado su incapacidad para reducir la adhesividad fibroblástica. Según Latina (52), la MMC y el 5-FU no afectan a la migración fibroblástica, ni a los componentes del citoesqueleto.

En nuestro estudio TFP, DTZ, VPM, MBF, NIC, NIF, NIM, NIT y NIS, en concentraciones adecuadas, han demostrado un efecto inhibitor de la proliferación, migración y adhesividad fibroblásticas en el cultivo celular. Diversos estudios han demostrado que los ICC actúan modificando varios de los procesos implicados en la cicatrización:

- Reducen el daño celular tóxico e isquémico (41, 330, 400).
- Durante la fase inflamatoria aguda, reducen la migración y adhesividad leucocitaria y la producción de mediadores bioquímicos de la inflamación y la vasodilatación (416, 437, 438, 482).
- Protegen contra el daño tisular mediado por los granulocitos (59, 438).
- Inhiben de forma reversible la activación y agregación plaquetarias (389-393, 464).
- Reducen la permeabilidad microvascular y reducen la exudación de plasma rico en fibrina que será la base de la formación del coágulo (422, 474).
- Inhiben la migración y penetración de fibroblastos en las matrices de colágeno (311, 449).
- Inhiben la proliferación y adhesividad fibroblástica (42, 473).

-Reducen la síntesis de colágeno y otros constituyentes de la MEC (420, 470, 485, 487).

Por todo ello, la aplicación de los ICC en la cirugía filtrante del glaucoma, podría suponer una alternativa para mejorar su índice de éxitos. Su aplicación también podría extenderse a otras patologías oculares que puedan beneficiarse del efecto de sustancias con poder antiproliferativo, como la vitreorretinopatía proliferante, la cirugía del pterigium, las enfermedades mucocicatrizantes, etc. El camino por recorrer es largo y son necesarios más estudios en modelos experimentales, abundando en los fármacos y dosis con mejores perspectivas de actuación sobre la célula protagonista de la cicatrización, el fibroblasto.

4.- CITOTOXICIDAD.

Kang (42) ha estudiado la citotoxicidad inducida por TFP, DTZ, VPM y NIC sobre monocapas de fibroblastos de cápsula de Tenon humanos observando diversos grados de cariorrexis con las cuatro drogas en concentración 10^{-3} M. En concentraciones $<10^{-4}$ M, ninguna de las drogas causó efectos citotóxicos. Hoffman (444) no detectó cambios en la morfología de células del EPR con concentraciones 10^{-5} M de VPM, DTZ y NIF.

La inhibición del desarrollo cicatricial y del papel de los fibroblastos en la cicatrización ha sido bien estudiada en modelos animales con el empleo de antimetabolitos. El uso de la MMC tras la cirugía filtrante en el conejo provoca alteraciones en la morfología celular que varían desde la anisocariosis a fenómenos de mitosis anómala con alteraciones nucleolares, en la fijación de marcadores inmunológicos (490-492) o alteraciones ultraestructurales (493); la portentosa capacidad de transformación del fibroblasto en miofibroblasto con la consiguiente movilidad y adhesividad se ve enormemente mermada por la acción del antimitótico. Como se ha expuesto en los resultados, las alteraciones morfológicas inducidas por los ICC se circunscriben a la cariorrexis, la morfología citoplásmica y a las alteraciones derivadas de la inhibición de la adhesividad, con un limitado radio de acción y duración de las mismas. A diferencia de la MMC, no se evidenciaron fenómenos de anisocariosis, ni mitosis anómalas o alteraciones nucleolares, durante la observación. Todo ello induce a pensar en la mayor reversibilidad en las acciones de esta familia de fármacos, como ya ha quedado demostrado en algunos estudios (444). La ventaja sería evidente al evitar la amenaza de la "irreversibilidad" creada por los antimitóticos (68); sin embargo ¿es posible exportar este modelo de monocapa a la complejidad histopatológica de la cicatrización escleral?

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1^a. En nuestro modelo de lesión experimental *in vitro* sobre monocapas confluentes de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon, los fármacos trifluoperazina, diltiazem, verapamilo, mibefradil, nicardipino, nifedipino, nimodipino, nitrendipino y nisoldipino inhibieron la migración fibroblástica en un rango de concentraciones que osciló entre $5 \cdot 10^{-5}$ M y $7,5 \cdot 10^{-6}$ M a las 18 horas, entre $5 \cdot 10^{-5}$ M y $5 \cdot 10^{-6}$ M a las 24 horas y entre $2,5 \cdot 10^{-5}$ M y 10^{-6} M a las 48 horas.

2^a. Trifluoperazina, diltiazem, verapamilo, mibefradil, nicardipino, nifedipino, nimodipino, nitrendipino y nisoldipino inhibieron la proliferación fibroblástica *in vitro* cuantificada mediante la prueba colorimétrica del WST-1 en un rango de concentraciones que osciló entre $2,5 \cdot 10^{-5}$ M y 10^{-6} M a las 18 y 24 horas, y entre 10^{-5} M y 10^{-6} M a las 48 horas.

3^a. Trifluoperazina, diltiazem, verapamilo, mibefradil, nicardipino, nifedipino, nimodipino, nitrendipino y nisoldipino inhibieron la adhesividad fibroblástica *in vitro* cuantificada mediante la prueba colorimétrica del WST-1 con un rango de concentraciones que osciló entre $2,5 \cdot 10^{-5}$ M y $5 \cdot 10^{-7}$ M tras 24 horas de exposición.

4^a. Las concentraciones de verapamilo $\geq 10^{-4}$ M, de diltiazem $\geq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M, de nifedipino $\geq 5 \cdot 10^{-5}$ M, de trifluoperazina, nicardipino, nimodipino y nitrendipino $\geq 2,5 \cdot 10^{-5}$ M y de nisoldipino y mibefradil $\geq 10^{-5}$ M redujeron significativamente la viabilidad fibroblástica tras 4 horas de exposición.

5^a. Las alteraciones citológicas inducidas por trifluoperazina, diltiazem, verapamilo, mibefradil, nicardipino, nifedipino, nimodipino, nitrendipino y nisoldipino se limitaron a la aparición de cariorrexis, alteraciones en la morfología citoplásmica y alteraciones derivadas de la inhibición de la adhesividad. No se evidenciaron fenómenos de anisocariosis, ni mitosis anómalas o alteraciones nucleolares. Las alteraciones fueron detectables únicamente en concentraciones $\geq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M.

6ª. El modelo de lesión experimental *in vitro*, consistente en la realización de soluciones de continuidad circulares mediante una punta rotante de material plástico sobre monocapas confluentes de fibroblastos humanos de cápsula de Tenon, y su posterior seguimiento mediante fotografías digitalizadas supone un modelo experimental útil para el estudio de los fenómenos de migración y proliferación fibroblásticas *in vitro*, y para el estudio de los efectos que diferentes drogas puedan inducir sobre éstas.

7ª. En nuestro estudio las concentraciones de trifluoperazina $\geq 7,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 horas, diltiazem 10^{-4} M y $7,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 y 48 horas respectivamente, verapamilo y mibefradil 10^{-4} M a las 18 horas y nicardipino 10^{-4} M y $7,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 18 y 24 horas respectivamente, indujeron una alteración en la monocapa fibroblástica que impidió su posterior estudio.

8ª. En las condiciones y períodos de tiempo considerados en el estudio nicardipino y nimodipino son estables frente a luz de vapor sodio y luz de fluorescente, mientras que muestran un proceso de degradación al ser expuestos a luz solar. Nisoldipino es estable frente a la luz de vapor de sodio presentando procesos de descomposición cuando es expuesto a iluminación solar y de fluorescente. La manipulación de nicardipino, nimodipino y nisoldipino debe realizarse bajo iluminación proveniente de luz de vapor de sodio.

9ª. Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto una acción antiproliferativa de los inhibidores de los canales del calcio con posible aplicación en la cirugía filtrante del glaucoma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thylefors B, Négrel A. The global impact of glaucoma. *Bull World Health Organ* 1994; 72: 323-6.
2. Quigley H. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 1996; 80: 389-93.
3. Quigley H, Vitale S. Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 83-91.
4. National Society to Prevent Blindness. Vision problems in USA. Facts and figures. New York: US Society to prevent blindness. Data Analysis; 1980: 410-53.
5. Fuchs J, Nissen K, Goldschmidt E. Glaucoma blindness in Denmark. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1992; 70: 73-8.
6. Rosenberg T, Klie F. Current trends in newly registered blindness in Denmark. *Acta Ophthalmol Scand* 1996; 74: 395-8.
7. Hattenhauer M, Johnson D, Ing H, Herman D, Hodge D, Yawn B, et al. The probability of blindness from open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 1998; 105: 2099-104.
8. Hart W. The epidemiology of primary open angle glaucoma and ocular hypertension. En: Richt R, ed. *Glaucoma*. Philadelphia: The CV Mosby Co; 1989: 725-48.
9. Leske M. The epidemiology of primary open angle glaucoma. A review. *Am J Epidemiol* 1983; 11: 166-91.
10. Gestal J. Minusvalías Físicas Mentales y Sensoriales. En: Piedrola G, ed. *Medicina Preventiva y Salud Pública*. Barcelona: Salvat Editores; 1988: 822-6.
11. Faus M, Higuera A. El envejecimiento de la población aragonesa. *Papeles de Economía Española. Economía de las CCAA* 1991; 10: 388-412.
12. Honrubia F. Long-term follow-up of the argon laser trabeculoplasty in eyes treated 180° and 360° of the trabeculum. *Int Ophthalmol* 1992; 16: 375-9.
13. Watson P, Grierson I. The place of trabeculectomy in the treatment of glaucoma. *Ophthalmology* 1981; 88: 175-96.
14. Migdal C. What is the appropriate treatment for patients with primary open-angle glaucoma: medicine, laser, or primary surgery? *Ophthalmic Surg* 1995; 26: 108-9.
15. Jay J. Rational choice of therapy in primary open angle glaucoma. *Eye* 1992; 6: 243-7.
16. Levene R. Glaucoma filtering surgery factors that determine pressure control. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1984; 82: 282-301.
17. Cairns J. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol* 1968; 66: 673-8.
18. Sherwood M. Filtration surgery as the initial therapy for open angle glaucoma. *J Glaucoma* 1993; 2: 64-7.
19. Honrubia F. A long-term study of trabeculectomy. *Glaucoma* 1983; 5: 285-8.
20. Sherwood M, Migdal C, Hitchings R, Sharir M, Zimmerman T, Schultz J. Initial treatment of glaucoma: surgery or medications. *Surv Ophthalmol* 1993; 37: 293-305.
21. Jampel H. Impact of adjuvant chemotherapy on glaucoma filtration surgery. *J Glaucoma* 1993; 2: 58-63.

22. Lamping K, Bellows A, Hutchinson B, Afran S. Long-term evaluation of initial filtration surgery. *Ophthalmology* 1986; 93: 91-101.
23. Whiteside-Michel J, Liebman J, Ritch R. Inicial 5-fluorouracil trabeculectomy in young patients. *Ophthalmology* 1992; 99: 7-13.
24. Jampel H, McGuigan L, Dunkelberger M, l'Henault N, Quigley H. Cellular proliferation after experimental glaucoma filtration surgery. *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 89-94.
25. Grierson I, Joseph I, Issou M, Day J. Wound repair: the fibroblast and the inhibition of scar formation. *Eye* 1988; 2: 135-48.
26. Hitchings R, Grierson I. Clinico-pathological correlation in eyes with failed fistulizing surgery. *Trans Ophthalmic Soc UK* 1983; 103: 84-8.
27. Skuta G, Parrish R. Wound healing in glaucoma filtering surgery. *Surv Ophthalmol* 1987; 32: 149-70.
28. Spencer W. Histologic evaluation of microsurgical glaucoma techniques. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1972; 76: 389-97.
29. Joseph J, Miller M, Hitchings R. Wound healing as a barrier so successful filtration surgery. *Eye* 1988; 2: S113-23.
30. Miller M, Grierson I, Unger W, Hitchings R. Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. *Ophthalmic Surg* 1989; 20: 350-7.
31. Schoefl G. Studies of inflamation III. Growing capilaries: their structure and permeability. *Virch Arch Pathol Anat* 1963; 337: 97-104.
32. Boucek R. Factors affecting wound healing. *Otol Clin North Am* 1984; 17: 243-64.
33. Chen C. Enhanced intraocular pressure controlling effectiveness of trabeculectomy by local application of mitomycin C. *Trans Asia-Pacific Acad Ophthalmol* 1983; 95: 1612-5.
34. Krug J, Melamed S. Adjunctive use of delayed and adjustable low-dose 5-fluorouracil in refractory glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1990; 109: 412-8.
35. Wolner B, Liebman J, Sassani J. Late bleb-related endophthalmitis after trabeculectomy with adjunctive 5-Fluorouracil. *Ophthalmology* 1991; 98: 1053-9.
36. Greenfield D, Suner I, Miller M, Kangas T, Palmberg P, Flynn H. Endophthalmitis after filtering surgery with mitomycin. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 943-9.
37. Stamper R, McMenemy M, Lieberman M. Hypotonous maculopathy after trabeculectomy with subconjunctival 5-fluorouracil. *Am J Ophthalmol* 1992; 114: 544-53.
38. The Fluorouracil Filtering Surgery Study Group. Five-year follow-up of the fluorouracil filtering surgery study. *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 349-66.
39. Tamargo J, Delpón E. Antagonistas del calcio. En: Flórez J. *Farmacología humana* (2ª edición). Barcelona. Masson, S.A.; 1992: 555-64.
40. Striessnig J, Murphy B, Catterall W. Dihydropyridine receptor of L-type Ca²⁺ channels: Identification of binding domains for [³H](+)-PN200-110 and [³H]azidopine within the α 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10769-73.
41. Tamargo J. Aspectos farmacológicos de los canales del calcio. *Medicine* 1996; 7: 1025-39.

42. Kang Y, Lee D, Higginbotham E. In vitro evaluation of antiproliferative potential of calcium channel blockers in human Tenon's fibroblasts. *Exp Eye Res* 1997; 64: 913-25.
43. Khan S, Longland C, Michelangeli F. The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1797-806.
44. Hérembert T, Zhu D, Marche P. Mechanism of action of the inhibitory effect of nifedipine on the growth of cultured aortic cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1703-9.
45. Eriksson Å, Yachnin J, Lewensohn, Nilsson A. DNA-dependent protein kinase is inhibited by trifluoperazine. *Biochem Biop Res Commun* 2001; 283: 726-31.
46. Smith-Thomas L, Haycock J, Metcalfe R, Boulton M, Ellis S, Rennie I, et al. Involvement of calcium in retinal pigment epithelial cell proliferation and pigmentation. *Curr Eye Res* 1998; 17: 813-22.
47. Wilkerson M, Fulcher S, Shields B, Foulks G, Hatchell D, Houston L. Inhibition of human subconjunctival fibroblast proliferation by immunotoxin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 2293-8.
48. Mietz H, Chévez-Barrios P, Lieberman M, Wendt M, Gross R, Basinger S. Decorin and suramin inhibit ocular fibroblast collagen production. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235: 399-403.
49. Saika S, Ooshima A, Yamanaka O, Okada Y, Tanaka S, Ohnishi Y. Effect of fibrostatin C, an inhibitor of prolyl 4-hydroxylase, on collagen secretion by human Tenon's capsule fibroblasts in vitro. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234: S214-22.
50. Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Tanaka S, Ohnishi Y, Ooshima A. Pentoxifyline and pentifylline inhibit proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts and production of type-I collagen and laminin in vitro. *Ophthalmic Res* 1996; 28: 165-70.
51. Nguyen K, Hoang A, Lee D. Transcriptional control of human Tenon's capsule fibroblast collagen synthesis in vitro by gamma-interferon. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 3064-70.
52. Latina M, Belmonte S, Park C, Crean E. Gamma-interferon effects on human fibroblasts from Tenon's capsule. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 2806-15.
53. Cordeiro M, Bhattacharya S, Schultz G, Khaw P. TGF- β 1, - β 2 y - β 3 in vitro: Biphasic effects on Tenon's fibroblasts contraction, proliferation and migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 756-63.
54. Cheng Q, Shapourfartehrani S, Lee D. Comparative efficacy of antiviral drugs on human ocular fibroblast. *Exp Eye Res* 1995; 61: 461-7.
55. Hershkoviz R, Melamed S, Greenspoon N, Lider O. Nonpeptidic analogues of the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence specifically inhibit the adhesion of human Tenon's capsular fibroblasts to fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 2585-91.
56. Saika S, Ooshima A, Yamanaka O, Kimura M, Okada Y, Tono O, et al. In vitro effects of doxorubicin and mitomycin C on human Tenon's capsule fibroblasts. *Ophthalmic Res* 1997; 29: 91-102.
57. Williams D, Nguyen K, Shapourifar-Tehrani S, Kitada S, Lee D. Effects of timolol, betaxolol, and levobunolol on human Tenon's fibroblasts in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 2233-41.
58. Cordeiro M, Gay J, Khaw P. Human anti-transforming growth factor- β 2 antibody: A new glaucoma anti-scarring agent. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2225-34.

59. Grabski R, Dewit J, De Braekeleer J, Malicka-Blaskiewicz M, De Baetselier P, Verschueren H. Inhibition of T-cell invasion across cultured fibroblast monolayers by phenothiazine-related calmodulin inhibitors: impairment of lymphocyte motility by trifluoperazine and chlorpromazine, and alteration of the monolayer by pimozide. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1313-7.
60. Arora P, Bibby K, McCulloch C. Slow oscillations of free intracellular calcium ion concentration in human fibroblasts responding to mechanical stretch. *J Cell Physiol* 1994; 161: 187-200.
61. Uchihori Y, Puro D. Mitogenic and chemotactic effects of platelet-derived growth factor on human retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 2689-95.
62. Kuriyama S, Ohuchi T, Yoshimura N, Honda Y. Growth factor-induced cytosolic calcium ion transients in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 2882-90.
63. Handa J, Murad S, Jaffe G. Minoxidil inhibits ocular cell proliferation and lysyl hydroxylase activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 567-75.
64. Saika S, Ooshima A, Yamanaka O, Tanaka S, Okada Y, Hashizume N, et al. Effect of a prolyl hydroxylase inhibitor on rabbit ocular fibroblasts. *Ophthalmic Res* 1995; 27: 335-46.
65. Guidry C, Hardwick C. Extracellular matrix contraction by choroidal fibroblasts: inhibition by staurosporine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 503-8.
66. Mallick K, Hajek A, Parrish R. Fluorouracil (5-FU) and cytarabine (Ara-C) inhibition of corneal epithelial cell and conjunctival fibroblast proliferation. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 1398-402.
67. Saika S, Ooshima A, Hashizume N, Yamanaka O, Tanaka S, Okada Y, et al. Effect of lysyl hydroxylase inhibitor, minoxidil, on ultrastructure and behavior of cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; 233: 347-53.
68. Yamamoto T, Varani J, Soong H, Lichter P. Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Ophthalmology* 1990; 97: 1204-10.
69. Sharir M, Zimmerman T. In vitro inhibition of collagen formation by 2,4-pyridine dicarboxylate and minoxidil in rabbit corneal fibroblasts. *Curr Eye Res* 1993; 12: 553-9.
70. Fiscella R, Elvart J, Peyman G, Yue B. In vitro evaluation of cellular inhibitory potential of various antineoplastic drugs and dexamethasone. *Ophthalmic Surg* 1985; 16: 247-9.
71. Cross K, Jane S, Wild A, Foreman R, Chad J. Activation of nicotinic acetylcholine receptors expressed in quail fibroblasts: effects on intracellular calcium. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2838-44.
72. Kirmani M, Ryan S. In vitro measurement of contractile force of transvitreal membranes formed after penetrating ocular injury. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 107-10.
73. Hjelmeland L, Li J, Toth C, Landers M. Antifibrotic and uveitogenic properties of gamma interferon in the rabbit eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992; 230: 84-90.
74. Sholley M, Grimbone M, Cotran R. Cellular migration and replication in endothelial regeneration. *Lab Invest* 1977; 36: 18-25.
75. Madri J, Stenn K. Aortic endothelial cell migration I. Matrix requirements and composition. *Am J Pathol* 1982; 106: 180-5.
76. Galkina S, Sud'ina G, Margolis L. Cell-cell contacts alter intracellular pH. *Exp Cell Res* 1992; 200: 211-4.

77. Mikami H, Watanabe S, Hirose M, Sato N. Role of extracellular matrix in wound repair by cultured gastric mucosal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202: 285-92.
78. Sommer A. Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1989; 107: 186-8.
79. Sommer A, Katz J, Quigley H, Miller N, Robin A, Richter R, et al. Clinically detectable nerve fiber atrophy precedes the onset of glaucomatous field loss. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 77-83.
80. Neima D, LeBlanc R, Regan D. Visual field defects in ocular hypertension and glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 1042-5.
81. Davanger M, Ringvold A, Blika S. The probability of having glaucoma at different IOP levels. *Acta Ophthalmol* 1991; 69: 565-8.
82. Anderson D. Glaucoma: the damage caused by pressure. *Am J Ophthalmol* 1989; 108: 485-95.
83. Kolker A, Hetherington J. *Becker-Shaffer's. Diagnosis and Therapy of the Glaucomas*. San Louis: The CV Mosby; 1970: 249-50.
84. Tasman W, Jaeger E, eds. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. Philadelphia: J B Lippincott Company; 1991.
85. Orsida B, Rolland J, Werkmeister J, West R. Trabecular meshwork changes in glaucoma. *Aust Nz Ophthalmol* 1996; 24: S21-4.
86. Mikozi K. Demonstration of masked acidic glycosaminoglycans in the normal human trabecular meshwork. *Jpn J Ophthalmol* 1977; 21: 57-63.
87. Tripathi R. Discussion to histopathology of 150 trabeculectomy specimens in glaucoma. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1976; 96: 253-61.
88. Müller H. Anatomische Beiträge zur Ophthalmologie: Ueber Nerven-Veränderungen an der Eintrittsstelle des Sehnerven. *Arch Ophthalmol* 1858; 4: 1-6.
89. Von Jaeger E. Ueber Glaucom und seine Heilung durch Iridectomie. *Z Ges der Aerzte zu Wien* 1858; 14: 465-84.
90. La Grange F, Beauvieux J. Anatomie de l'excavation glaucomateuse. *Arch Ophthalmol (Paris)* 1925; 42: 129-33.
91. Lampert P, Vogel M, Zimmermann L. Pathology of the optic nerve in experimental acute glaucoma. Electron microscopy studies. *Invest Ophthalmol* 1968; 7: 199.
92. Hayreh S. Blood supply of the optic nerve head in health and disease. In: Lambrou G, Greve E, eds. *Ocular blood flow in glaucoma. Means, methods and measurements. Proceedings of the European Glaucoma Society Meeting*. Amsterdam: Kugler and Ghedini Publications; 1989: 3-54.
93. Trew D, Smith S. Postural studies in pulsatile ocular blood flow: I. Ocular hypertension and normotension. *Br J Ophthalmol* 1991; 75: 66-70.
94. Trew D, Smith S. Postural studies in pulsatile blood flow: II. Chronic open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1991; 75: 71-5.
95. James C, Smith S. Pulsatile ocular blood flow in patients with low tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1991; 75: 466-70.

96. Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, Morbio R, Varotto A. Vascular risk factors for primary open glaucoma. The Egna-neumarkt study. *Ophthalmology* 2000; 107: 1287-93.
97. Drance S, Fairclough M, Butler D, Kottler M. The importance of disc hemorrhage in the prognosis of chronic open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1977; 95: 226-8.
98. Buckley C, Hadoke P, Henry E, O'Brien C. Systemic vascular endothelial cell dysfunction in normal pressure glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 227-32.
99. Netland P, Chaturvedi N, Dreyer E. Calcium channel blockers in the management of low-tension and open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1993; 115: 608-13.
100. Netland P, Feke G, Konno S, Goger D, Fujio N. Optic nerve head circulation after topical calcium channel blocker. *J Glaucoma* 1996; 5: 200-6.
101. Kitazawa Y, Shirai H, Go F. The effect of Ca²⁺-antagonist in visual field in low-tension glaucoma. Graefe's *Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989; 227: 408-12.
102. Tomita K, Araie M, Tamaki Y, Nagahara M, Sugiyama T. Effects of nilvadipine, a calcium antagonist, on rabbit ocular circulation and optic nerve head circulation in NTG subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 1144-51.
103. Maumenee A. Causes of the optic nerve damage in glaucoma. *Ophthalmology* 1983; 90: 741-52.
104. Quigley H, Sánchez R, Dunkelberger G. Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28: 913-20.
105. Minckler D, Ogden T. Distribution of axonal transport injury in the lamina in experimental glaucoma in the monkey. En: Krieglstein G, ed. *Glaucoma Update III*. Berlin: Springer-Verlag; 1987: 27-35.
106. Quigley H, Enger C, Katz J, Sommer A, Scott R, Gilbert D. Risk factors for the development of glaucomatous visual field loss in ocular hypertension. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 644-9.
107. Tielch J, Sommer A, Katz J, Royall R, Quigley H, Javitt J. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *JAMA* 1991; 266: 369-74.
108. Linnér E. The association of ocular hypertension with the exfoliation syndrome, the pigmentary dispersion syndrome and myopia. *Surv Ophthalmol* 1980; 25: 145-7.
109. Armaly M, Krueger D, Maunder L, Becker B, Hetherington J, Kolker A, et al. Biostatistical analysis of the Collaborative Glaucoma Study. I. Summary report of the risk factors for glaucomatous visual-field defects. *Arch Ophthalmol* 1980; 98: 2163-71.
110. Kahn H, Milton R. Revised Framingham Eye Study: prevalence of glaucoma and diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1989; 11: 769-76.
111. Leske M, Connell A, Schachat A, Hyman L. The Barbados Eye Study: prevalence of open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 821-9.
112. Becker B, Kolker A, Roth D. Glaucoma family study. *Am J Ophthalmol* 1965; 50: 557-67.
113. François J, Heintz-DeBree C. Personal research on the hereditary of chronic simple (open-angle) glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1966; 62: 1067-71.
114. Armaly M. The genetic determination of ocular pressure in the normal eye. *Arch Ophthalmol* 1967; 78: 187-92.

115. Tielch J, Katz J, Sommer A, Quigley H, Javitt J. Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 69-73.
116. Leske M, Podgor M. Intraocular pressure, cardiovascular risk variables and visual field defects. *Am J Epidemiol* 1983; 118: 286-7.
117. Klein B, Klein R, Ritter L. Relationship of drinking alcohol and smoking to prevalence of open-angle glaucoma: the beaver dam eye study. *Ophthalmology* 1993; 100: 1609-13.
118. Wilson R, Walker A, Dueker D, Crick R. Risk factors for rate progression of glaucomatous visual field loss. A computer-based analysis. *Arch Ophthalmol* 1985; 59: 365-84.
119. Mao L, Stewart W, Shields M. Correlation between intraocular pressure control and progressive glaucomatous damage in primary open angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1991; 11: 51-5.
120. Quigley H, Tielsch J, Katz J, Sommer A. Rate of progression in open-angle glaucoma estimated from cross-sectorial prevalence of visual field damage. *Am J Ophthalmol* 1996; 122: 355-63.
121. Kosekli N, Araie M, Shirato S, Yamamoto S. Effect of trabeculectomy on visual field performance in central 30° field in progressive normal-tension glaucoma. *Ophthalmology* 1997; 104: 197-201.
122. Miller M, Joseph N, Wishart P, Hitchings R. Lack of beneficial effect of intensive topical steroids and beta irradiation of eyes undergoing repeat trabeculectomy. *Ophthalmic Surg* 1987; 18: 508-12.
123. Patisas C, Rockwood E, Meisler D, Lowder C. Glaucoma filtering surgery with postoperative 5-fluorouracil in patients with intraocular inflammatory disease. *Ophthalmology* 1992; 99: 594-9.
124. The Fluorouracil Filtering Surgery Study Group. Fluorouracil Filtering Surgery Study one-year follow-up. *Am J Ophthalmol* 1989; 108: 625-35.
125. Chen C. Enhancement of IOP control after trabeculectomy with local application of mitomycin C. *Trans Asia-Pacific Acad Ophthalmol* 1983; 9: 172-7.
126. Molteno A. The use of draining implants in resistant cases of glaucoma. Late results of 110 operations. *Trans Ophthalmol Soc N Z* 1983; 13: 151-7.
127. Honrubia F, Gómez M, Hernández A, Grijalbo P. Long term results of silicone tube in surgery for eyes with neovascular glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1983; 97: 372-7.
128. Noureddin B, Wilson-Holt N, Lavin M, Jeffrey M, Hitchings R. Advanced uncontrolled glaucoma. Nd:Yag cyclophotocoagulation or tube surgery. *Ophthalmology* 1992; 99: 430-7.
129. Hawkins T, Stewart W. One-year results of semiconductor transscleral cyclophotocoagulation in patients with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 488-91.
130. Tahery M, Lee D. Review: Pharmacologic control of wound healing in glaucoma filtration surgery. *J Ocular Pharmacol* 1989; 5: 155-79.
131. Teng C, Chi H, Katzin H. Histology and mechanism of filtering operations. *Am J Ophthalmol* 1959; 47: 16-34.
132. La Grange F. Iridectomie et sclerectomie combinées dans le traitement du glaucome chronique. Procédé nouveau pour l'établissement de la cicatrice filtrante. *Arch d'Opht* 1906; 26: 481-3.
133. Iliff C, Haas J. Posterior lip sclerectomy. *Am J Ophthalmol* 1962; 54: 688-91.

134. Elliot R. A preliminary note on a new operative procedure for the establishment of a filtering cicatrix in the treatment of glaucoma. *Ophthalmoscope* 1909; 2: 804-8.
135. Sugar H. Experimental trabeculectomy in glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1961; 51: 623-7.
136. Karalekas D, Hyderi A, Rosenberg L, Ruderman J, Krupin T. Effects of human glaucomatous and nonglaucomatous aqueous humor on fibroblast proliferation in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: S1898.
137. Joseph J, Grierson I, Hitchings R. Chemotactic activity of aqueous humor. A cause of failure of trabeculectomies? *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 69-74.
138. Heuer D, Gressel M, Parrish R. I. Trabeculectomy in aphakic eyes. *Ophthalmology* 1984; 91: 1045-51.
139. Hershler J, Clafflin A, Fiorentino G. The effect of aqueous humor on the growth of subconjunctival fibroblasts in tissue culture and its implications for glaucoma surgery. *Am J Ophthalmol* 1980; 89: 245-9.
140. Cotran R, Kumar V, Collins T, Robbins. *Patología estructural y funcional*. 6ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.; 2000: 95-120.
141. Ross R, Odland G. Human wound repair II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations and fibrogenesis. *J Cell Biol* 1968; 39: 152-68.
142. Peiffer R, Lipper S, Merrit J. Miofibroblasts in healing of filtering wounds in rabbit, dog and cat. *Glaucoma* 1981; 3: 277-80.
143. Ryan G. Myofibroblasts in human granulation tissue. *Human Pathol* 1974; 5: 55-67.
144. Robinson C. Growth factors: Therapeutic advances in wound healing. *Ann Med* 1993; 25: 535-8.
145. Chen W, Rogers A, Lydon M. Characterization of biologic properties of wound fluid collected during early stages of wound healing. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 559-64.
146. Frank M, Fries U. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 1991; 12: 322-69.
147. Kirsner R, Eaglstein H. The wound healing process. *Dermatol Clin* 1993; 11: 629-40.
148. Bennett N, Schultz G. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; 165: 728-37.
149. Jampel H, Morrison J, Vocci M, Quigley H. Identification of fibrin/fibrinogen in glaucoma filtering surgery wounds. *Ophthalmic Surg* 1988; 19: 576-9.
150. Fourman S, Vaid K. Effects of tissue plasminogen activator on glaucoma filter blebs in rabbits. *Ophthalmic Surg* 1989; 20: 663-7.
151. Joseph J, Grierson I, Hitchings R. Normal rabbit aqueous humor, fibronectin, and fibroblast conditioned medium are chemoattractant to Tenon's capsule fibroblasts. *Eye* 1987; 1: 585-92.
152. Chang L, Crowston J, Cordeiro M, Akbar A, Khaw P. The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2000; 45: 49-68.
153. Allansmith M, Grenier J, Baird R. Number of inflammatory cells in the normal conjunctiva. *Am J Ophthalmol* 1978; 86: 250-9.

154. Sacks E, Wieczorek R, Jakobiec F, Knowles D. Lymphocytic subpopulations in the normal human conjunctiva. A monoclonal antibody study. *Ophthalmology* 1986; 93: 1276-83.
155. Reichel M, Cordeiro M, Alexander R, Cree I, Bhattacharya S, Khaw P. New model of conjunctival scarring in the mouse eye. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 1072-7.
156. Simpson D, Ross R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest* 1972; 51: 2009-23.
157. Tonnesen M, Anderson D, Springer T, Knedler A, Ardi N, Henson D. Adherence of neutrophils to cultured human microvascular endothelial cells stimulated by chemotactic peptides and lipid mediators and dependence upon the Mac-1, LFA-1, p150, 95 glycoprotein family. *J Clin Invest* 1989; 83: 637-46.
158. Greshan H, Goodwin J, Allen P, Anderson D, Brown E. A novel member of the integrin receptor family mediates Arg-Gly-Asp stimulated neutrophil phagocytosis. *J Cell Biol* 1989; 108: 1935-43.
159. Issekutz I, Issekutz A, Movat H. The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. *Am J Pathol* 1981; 103: 47-55.
160. Norris D, Clark R, Swigart L, Huff J, Weston W, Howell S. Fibronectin fragments are chemotactic for human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1982; 129: 1612-8.
161. Leibovich S, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975; 78: 71-100.
162. Sheridan C, Unger W, Ayliffe W, Alam Y, Goldsmith J, O'Donoghue E, et al. Macrophages during fibrosis following scleral fistulising surgery in a rat model. *Curr Eye Res* 1996; 15: 559-68.
163. Martin C, Muir I. The role of lymphocytes in wound healing. *Br J Plastic Surg* 1990; 43: 655-62.
164. Fishel R, Barbul A, Beschoner W, Wasserkrug H, Efron G. Lymphocyte participation in wound healing. Morphologic assessment using monoclonal antibodies. *Ann Surg* 1987; 206: 25-9.
165. Nuzzi R, Vercelli A, Finazzo C, Cracco C. Conjunctiva and subconjunctival tissue in primary open-angle glaucoma after long-term topical treatment: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; 233: 154-62.
166. Wahl S, Gately C. Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell continuous T cell line origin. *J Immunol* 1983; 130: 1226-30.
167. Nielson E, Phillips S. Lymphokine modulation of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982; 128: 1484-6.
168. Postlethwaite A, Smith G, Mainardi C, Seyer C, Kang A. Lymphocyte modulation of fibroblast function in vitro: stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules. *J Immunol* 1984; 132: 2470-7.
169. Chizzolini C, Rezzonico R, Ribbens C, Burger D, Wollheim F, Dayer J. Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T cells: different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 2039-47.
170. Barbul A, Breslin R, Woodyard J, Wasserkrug H, Efron G. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg* 1989; 209: 479-83.
171. Penerson J, Barbul A, Breslin R, Wasserkrug H, Efron G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. *Surgery* 1987; 102: 300-5.

172. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-4.
173. Harris A, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 1981; 290: 249-51.
174. Bornstein P. Diversity of function inherent in matricellular proteins, an appraisal to thrombospondin 1. *J Cell Biol* 1995; 130: 503-6.
175. Gabbiani G. The biology of the myofibroblast. *Kidney International* 1992; 41: 530-2.
176. Reddick R, Merritt J, Ross G, Avery A, Peiffer R. Myofibroblasts in filtration operations. *Ann Ophthalmol* 1985; 17: 200-3.
177. Boucek R. Factors affecting wound healing. *Otol Clin North Am* 1984; 17: 243-64.
178. Bouissou H, Pieraggi M, Julian M, Uhart D, Kokolo J. Fibroblasts in dermal tissue repair. Electron microscopic and immunohistochemical study. *Int J Dermatol* 1988; 27: 564-70.
179. McGrath M. Healing of the open wound. En: Rudolph R. *Problems in anesthetic surgery. Biological causes and clinical solutions.* Toronto: The C.V. Mosby Company; 1986: 13-48.
180. Miller M, Grierson I, Unger W, Hitchings R. The effect of topical dexamethasone and preoperative beta irradiation on a model of glaucoma fistulizing surgery in the rabbit. *Ophthalmic Surg* 1990; 21: 44-54.
181. Bucala R, Spiegel L, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molec Med* 1994; 1: 71-81.
182. Chesney J, Metz C, Stavitsky A, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 1998; 160: 419-25.
183. Verdoon C, de Lavalette V, Dalma-Weizhausz J, Orr G, Sorgente N, Ryan S. Cellular migration, proliferation and contraction. An in vitro approach to a clinical problem-proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 1986; 104: 1216-9.
184. Pardee A. Biochemical and molecular events regulating cell proliferation. *J Pathol* 1986; 149: 1-2.
185. Gabbiani G, Hirschel B, Ryan G, Statkov P, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med* 1972; 135: 719-34.
186. Braunstein P, Cuénoud H, Joris I, Majno G. Platelets, fibroblasts and inflammation. *Am J Pathol* 1980; 99: 53-7.
187. Sappino A, Schürch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990; 63: 144-60.
188. Regan M, Kirk S, Wasserkrug H, Barbul A. The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. *J Surg Res* 1991; 50: 442-8.
189. Skalli O, Gabbiani G. The biology of the myofibroblast: relationship to wound contraction and fibrocontractive diseases. En: Clark R, Henson P. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair.* New York: Plenum Publishing Corp; 1988: 373-402.
190. Kreis T, Birchmeier W. Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 1980; 22: 555-61.
191. Birkedal-Hansen H, Cobb C, Taylor R, Fullmer H. Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1976; 251: 3162-8.

192. Hynes R, Yamada K. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 1982; 95: 369-77.
193. Vernon R, Sage E. Between molecules and morphology: Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol* 1995; 147: 873-83.
194. Kanzler M, Corsulowsky D, Swanson N. Basic mechanisms in the healing of cutaneous wound. *J Dermatol Surg Oncol* 1986; 12: 1156-64.
195. Goetzi E, Banda M, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996; 156: 1-4.
196. Turner A, Tanzawa K. Mammalian membrane metalloproteinases. *FASEB J* 1997; 11: 355-64.
197. Matrisian L. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992; 14: 455-63.
198. Stetler-Stevenson W. Dynamics and matrix turnover during pathologic remodeling of the ECM. *Am J Pathol* 1996; 148: 1345-50.
199. Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 957-1003.
200. Peacock E, Van Winkle W. Surgery and biology of wound repair. Philadelphia: Saunders; 1970.
201. Prockop D, Kivirikko K. Collagens: molecular biology, diseases and potential for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 403-34.
202. McGuigan L, Quigley H, Young E, Luttj G. Drug effects of proliferation and collagen synthesis of conjunctival fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: S125.
203. Dvorak H. "Tumors: Wounds that do not heal; similarities between tumor stroma generation and wound healing". *N Engl J Med* 1986; 315: 1650-9.
204. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattice by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1274-8.
205. Sandberg-Lall M, Hägg P, Wahlström I, Pihlajaneimi T. Type XIII collagen is widely expressed in the adult and developing human eye and accentuated in the ciliary muscle, the optic nerve and the neural retina. *Exp Eye Res* 2000; 70: 401-10.
206. Olsen B, McCarthy M. Molecular structure of the sclera, cornea and vitreous body. En: Albert D, Jakobiec F, ed. Principles and practice of ophthalmology. Basic sciences. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1994: 38-45.
207. Rosenbloom J, Abrams W, Mecham R. Extracellular matrix 4: elastic fiber. *FASEB J* 1993; 7: 1208-18.
208. Potts J, Campbell I. Fibronectin structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 648-55.
209. Hynes R. Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
210. Clark E, Brugge J. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268: 233-9.
211. Freshney R. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York: Wiley-Liss; 2000.
212. Doherty P, Ashton S, Moore S, Walsh F. Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be counted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca⁺⁺ channels. *Cell* 1991; 67: 21-33.
213. Laurent T. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol* 1996; 74: A1-A7.

214. Cohen I, Diegelmann R. Wound healing in cosmetic surgery. En: Rudolph R. An overview. Problems in anesthetic surgery. Biological causes and clinical solutions. Toronto: The C.V. Mosby Company; 1986: 1-11.
215. Ryan R, Buren E. Wound healing. En: Saad M, Lichtveld P. Reviews in plastics surgery. General plastic and reconstructive surgery. Amsterdam: Excerpta Medica; 1974: 141-53.
216. Liang L, Epstein D. Comparison of mitomycin C and 5-fluorouracil on filtration surgery success in rabbit eyes. *J Glaucoma* 1992; 1: 87-93.
217. Grillo H. Origin of fibroblasts in wound healing: an autoradiographic study of inhibition of cellular proliferation by local X-irradiation. *Ann Surg* 1963; 157: 453-9.
218. McGuigan L, Cook D, Yablonski M. Dexamethasone, D-penicillamine, and glaucoma filter surgery in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 1755-7.
219. Berridge M. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-25.
220. Montminy M. Transcriptional regulation by cAMP. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 807-22 .
221. Ihle J. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995; 377: 591-4.
222. Hill C, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 1995; 80: 199-211.
223. Morgan D. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 274: 131-4.
224. Khaw P, Occeleston N, Larkin G. The effects of growth factors on human ocular fibroblast proliferation, migration and collagen production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: S1898.
225. Heldin C. Structural and functional studies of platelet-derived growth factor. *EMBO J* 1992; 11: 4251-9.
226. Ellis D, Cheng Q, Lee D. The effects of growth factors on Tenon's capsule fibroblasts in serum-free culture. *Curr Eye Res* 1996; 15: 27-35.
227. Cordon-Cardo C, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissue. *Lab Invest* 1990; 63: 832-40.
228. Gillies M, Brooks A, Young S, Gillies B, Simpson J, Goldberg I. A randomized phase II trial of interferon-alpha 2b versus 5-fluorouracil after trabeculectomy. *Aust N Z J Ophthalmol* 1999; 27: 37-44.
229. Daniels J, Occeleston N, Crowston J, Khaw P. Effects of antimetabolite induced cellular growth arrest of fibroblast-fibroblast interactions. *Exp Eye Res* 1999; 69: 117-27.
230. Kawa S, Kimura S, Hkomori S, Igarashi Y. Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine 1-phosphate. *FEBS Letters* 1997; 420: 196-200.
231. Lamb R, Henningan R, Katsanakis K, Turnbull K, MacKenzie E, Birnie G, et al. AP-1mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor, CD44. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 963-76.
232. Wong J, Wang N, Miller J, Schuman J. Modulation of human fibroblast activity by selected angiogenesis inhibitors. *Exp Eye Res* 1994; 58: 439-51.
233. Genever P, Wood E, Cunliffe W. The wounded dermal equivalent offers a simplified model of studying wound repair in vitro. *Exp Dermatol* 1993; 2: 266-73.

234. Landegren U. Measurement of cells numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase: applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods* 1984; 67: 379-88.
235. Hu D, Chen P, Oda D. The effect of mitomycin C after long-term storage on human Tenon's fibroblast proliferation. *J Glaucoma* 1999; 8: 302-5.
236. Iwaki T, Iwaki A, Fukumaki Y, Tateishi J. Alpha B-crystallin in C6 glioma cells supports their survival in elevated extracellular K⁺: the implication of a protective role of alpha B-crystallin accumulation in reactive glia. *Brain Res* 1995; 673: 47-52.
237. Paikal D, Zhang G, Cheng Q, Lee D. The effect of integrin antibodies on the attachment and proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts. *Exp Eye Res* 2000; 70: 393-400.
238. Beck R, Nebe B, Guthoff R, Rychly J. Inhibition of lens epithelial cell adhesion by the calcium antagonist mibefradil correlates with impaired integrin distribution and organization of the cytoskeleton. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239: 452-8.
239. Denk P, Roth-Eichhorn S, Gressner A, Knorr M. Cytokine regulation of hyaluronate production by human Tenon's capsule fibroblasts. *Curr Eye Res* 2000; 20: 77-80.
240. Gross R. Collagen type I and III synthesis by Tenon's capsule fibroblasts in culture: individual patient characteristics and response to mitomycin C, 5-fluorouracil, and ascorbic acid. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1999; 97: 513-43.
241. Tripathi R, Li J, Chalam K, Tripathi B. Expression of growth factor mRNAs by human Tenon's capsule fibroblasts. *Exp Eye Res* 1996; 63: 339-46.
242. Pinilla I, Ramírez T, Pablo L, Polo V, Larrosa J, Honrubia F. Fibroblast alterations in cell culture induced by mitomycin C in experimental filtering surgery. *Ann Ophthalmol* 2000; 32: 120-2.
243. Litin B, Kwong E, Jones M, Herschler J. Effects of antineoplastic drugs on cell proliferation-individually and in combination. *Ophthalmic Surg* 1985; 16: 34-9.
244. Lee D, Lee T, Cortes A, Kitada S. Effects of mithramycin, mitomycin, daunorubicin, and bleomycin on human subconjunctival fibroblast attachment and proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 2136-44.
245. Van Bockxmeer F, Martin C, Thompson D, Constable I. Taxol for the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 1140-7.
246. Jampel H, Koya P, Leong K, Quigley H. In vitro release of hydrophobic drugs from polyanhydride disks. *Ophthalmic Surg* 1991; 22: 676-80.
247. Perkins T, Faha B, Ni M, Kiland J, Poulsen G, Antelman D, et al. Adenovirus-mediated gene therapy using human p21WAF-1/cip-1 to prevent wound healing in a rabbit model of glaucoma filtration surgery. *Ach Ophthalmol* 2002; 120: 941-9.
248. Joyce N, Matkin E, Neufeld A. Corneal endothelial wound closure in vitro. Effects of EGF and/or indomethacin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1548-59.
249. Stenn K. Quantitative assay of dissociated tissue cell motility in vitro. *In Vitro* 1980; 16: 357-60.

250. Khaw P, Sherwood M, Mackay S, Rossi M, Schultz G. Five-minute treatments with fluorouracil, floxidine, and mitomycin have long-term effects on human Tenon's capsule fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 1150-4.
251. Khaw P, Migdal C. Current techniques in wound healing modulation in glaucoma surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 1996; 7: 24-33.
252. Young T, Higginbotham E, Zou X, Farber M. Effects of topical glaucoma drugs on fistulized rabbit conjunctiva. *Ophthalmology* 1990; 97: 1423-7.
253. Sherwood M, Grierson I, Millar L, Hitchings R. Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology* 1989; 96: 327-35.
254. Araujo S, Spaeth G, Roth S, Starita R. A ten-year follow-up on a prospective, randomized trial of postoperative corticosteroids after trabeculectomy. *Ophthalmology* 1995; 102: 1753-9.
255. Cantor L, Boeglin R, Kramer D, Phillips C. The effect of topical flurbiprofen on trabeculectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: S1121.
256. Khaw P, Ward S, Grierson I, Rice N. Effect of beta radiation on proliferating human Tenon's capsule fibroblasts. *Br J Ophthalmol* 1991; 75: 580-3.
257. McGuigan L, Mason R, Sánchez R, Quigley H. D-penicillamine and beta-aminopropionitrile effects on experimental filtering surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28: 1625-9.
258. Moorhead L. Inhibition of collagen cross-linking: A approach to ocular scarring. *Curr Eye Res* 1981; 1: 77-83.
259. Yamanaka O, Saika S, Akedo H, Ohnishi Y, Ooshima A. In vitro effects of gamma-interferon on Tenon's capsule fibroblast collagen and laminin production in the presence of transforming growth factor-beta. In: *Societas Ophthalmologica Europaea*. Bologna: Monduzzi Editore S.p. A; 1997: 567-70.
260. Ortiz J, Walker S, McManus P, Martínez L, Brown R, Jaffe G. Filtering bleb thrombolysis with tissue plasminogen activator. *Am J Ophthalmol* 1988; 106: 624-5.
261. Cordeiro M, Siriwardena D, Chang L, Khaw P. Wound healing modulation after glaucoma surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2000; 11: 121-6.
262. Sheridan C, O'Donoghue , McLeod D, Unger W. Taxol extends survival of sclerostomy and prolongs aqueous drainage in rabbit model for glaucoma failure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: S727.
263. Jampel H, Thibault D, Leong K, Uppal P, Quigley H. Glaucoma filtration surgery in nonhuman primates using taxol and etoposido in polyanhydride carriers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 3076-83.
264. Jampel H, Moon J. The effect of paclitaxel powder on glaucoma filtration surgery in rabbits. *J Glaucoma* 1998; 7: 170-7.
265. Rojo A, Pablo L, Polo V, Ramírez T, Abecia E, Pinilla I, et al. Effects of different dosages of Taxol in a model of experimental filtering surgery. In: *Societas Ophthalmologica Europaea*. Bologna: Monduzzi Editore S.p. A; 1997: 513-6.
266. Mallick K, Hajek A, Parish R. Fluorouracil (5-FU) and cytarabine (Ara-C) inhibition of corneal cells and conjunctival fibroblast proliferation. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 1398-402.
267. Heuer D, Parrish R, Gressel M, Hodapp E, Palmberg P, Anderson D. 5-fluorouracil and glaucoma filtering surgery: II. A pilot study. *Ophthalmology* 1984; 91: 384-94.

268. Ruderman J, Welch D, Smith M, Shoch D. A randomized study of 5-fluorouracil and filtration surgery. *Am J Ophthalmol* 1987; 104: 168-73.
269. Heuer D, Parrish R, Gressel M, Hodapp E, Desjardins D, Skuta G, et al. 5-fluorouracil and glaucoma filtering surgery: III. Intermediate follow-up of a pilot study. *Ophthalmology* 1986; 93: 1537-46.
270. The Fluorouracil Filtering Surgery Study Group. Fluorouracil Filtering Surgery Study three-year follow-up. *Am J Ophthalmol* 1993; 115: 82-92.
271. Ophir A, Ticho U. Filtering surgery with 5-fluorouracil: a second course. *Eye* 1990; 4: 819-22.
272. Liebmann J, Ritch R, Marmor M, Nunez J, Wolner B. Inicial 5-fluorouracil trabeculectomy in uncomplicated glaucoma. *Ophthalmology* 1991; 98: 1036-41.
273. Wilson R, Steinmann W. Use of trabeculectomy with postoperative 5-fluorouracil in patients requiring extremely low intraocular pressure levels to limit further glaucoma progression. *Ophthalmology* 1991; 98: 1047-52.
274. Weinreb R. Adjusting the dose of 5-fluorouracil after filtration surgery to minimize side effects. *Ophthalmology* 1987; 94: 564-70.
275. Claasen E, Kortbeek H, Arwert F. Effects of mitomycin C on rate of DNA syntesis in normal and Fanconi anaemia cells. *Mutation Research* 1986; 16: 515-9.
276. Tomasz M, Chowdary D, Lipman R, Shimotakahara S, Veiro D, Walker V, et al. Reaction of DNA with chemically or enzymatically activated mitomycin-C: isolation and structure of the mayor covalent adduct. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 6702-6.
277. Tomasz M. Isolation and structure of covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* 1987; 235: 1204-8.
278. Pasquale L, Thibault D, Dorman-Pease M, Quigley H, Jampel H. Effect of topical mitomycin C on glaucoma filtration surgery in monkeys. *Ophthalmology* 1992; 99: 14-8.
279. Bergstrom T, Wilkison W, Skuta G, Watniek R, Elner V. The effects of subconjunctival mitomycin-C on glaucoma filtration surgery in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1725-30.
280. Khaw P, Doyle J, Sherwood M, Smith M, McGorray S. Effects of intraoperative 5-fluorouracil or mitomycin C on glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Ophthalmology* 1993; 100: 367-72.
281. Pinilla I, Polo V, Larrosa J, Pablo L, Abecia E, Rojo A, et al. Subconjunctival injection of Mitomycin-C: small dose that inhibits fibroblast proliferation on culture cell. En: *Societas Ophthalmologica Europaea*. Bologna: Monduzzi Editore S.p.A; 1997: 493-7.
282. Pablo L, Ramírez T, Álvarez R, González I, Larrosa J, Honrubia F. Morphometric study of wound healing in a model of filtering surgery with mitomycin-C. *Europ J Ophthalmol* 1995; 5: 168-72.
283. Palmer S. Mitomycin as adjunct chemotherapy whit trabeculectomy. *Ophthalmology* 1991; 98: 317-21.
284. Cheung J, Wright M, Murali S, Pederson J. Intermediate-term outcome of variable dose of mitomycin C filtering surgery. *Ophthalmology* 1997; 104: 143-9.
285. Pablo L, Ramírez T, Pinilla I, González I, Pueyo M, Honrubia F. Long-term effects of mitomycin-c in wound healing. Electron microscopic findings. *Ann Ophthalmol* 1996; 28: 372-5.

286. Lee C, Chen C, Chao M. A study of inhibitory effect of mitomycin-C on fibroblasts in cell culture. *Trans Ophthalmol Soc ROC* 1986; 25: 752-60.
287. Pinilla I, Polo V, Larrosa J, Abecia E, Pablo L, Lanas A, et al. Tissue effects of subconjunctival injection of MMC: conjunctival and scleral toxicity. *Ann Ophthalmol* 1999; 31: 318-21.
288. Pablo L, Larrosa J, Ronchera J, Abecia E, Pinilla I, Gómez M, et al. Effectiveness of intraoperative versus subconjunctival mitomycin-c on glaucoma filtering surgery in the rabbit. *Ann Ophthalmol* 1996; 28: 35-9.
289. Larrosa J, Pinilla I, Ferrer J, Sánchez A, Pablo L, Martínez M, et al. Cuantificación de la aplicación de MMC en cirugía filtrante (II): distribución intraoperatoria en un modelo experimental. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1996; 71: 553-8.
290. Pinilla I, Honrubia F, Larrosa J, Polo V, Pablo L, Abecia E, et al. Efecto de la dosificación peroperatoria de mitomicina-c sobre la proliferación de fibroblastos de origen escleral y conjuntival. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1997; 72: 119-24.
291. Pablo L, Ramírez T, Pinilla I, Ronchera J, Abecia E, Fernández F, et al. Evolución histológica tras la aplicación de mitomicina-c en la cirugía filtrante experimental. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1996; 70: 179-86.
292. Khaw P, Doyle J, Sherwood M, Grierson I, Schultz G, McGorray S. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 263-7.
293. Singh K, Egbert P, Byrd S, Budenz D, Williams A, Decker J, et al. Trabeculectomy with intraoperative 5-fluorouracil vs mitomycin C. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 48-53.
294. Skuta G, Beeson C, Higginbotham E, Lichter P, Musch D, Bergstrom T, et al. Intraoperative mitomycin versus postoperative 5-fluorouracil in high-risk glaucoma filtering surgery. *Ophthalmology* 1992; 99: 438-44.
295. Kitazawa Y, Kawase K, Matsushita H, Minobe M. Trabeculectomy with mitomycin. A comparative study with fluorouracil. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1693-8.
296. Hong C, Hyung S, Song K, Kim D, Youn D. Effects of topical mitomycin C on glaucoma filtration surgery. *Korean J Ophthalmol* 1993; 7: 1-10.
297. Zacharia P, Deppermann S, Schuman J. Ocular hypotony after trabeculectomy with mitomycin C. *Am J Ophthalmol* 1993; 116: 314-26.
298. Kitazawa Y, Matsushita H, Yamamoto T, Kawase K. Low-dose and high-dose mitomycin trabeculectomy as an initial surgery in primary open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 1993; 100: 1624-8.
299. Nuyts R, Pels E, Greve EL. The effects of 5-fluorouracil and mitomycin-C on the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: S737.
300. Heniz C, Hudde T, Heise K, Stenhl K. Antiproliferative effect of mycophenolate mofetil on cultured human Tenon fibroblasts. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002; 240: 408-14.
301. Nuzzi R, Cerruti A, Finazzo C. Cyclosporine C: a study of wound healing modulation after trabeculectomy in rabbit. *Acta Ophthalmol Scand* 1998; suppl: 48-9.
302. Salas-Prato M, Assalian A, Mehdi A, Duperre J, Thompson, Brazeau P. Inhibition by rapamycin of PDGF- and bFGF-induced human Tenon fibroblast proliferation in vitro. *J Glaucoma* 1996; 5: 54-9.

303. Al-Aswad L, Huang M, Netland P. Inhibition of Tenon's fibroblast proliferation and enhancement of filtration surgery in rabbits with cytosine arabinoside. *J Ocul Pharmacol* 1999; 15: 41-9.
304. Denk P, Knorr M. In vitro effect of ascorbic acid on the proliferation of bovine scleral and Tenon's capsule fibroblasts. *Eur J Ophthalmol* 1998; 8: 37-41.
305. Larrosa J, Polo V, Ramírez T, Pinilla I, Pablo L, Honrubia F. Alpha-tocopherol derivatives and wound healing in an experimental model of filtering surgery. *Ophthalmic Surg Lasers* 2000; 31: 131-5.
306. Larrosa J, Polo V, Ramírez T, Pinilla I, Pablo L, Cuevas R, et al. Evaluación histopatológica de la acción de derivados de la vitamina E en el proceso cicatricial de un modelo de cirugía filtrante. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000; 75: 523-8.
307. Oshima T, Kurosaka D, Kato K, Kurosaka H, Mashima Y, Tanaka Y, et al. Tranilast inhibits cell proliferation and collagen synthesis by rabbit corneal an Tenon's capsule fibroblasts. *Curr Eye Res* 2000; 20: 283-6.
308. Krott R, Lebek J, Grisanti S, Luke C, Esser P, Krieglstein G. Antiproliferative effect of Genistein in cultured human Tenon-fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: S117.
309. Siriwardena D, Khaw P, King A, Donaldson M, Overton B, Migdal C, et al. Human antitransforming growth factor beta(2) monoclonal antibody - a new modulator of wound healing in trabeculectomy: A randomized placebo controlled clinical study. *Ophthalmology* 2002; 109: 427-31.
310. Osborn M, Weber K. Damage of cellular functions by trifluoperazine, a calmodulin-specific drug. *Exp Cell Res* 1980; 130: 484-8.
311. Soong H, Cintron C. Different corneal epithelial healing mechanisms in rat and rabbit: role of actin and calmodulin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 838-48.
312. Trinkhaus-Randall V, Gipson I. The role of calcium and calmodulin in hemidesmosome formation in vitro. *J Cell Biol* 1984; 98: 1565-71.
313. Gupta B, Agarwala A, Moy J, Edwar D. The effects of subconjunctival verapamil on filtering blebs in rabbits. *Ophthalmic Surg Lasers* 1996; 27: 378-83.
314. Daniels J, Cambrey A, Occeleston N, Garrett Q, Tarnuzzer R, Schultz G, et al. Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1104-10.
315. Mietz H, Chévez-Barrios P, Feldman R, Lieberman M. Suramin inhibits wound healing following filtering procedures for glaucoma. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 816-20.
316. Tannous M, Hutnik C, Tingey D, Mutus B. S-nitrosoglutathione photolysis as a novel therapy for antifibrosis in filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 749-55.
317. Karlen M, Sánchez E, Schnyder C, Sickenberg M, Mermoud A. Deep sclerostomy with collagen implant: medium term results. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 6-11.
318. Sourdille P, Santiago P, Villain F, Yamanichi M, Tahi H, Parel J, et al. Reticulated hyaluronic acid implant in nonperforating trabecular surgery. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25: 332-9.
319. Cordeiro M, Schultz G, Ali R, Bhattacharya S, Khaw P. Molecular therapy in ocular wound healing. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 1219-24.

320. Chang M, Cheng Q, Lee D. Basic science and clinical aspects of wound healing in glaucoma filtering surgery. Review. *J Ocul Pharmacol* 1998; 14: 75-95.
321. Akimoto M, Hangai M, Okazaki K, Kogishi J, Honda Y, Kaneda Y. Growth inhibition of cultured human Tenon's fibroblastic cells by targeting the E2F transcription factor. *Exp Eye Res* 1998; 67: 395-401.
322. Holick M, Krane S, Potts J. Metabolismo óseo, del calcio y del fósforo: hormonas reguladoras del calcio. En: Isselbacher K, Braunwald E, Wilson J, Martin J, Fauci A, Kasper D. Harrison. Principios de Medicina Interna. 13ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España; 1994; II: 2461-77.
323. Flórez J. Acciones de los fármacos II. Mecanismos moleculares. En: Flórez J, Armijo J, Mediavilla A, eds. Farmacología humana (3ª ed). Barcelona: Masson S.A.; 1997: 17-45.
324. Catterall W. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 1988; 242: 50-61.
325. Berridge M. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 1997; 499: 291-306.
326. Berridge M. Capacitative calcium entry. *Biochem J* 1995; 312: 1-11.
327. Braunwald E. Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. *N Engl J Med* 1982; 307: 1618-27.
328. Catterall W. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends Neurosci* 1993; 16: 500-6.
329. Nowycky M, Fox A, Tsien R. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; 316: 440-3.
330. García A, Michelena P, Gandía L. Fármacos antagonistas del calcio. En: Flórez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología humana. 3ª ed. Barcelona: Masson S.A.; 1997: 637-47.
331. Ertel E, Campbell K, Harpold M, Hofmann F, Mori Y, Pérez-Reyes E, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000; 25: 533-5.
332. Spedding M, Paoletti R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 363-76.
333. Tsien R, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 1988; 11: 431-8.
334. Miller R. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 1992; 267: 1403-6.
335. Krizanova O, Diebold R, Lory O, Schwartz A. molecular aspects and diversity of voltage-dependent calcium channels. *Circulation* 1993; 187: 44-8.
336. Campbell K, Leung A, Sharp A. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci* 1988; 11: 425-30.
337. Bezprozvanny I, Tsien R. Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca²⁺ channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol Pharmacol* 1995; 48: 540-9.
338. Lacinová L, Ludwig A, Bosse E, Flockerzi V, Hofmann F. The block of the expressed L-type calcium channel is modulated by the beta 3 subunit. *FEBS Lett* 1995; 373: 103-7.
339. Krizanova O, Lory P, Schwartz A. Structure-function studies of the voltage-dependent calcium channels. En: Godfraind T, Govoni S, Paoletti R, Vanhoutte P, eds. Calcium antagonists. Pharmacology and clinical research. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1993: 1-8.

340. Lacinová L, An R, Xia J, Ito H, Klugbauer N, Triggle D, et al. Distinctions in the molecular determinans of charged and neutral dihydropyridine block of L-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 1472-9.
341. Schuster A, Lacinová L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F. The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J* 1996; 15: 2365-70.
342. Melena J, Stanton D, Osborne N. Comparative effects of antiglaucoma drugs on voltage-dependent calcium channels. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239: 522-30.
343. Cheung W. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 1980; 207: 19-27.
344. Hardingham G, Bading H. Calcium as a versatile second messenger in the control of gene expression. *Microsc Res Tech* 1999; 46: 348-55.
345. Finkbeiner S, Greenberg M. Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression. *J Neurobiol* 1998; 37: 171-89.
346. McPherson P, Campbell K. The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *Biol Chem* 1993; 268: 13765-8.
347. Sucher N, Lei S, Lipton S. Calcium channel antagonists attenuate NMDA receptor-mediated neurotoxicity of retinal ganglion cells in culture. *Brain Res* 1991; 297: 297-302.
348. Yao Y, Parker I. Inositol trisphosphate-mediated Ca²⁺ influx into *Xenopus* oocytes triggers Ca²⁺ liberation from intracellular stores. *J Physiol* 1993; 468: 275-96.
349. Lupu-Meiri M, Beit-Or A, Christensen S, Oron Y. Calcium entry in *Xenopus* oocytes - effects of inositol trisphosphate, thapsigargin and DMSO. *Cell Calcium* 1993; 14: 101-10.
350. Petersen C, Berridge M. The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1994; 269: 32246-53.
351. Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T. Receptor activated Ca²⁺ influx: How many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol* 1994; 15: 77-83.
352. Clapham D. Calcium signalling. *Cell* 1995; 80: 259-68.
353. Randriamampita C, Tsien R. Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* 1993; 364: 809-14.
354. Hiroishi G, Kobayashi S, Inomata H, Kanaide H. The role of [Ca²⁺]_i during proliferation by platelet derived growth factor in bovine corneal keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: S502.
355. Smith S, Augustine G. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci* 1988; 11: 458-64.
356. Nahorski S. Inositol polyphosphates and neuronal calcium homeostasis. *Trends Neurosci* 1988; 11: 444-8.
357. Salazar J, Ramírez A, de Hoz R, Rojas B, Triviño A, Ramírez J. Apoptosis en neuropatía óptica isquémica. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000; 75: 819-24.
358. Finkbeiner S, Greenberg M. Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression. *J Neurobiol* 1998; 37: 171-89.

359. Bootman M, Berridge M. The elemental principles of calcium signalling. *Cell* 1995; 83: 675-8.
360. Meldolesi J, Volpe P, Pozzan T. The intracellular distribution of calcium. *Trends Neurosci* 1988; 11: 449-52.
361. Meldolesi J, Madeddu L, Pozzan T. Intracellular Ca^{2+} storage organelles in non-muscle cells: heterogeneity and functional assignment. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1055: 130-40.
362. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 1994; 74: 595-636.
363. Gunter T, Pfeiffer D. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 1990; 258: C755-86.
364. Fill M, Coronado R. Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. *Trends Neurosci* 1988; 11: 453-7.
365. Berridge M. A tale of two messengers. *Nature* 1993; 365: 388-9.
366. Berridge M. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signalling organelle. *Cell Calcium* 2002; 32: 235-49.
367. Sorrentino V, Volpe P. Ryanodine receptors. How many, where and why? *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 98-103.
368. Henzi V, MacDermott A. Characteristics and function of Ca^{2+} - and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of Ca^{2+} in neurons. *Neuroscience* 1992; 46: 251-73.
369. Danoff S, Supattapone S, Snyder S. Characterization of a membrane protein from brain mediating the inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding by calcium. *Biochem J* 1988; 254: 701-5.
370. Galione A. Cyclic ADP-ribose: A new way to control calcium. *Science* 1993; 259: 325-6.
371. Lytton J, Nigam S. Intracellular calcium: molecules and pools. *Curr Biol* 1992; 4: 220-6.
372. Robb-Gaspers L, Rutter G, Burnett P, Hajnóczky G, Denton R, Thomas A. Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1366: 17-32.
373. Vaghy P, Johnson J, Matlib M, Wang T, Schwartz A. Selective inhibition of Na^{+} -induced Ca^{2+} release from heart mitochondria by diltiazem and certain other Ca^{2+} antagonist drugs. *J Biol Chem* 1982; 257: 6000-2.
374. Watterson D, Sharief F, Vanaman T. The complete amino acid sequence of the Ca^{2+} -dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *J Biol Chem* 1980; 255: 962-75.
375. Klee C, Crouch T, Richman P. Calmodulin. *Ann Rev Biochem* 1980; 49: 489-515.
376. Freissmuth M, Gilman A. Proteínas G y la regulación de los sistemas de segundos mensajeros. En: Isselbacher K, Braunwald E, Wilson J, Martin J, Fauci A, Kasper D. Harrison. *Principios de Medicina Interna*. 13ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España. 1994; Vol I: 497-503.
377. Welsh M, Dedman J, Brinkley B, Means A. Calcium-dependent regulator protein: localization in mitotic apparatus of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 1867-71.
378. Yamada H, Mizuguchi J, Nakanishi M. Antigen receptor-mediated calcium signals in B cells as revealed by confocal fluorescence microscopy. *FEBS Lett* 1991; 284: 249-51.

379. Roche E, Prentki M. Calcium regulation of immediate-early response genes. *Cell Calcium* 1994; 16: 331-8.
380. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 599-609.
381. Negulescu P, Shastri N, Cahalan M. Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2873-7.
382. Strobeck M, Okuda M, Yamaguchi H, Schwartz A, Fukasawa K. Morphological transformation induced by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway requires suppression of the T-type Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 1999; 274: 15694-700.
383. Banding H, Ginty D, Greenberg M. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signalling pathways. *Science* 1993; 260: 181-6.
384. Takawa N, Kumada M, Yamashita K, Takawa Y. Mechanisms of bombesin-induced arachidonate mobilization in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 14237-43.
385. Chao T, Byron K, Lee K, Villareal M, Rosner M. Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1992; 267: 19876-83.
386. Means A. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. *FEBS Lett* 1994; 347: 1-4.
387. Rasmussen C, Garen C. Activation of calmodulin-dependent enzymes can be selectively inhibited by histone H1. *J Biol Chem* 1993; 268: 23788-91.
388. Burns K, Duggan B, Atkinson E, Famulki K, Nemer M, Bleackley R, et al. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* 1994; 367: 476-80.
389. Schmunk G, Lefer A. Anti-aggregatory actions of calcium channel blockers in cat platelets. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1982; 35: 179-87.
390. Glusa E, Bevan J, Heptinstall S. Verapamil is a potent inhibitor of 5-HT-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 1989; 55: 239-45.
391. Addonizio V, Fisher C, Strauss J, Edmunds L. Inhibition of human platelet function by verapamil. *Thromb Res* 1982; 28: 545-56.
392. Bonadonna G, Lechi C, Corradini P, Sinigaglia D, De Togni P, Miroslawa G. Verapamil inhibits platelet aggregation by a calcium-independent mechanism. *Thromb Haemost* 1986; 56: 308-10.
393. Han P, Boatwright C, Ardlie N. Effect of the calcium-entry blocking agent nifedipine on activation of human platelets and comparison with verapamil. *Thromb Haemost* 1983; 50: 513-7.
394. Trollinger D, Isseroff R, Nuccitelli R. Calcium channel blockers inhibit galvanotaxis in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 2002; 193: 1-9.
395. Lorca T, Cruzalegui F, Fesquet D, Cavadore J, Méry J, Means A. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 1993; 366: 270-3.
396. Han J, Fukami K, Nuccitelli R. Reducing inositol lipid hydrolysis, Ins(1,4,5)P₃ receptor availability, or Ca²⁺ gradients lengthens the duration of the cell cycle in *Xenopus laevis* blastomeres. *J Cell Biol* 1992; 116: 147-56.

397. Smith M, Liu Y, Matthews N, Rhee S, Sung W, Kung H. Phospholipase C-gamma 1 can induce DNA synthesis by a mechanism independent of its lipase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6554-8.
398. Matuoka K, Fukami K, Nakanishi O, Kawai S, Takenawa T. Mitogenesis in response to PDGF and bombesin abolished by microinjection of antibody to PIP2. *Science* 1988; 239: 640-3.
399. Mason R. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis: implications for carcinogenic potential. *Cancer* 1999; 85: 2093-102.
400. Ebadi M. *Pharmacology*. 2^a ed. Boston: A Little, Brown Review Book; 1993: 409-19.
401. Lüscher T, Cosentino F. The classification of calcium antagonists and their selection in the treatment of hypertension. A reappraisal. *Drugs* 1998; 55: 509-17.
402. Abbasoglu O, Kooner K. Future role of neuroprotective agents in glaucoma. En: Zimmerman T, Kooner K, Sharir M, Fechtner R. *Textbook of Ocular Pharmacology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997: 329-39.
403. Monica M, Hesse R, Messerli F. The effect of a calcium-channel blocking agent on intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* 1983; 96: 814.
404. Abelson M, Gilbert C, Smith L. Sustained reduction of intraocular pressure in humans with the calcium channel blocker verapamil. *Am J Ophthalmol* 1988; 105: 155-9.
405. Melena J, Santafe J, Segarra J. The effect of topical diltiazem on the intraocular pressure in betamethasone-induced ocular hypertensive rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 278-82.
406. Abreu M, Kim Y, Shin D, Netland P. Topical verapamil and episcleral venous pressure. *Ophthalmology* 1998; 105: 2251-5.
407. Siegner S, Netland P, Schroeder A, Erickson K. Effect of calcium channel blockers alone and in combination with antiglaucoma medications on intraocular pressure in the primate eye. *J Glaucoma* 2000; 9: 334-9.
408. Beatty J, Krupin T, Nichols P, Becker B. Elevation of intraocular pressure by calcium channel blockers. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 1072-6.
409. Harino S, Riva C, Petrig B. Intravenous nifedipine in cats increases optic nerve head but not retinal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 2885-90.
410. Rainer G, Kiss B, Dallinger S, Findl O, Georgopoulos M, Vass C, et al. A double masked placebo controlled study on the effect of nifedipine on optic nerve blood flow and visual field function in patients with open angle glaucoma. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52: 210-2.
411. Glossmann H, Ferry D, Lübbcke F, Newes R, Hofmann F. Calcium channels: direct identification with radioligand binding studies. *Trends Pharmacol Sci* 1982; 3: 431-7.
412. Guengerich F, Martín M, Beaune P, Kremers P, Wolf T, Waxman D. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 1986; 246: 5051-60.
413. Mehta J, Mehta P, Ostrowski N. Calcium blocker diltiazem inhibits platelet activation and stimulates vascular protacyclin synthesis. *Am J Med Sci* 1986; 291: 20-4.
414. Jensen R, Origitano T, Lee Y, Weber M, Wurster R. In vitro growth inhibition of growth factor-stimulated meningioma cells by calcium channel antagonists. *Neurosurgery* 1995; 36: 365-73.

415. Dartsch P, Ritter M, Gschwentner M, Lang H, Lang F. Effects of calcium channel blockers on NIH 3T3 fibroblasts expressing the Ha-ras oncogene. *Eur J Cell Biol* 1995; 67: 372-8.
416. Lijnen P, Fagard P, Petrov V. Proliferation of human peripheral blood mononuclear cells during calcium channel blockade. *Am J Hypertens* 1998; 11: 1461-8.
417. Schlutz P, Raji L. Inhibition of human mesangial cell proliferation by calcium channel blockers. *Hypertension* 1990; 15(Suppl): 76-80.
418. Lichtmann A, Segel G, Lichtmann M. The role of calcium in lymphocyte proliferation. An interpretive review. *Blood* 1983; 61: 413-22.
419. Hoffman S, Spee C, Ehren M, Cui J, Schubert C, Kohen D, et al. Effect of the calcium antagonist verapamil on the serum induced proliferation of RPE cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: S389.
420. Roth M, Eickelberg O, Kohler E, Erne P, Block L. Ca²⁺ channel blockers modulate metabolism of collagens within the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5478-82.
421. Elferink J, Deierkauf M. The effect of verapamil and other calcium antagonist on chemotaxis of polymorfonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 35-9.
422. Steinleitner A, Lambert H, Kazensky C, Sánchez I, Sueldo C. Reduction of primary postsoperative adhesion formation under calcium channel blockage in the rabbit. *J Surg Res* 1990; 48: 42-5.
423. García M, Aramayona J, Bregante M, Fraile L, Solans C. Simultaneous determination of verapamil and norverapamil in biological samples by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection. *J Chromatogr* 1997; 693: 377-82.
424. El-Sayed J, Niazy E, Khidr S. High performance liquid chromatographic method for the determination of nifedipine in plasma and its use in pharmacokinetics studies. *J Clin Pharm Ther* 1993; 18: 325-30.
425. Kleinbloesem C, van Brummelen P, van De Linde, Voojd P, Breimer D. Nifedipine: kinetics and dynamics in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1984; 35: 742-9.
426. García M, Solans C, Aramayona J, Fraile L, Bregante M, Castillo J. A common method for the determination of several calcium channel blockers using an HPLC system with ultraviolet detection. *Talanta* 1998; 47: 1245-54.
427. Flórez J. Fármacos antipsicóticos neurolépticos. En: Flórez J. *Farmacología humana* (2ª edición). Barcelona. Masson, S.A.; 1992: 459-73.
428. Weiss B, Prozialeck W, Wallace T. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 2217-26.
429. Stoclet J, Lugnier C, Follenius A, Scheffel J, Gérard D. Calmodulin and calcium regulation: Effect of antagonists. En: Godfraind T, Vanhoutte P, Govoni S, Paoletti R, ed. *Calcium entry blockers and tissue protection*. New York. Raven Press 1985: 31-40.
430. Ernst M, Kelly M. Mibefradil, a pharmacologically distinct calcium antagonist. *Pharmacotherapy* 1998; 18: 463-85.
431. Glasser S. The relevance of T-type calcium antagonists: a profile of mibefradil. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 659-69.
432. Triggle D. Pharmacologic and therapeutic differences among calcium channel antagonists: Profile of Mibefradil, a new calcium antagonist. *Am J Cardiol* 1996; 78(suppl 9^a): 7-12.

433. Nilius B, Prenen J, Kamouchi M, Viana F, Voets T, Droogmans G. Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of Ca²⁺ and volume-activated Cl⁻ channels in macrovascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 547-55.
434. Liu J, Bijlenga P, Occhiodoro T, Fischer-Lougheed J, Bader C, Bernheim L. Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca²⁺ and K⁺ currents in human fusion-competent myoblasts. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 245-50.
435. Aczél S, Kurka B, Hering S. Mechanism of voltage- and use-dependent block of class A Ca²⁺ channels by mibefradil. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 447-54.
436. Schmitt R, Clozel J, Iberg N, Buhler F. Prevention of neointima formation by mibefradil after vascular injury in rats: comparison with ACE inhibition. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996; 10: 101-5.
437. Lijnen P, Fagard P, Petrov V. Mibefradil-induced inhibition of proliferation of human peripheral blood mononuclear cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33: 595-604.
438. Blaheta R, Hailer N, Brude N, Wittig B, Oppermann E, Leckel K, et al. Novel mode of action of the calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967): potent immunosuppression by inhibition of T-cell infiltration through allogeneic endothelium. *Immunology* 1998; 94: 213-20.
439. Hahn M, Tkachuk V, Bochkov V, Cheglakov I, Clozel J. Blockade of receptor-operated calcium channels by mibefradil (Ro 40-5967): effects on intracellular calcium and platelet aggregation. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; 9: 815-21.
440. Sly W, Grubb J. Isolation of fibroblasts from patients. *Meth Enzymol* 1979; 38: 444-50.
441. Morgan S, Darling D. *Animal cell culture*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited; 1993: 37-50.
442. Berridge M, Tan A, McCoy K, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4: 14-9.
443. Phillips H, Terryberry J. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp Cell Res* 1957; 13: 341-7.
444. Hoffman S, Gopalakrishna R, Gundimeda U, Murata T, Spee C, Ryan S, et al. Verapamil inhibits proliferation, migration and protein kinase C activity in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 1998; 67: 45-52.
445. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *ECVAM News and Views*. *ATLA* 1994; 22: 7-11.
446. De Roos A, Willems P, van Zoelen E, Theuvenet A. Synchronized Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ action potentials in NRK fibroblasts. *Am J Physiol* 1997; 273: C1900-7.
447. Yoshida A, Laing R, Joyce N, Neufeld A. Effects of EGF and indomethacin on rabbit corneal endothelial wound closure in excised corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1991-6.
448. Murphy T, Sakamoto T, Hinton D, Spee C, Gundimeda U, Soriano D, et al. Migration of retinal epithelium cells in vitro is regulated by protein kinase C. *Exp Eye Res* 1995; 60: 683-95.
449. Pinilla I, Izaguirre, Gonzalvo F, Jiménez P, Piazuolo E, Polo V, et al. Efecto inhibitorio del nicardipino sobre los mecanismos de proliferación fibroblásticos. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000; 75: 455-62.
450. Haddad A, Salazar J, Laicine E, Ramírez A, Triviño A, Ramírez J. A practical method for the radioisotope labeling of rabbit astrocytes with (3)H-thymidine. *J Neurosci Methods* 2001; 112: 51-6.

451. Givens K, Kitada S, Chen A, Rothschilder J, Lee D. Proliferation of human ocular fibroblasts. An assessment of in vitro colorimetric assays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 1856-62.
452. Wong V, Shapourifar-Tehrani S, Kitada S, Choo P, Lee D. Inhibition of rabbit ocular fibroblast proliferation by 5-fluorouracil and cytosine arabinoside. *Ocul Pharmacol* 1991; 7: 27-39.
453. MacNeil S, Dawson R, Crocker G, Tucker W, Bittiner B, Singleton J, et al. Antiproliferative effects of keratinocytes of a range of clinically used drugs with calmodulin antagonist activity. *Brit J Dermatol* 1993; 128: 143-50.
454. Lu K, Rasmussen C, May G, Means A. Cooperative regulation of cell proliferation by calcium and calmodulin in *Aspergillus nidulans*. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 365-74.
455. Wagner M, Benson M, Rennie I, Mac Neil S. Effects of pharmacological modulation of intracellular signalling systems on RPE cell attachment to extracellular matrix proteins. *Curr Eye Res* 1995; 14: 373-84.
456. Batra S, Popper L, Hartley-Asp B. Effect of calcium and calcium antagonists on ⁴⁵Ca influx and cellular growth of human prostatic tumor cells. *Prostate* 1991; 19: 299-311.
457. Van-Bockxmeer F, Martin C, Constable I. Models for assessing scar tissue inhibitors. *Retina* 1985; 5: 47-60.
458. Matsumura M, Yamakawa R, Shirakawa H, Ogino N. Effects of phenothiazines on cultured retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res* 1986; 18: 47-54.
459. Izaguirre L, Gonzalvo F, Pinilla I, Pablo L, Abecia E, Honrubia F. Acción de la trifluoperazina sobre la proliferación fibroblástica en cultivos celulares. Comparación de diferentes dosis. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2001; 76: 471-6.
460. Koy Y, Sachinidis A, Graack G, Appenheimer M, Wieczorek A, Dusing R, et al. Inhibition of angiotensin II and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation by calcium entry blockers. *Clin Invest* 1992; 70: 113-7.
461. Wada Y, Kato S, Okamoto K, Izumaru S, Aoyagi S, Morimatsu M. Diltiazem, a calcium antagonist, inhibits matrix metalloproteinase-1 (tissue collagenase) production and collagenolytic activity in human vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med* 2001; 8: 561-6.
462. Andrawis N, Abernethy D. Effect of calcium antagonists on RNA synthesis of NIH 3T3 cells. *Am J Med Sci* 1993; 306: 137-40.
463. Zeitler H, Ko Y, Glodny B, Totzke G, Appenheimer M, Sachinidis A, et al. Cell-cycle arrest in G0/G1 phase of growth factor-induced endothelial cell proliferation by various calcium channel blockers. *Cancer Detect Prev* 1997; 21: 332-9.
464. Malmgren R. ATP-secretion occurs as an initial response in collagen induced platelet activation. *Thromb Res* 1986; 43: 445-53.
465. Iakushkin V, Tertov V, Orekhov A. The antiatherosclerotic effect of verapamil in a cell culture of human aortic intima. *Kardiologija* 1993; 33: 51-5.
466. Sperti G, Colucci W. Calcium influx modulates DNA synthesis and proliferation in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1991; 206: 279-84.

467. El-Sanadiki M, Cross K, Murria J, Schuman R, Mikat E, McCann R, et al. Reduction of intimal hyperplasia and enhanced reactivity of experimental vein bypass grafts with verapamil treatment. *Annals Surg* 1990; 212: 87-96.
468. Witkowski J, Siebert J, Lukaszuk K, Trawicka L. Comparison of effect of a panel of membrane channel blockers on the proliferative, cytotoxic and cytoadherence abilities of human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacology* 1993; 26: 53-63.
469. Levine L, Merrick P, Lee R. Intralesional verapamil injection for the treatment of Peyronie's disease. *J Urol* 1994; 151: 1522-4.
470. Lee R, Ping J. Calcium antagonists retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. *J Surg Res* 1990; 49: 463-6.
471. Richter D, Hatvani I, Tóth A. Wachstum-shemmung intraokularer proliferativer Explante unter in-vitro-Bedingungen durch Verapamil. *Klin Monatsbl fur Augenheilk* 1993; 203: 206-11.
472. Hahn J, Lyon A, Weinberg D, Krupin T. Calcium channel blocker mediated inhibition of retinal pigment epithelial cell contraction of collagen gells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: S393.
473. Singh K, Byrd S. Inhibition of Tenon's fibroblast proliferation and collagen synthesis by clarithromycin, colchicine, verapamil and captopril. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: S267.
474. Kappas A, Barsoum G, Ortiz J, Keighley M. Prevention of peritoneal adhesions in rats with verapamil, hydrocortisone sodium succinate, and phosphatidylcholine. *Eur J Surg* 1992; 158: 33-5.
475. Gupta B, Moy J, Agarwala A, Edwar D. The effects of verapamil on glaucoma filtering blebs in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: S1392
476. Shin D, Kardasis C, Kim C, Juzych M, Hughes B, Keole N. Topical verapamil in glaucoma filtration surgery. *J Glaucoma* 2001; 10: 211-4.
477. Mishra S, Hermsmeyer K. Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. *Circ Res* 1994; 75: 144-8.
478. Schmitt R, Clozel J, Iberg N, Buhler F. Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1161-5.
479. Estacion M. Characterization of ion channels seen in subconfluent human dermal fibroblasts. *J Physiol* 1991; 436: 579-601.
480. Vacher E, Richer C, Fornes P, Clozel J, Giudicelli J. Mibefradil, a selective calcium T-channel blocker, in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 686-94.
481. Manolopoulos V, Liekens S, Koolwijk P, Voets T, Peters E, Droogmans G, et al. Inhibition of angiogenesis by blockers of volume-regulated anion channels. *Gen Pharmacol* 2000; 34: 107-16.
482. Bertolesi G, Shi C, Elbaum L, Jollimore C, Rozenberg G, et al. The Ca²⁺ channel antagonists mibefradil y pimoziide inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 210-9.
483. Nebe B, Holzhausen C, Rychly J, Urbaszek W. Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonis mibefradil. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16: 183-93.
484. Gonzalvo F, Izaguirre L, Pinilla I, Pablo L, Polo V, Larrosa J. Effect of mibefradil in human fibroblastic proliferation in vitro. *Ophthal Res* 2001; 33: 47.

485. Huang C, Hu S, Chen B. Growth inhibition of epidermal growth factor-stimulated human glioblastoma cells by nicardipine in vitro. *J Neurosurg Sci* 2001; 45: 151-5.
486. Fitscha P, Keiler A, Rauscha F, O'Grady J, Sinzinger H. The diminished extracellular matrix production induced by isradipine, a calcium channel blocker, is completely abolished by cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 1992; 45: 289-91.
487. Sugiura T, Imai E, Moriyama T, Horio M, Hori M. Calcium channel blockers inhibit proliferation and matrix production in rat mesangial cells: possible mechanism of suppression of AP-1 and CREB activities. *Nephron* 2000; 85: 71-80.
488. Lai Y, Fukuda N, Jin Z, Suzuki R, Ikeda Y, Takagi H, et al. Novel mechanisms of the antiproliferative effects of amlodipine in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2002; 25: 109-15.
489. Miyakawa T, Kojima M, Ui M. Differential routes of Ca²⁺ influx in Swiss 3T3 fibroblasts in response to receptor stimulation. *Biochem J* 1998; 329: 107-14.
490. Ramírez T, Larrosa J, Pablo L, Pinilla I, Abecia E, Polo V, et al. Modificaciones de la actividad celular en la cirugía experimental con antimetabólicos. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1997; 72: 477-82.
491. Pablo L, Ramírez T, Pinilla I, Ronchera J, Abecia E, Fernández F, et al. Evolución histológica tras la aplicación de mitomicina-c en la cirugía filtrante experimental. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1996; 70: 179-86.
492. Ramírez T, Pablo L, Abecia E, Álvarez R, Ronchera J, Gómez M, et al. Cambios histológicos en la cirugía filtrante en el conejo albino tras la aplicación de β terapia y mitomicina-C. *Stadium Ophthalmologicum* 1996; 15: 43-7.
493. Ramírez T, Pablo L, Cuevas R, Pinilla I, Ronchera J, González I, et al. Efectos de la mitomicina-c sobre la función y morfología del fibroblasto. Análisis ultraestructural. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1996; 70: 373-8.

