

INSTITUTO DE ESPAÑA  
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

**SOBRE LA BÚSQUEDA DE NUEVAS  
APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS  
PARA EL TRATAMIENTO  
DE LAS PATOLOGÍAS OCULARES**

DISCURSO DEL  
EXCMO. SR. D. JESÚS J. PINTOR JUST

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 6 DE NOVIEMBRE DE 2014  
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DE LA  
EXCMA. SRA. DÑA. MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL



**Madrid, 2014**





**INSTITUTO DE ESPAÑA  
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA**

**SOBRE LA BÚSQUEDA DE NUEVAS  
APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS  
PARA EL TRATAMIENTO DE  
LAS PATOLOGÍAS OCULARES**

**DISCURSO DEL**

**EXCMO. SR. D. JESÚS J. PINTOR JUST**  
LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 6 DE NOVIEMBRE DE 2014  
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

**Y CONTESTACIÓN DE LA**

**EXCMA. SRA. DÑA. MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL**



MADRID - 2014

ISBN: 978-84-942290-3-9 - Depósito legal: M. 30.975-2014

---

Impreso en Realigraf, S. A. - Pedro Tezano, 26. 28039 Madrid

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	7
INTRODUCCION .....	11
LA SUPERFICIE OCULAR .....	16
El síndrome de ojo seco .....	17
Identificación de los nucleótidos en las lágrimas y sus cambios en la patología del ojo seco .....	18
Efectos de los dinucleótidos sobre la secreción lagrimal .....	20
Efecto protector de los nucleótidos frente a las infecciones.....	21
La melatonina y la cicatrización corneal.....	22
EL GLAUCOMA .....	27
Los nucleótidos y la presión intraocular .....	28
El empleo de siRNAs en el tratamiento de la hipertensión ocular...	31
La melatonina y sus análogos en el tratamiento del glaucoma .....	36
Las proteínas de transducción nuevas herramientas útiles para el control de la presión intraocular .....	39
Hacia donde vamos.....	40
LAS CATARATAS Y SU TRATAMIENTO CON siRNA .....	41
LAS LENTES DE CONTACTO COMO DISPOSITIVOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS.....	47
CONCLUSIONES .....	53
BIBLIOGRAFIA.....	54
CONTESTACION DE LA EXCMA. SRA. DOÑA MARIA TERESA MIRAS PORTUGAL .....	69
SU TRAYECTORIA VITAL .....	71
COMENTARIOS A SU ACTIVIDAD DOCENTE E INVESTIGADORA.....	75

COMENTARIOS A SU DISCURSO DE INGRESO ..... 80

CONSIDERACION FINAL ..... 84

BIBLIOGRAFÍA..... 85

## AGRADECIMIENTOS

Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excelentísimos Sres. Vicepresidente y Secretario

Excelentísimas Sras. y Sres. Académicos

Queridos compañeros

Querida Familia

Señoras y Señores

Me gustaría que las primeras palabras que pronuncie en este acto tan solemne sean de agradecimiento para los que son ahora mis Compañeros de Academia, que con su generosidad me han aceptado para portar la medalla Número 36. Este hecho representa para mí un gran honor y sobre todo una gran responsabilidad. Esto hace que me comprometa ante ustedes a dedicar mis mayores esfuerzos al desarrollo científico y social de esta Honorable y Prestigiosa Real Academia.

Me gustaría recordar la memoria de mi antecesor el Excmo. Señor D. Gaspar González González, que tan dignamente portó la medalla nº 36. Nos encontramos ante un hombre que a lo largo de su vida profesional mostró una extraordinaria brillantez como veterinario, traspasando las fronteras nacionales para ser reconocido internacionalmente como un investigador, científico y sobre todo un ser humano de una categoría extraordinaria.

Permítanme que exprese mi gratitud de discípulo, a la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, con quien, tal vez por casualidades de la vida, o tal vez porque somos Gallegos, me inicié en el mundo de la Bioquímica en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, allá por el año 1988, es decir hace ya más de 26 años. Su conocimiento de la bioquímica y la farmacología, su apoyo incondicional a lo largo de mi andadura en la universidad, unido a su inestimable afecto, han sido valladares fundamentales en el desarrollo de mi carrera profesional. Pocas veces una persona ha tenido la suerte de tener a una mentora de la calidad humana y científica de Dña. María Teresa. Su consejo, tutela y en algunos casos incluso protección, han ser-

vido para iniciar, allanar y desarrollar mi camino académico. Sin Vd. probablemente, este acto no estaría teniendo lugar.

Quiero agradecer a mis padrinos académicos, el Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez, al Excmo. Sr. D. Guillermo Giménez Gallego y al Excmo. Sr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, por acceder a ser mis padrinos y, avalar y defender mi candidatura de ingreso en esta Real Academia.

A la Junta de Gobierno actual y a todas y todos los excelentísimos miembros de esta Real Academia y muy especialmente a su Excmo. Sr. Presidente D. Mariano Esteban, porque esta noble institución lejos de anclarse en su historia, y lejos de incorporar solamente a farmacéuticos, abre la puerta a aquellos representantes procedentes de disciplinas afines que, con su modesta contribución, aportan el granito de arena para hacer un poco mas grande a esta Corporación.

Quiero igualmente agradecer a mis compañeros y amigos aquí presentes, al Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo, a los Ilmos. Sres. D. Eduardo Costas, Antonio Rodríguez Artalejo, Daniel Sánchez Mata y Antonio González Bueno por animarme, darme sabios consejos y tener un grupo de amigos con los que compartir experiencias.

Permítanme a continuación agradecer a todo mi grupo de investigación el extraordinario trabajo que han realizado. Ellas y ellos, han sido los artífices del prestigio alcanzado por nuestro grupo de trabajo. Quiero pues, que quede aquí el reconocimiento público que se merecen.

No me quiero olvidar de la Facultad de Óptica y Óptica, de la Universidad Complutense de Madrid. En ella me inicié como investigador en la andadura solitaria de un científico que se debe emancipar de su maestra. Los comienzos fueron difíciles pero el esfuerzo personal, y como ya he comentado, estar rodeado de excelentes investigadoras e investigadores hicieron ese camino más llevadero y fructífero.

Quiero recordar aquí a mis amigos, desde aquellos que lo son y han sido desde mi infancia y que hoy han venido de lejos a este acto, hasta los más recientes, porque todos ellos hacen mi vida más completa, más feliz y más placentera.

Y por último quiero decir unas palabras sobre mi familia. En primer lugar sobre mi hijo Javier, pues él es mi alegría de cada día y el motor que hace que el mundo sea distinto. Gracias por existir. Sin ti la vida no sería igual. A mi hermano Luis y a mis padres aquí presentes, por no dejar ni un solo día de estar a mi lado pese a las distancias y por no dejar de apoyarme incondicionalmente, por no dejar de animarme y por haber sido siempre un soporte vital en los bue-

nos y en los malos momentos por los que he pasado durante mi vida. Agradecer igualmente a mis primos, a los de mi Galicia querida, especialmente a mi ahijada Uxia, a los Madrid y a todos aquellos que están en muchos lugares del mundo. Gracias por arroparme y por enseñarme, por permitir disfrutar de vuestra compañía y vuestro amor.

Dicho esto, el objetivo principal de mi discurso preceptivo de recepción como Académico de Número en la Real Academia Nacional de Farmacia, se fundamenta en exponerles nuevas aproximaciones farmacológicas para el tratamiento de las patologías oculares más prevalentes. Es imposible abordar en este espacio de tiempo con el detalle todo aquello de lo que me hubiese gustado hablar por lo que he decidido seleccionar, en mi modesta opinión, los aspectos más relevantes. Mi discurso lleva por título *"SOBRE LA BÚSQUEDA DE NUEVAS APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS PATOLOGÍAS OCULARES"*.

Mi exposición es el resultado del trabajo realizado por mi grupo de investigación durante los últimos años y refleja mi interés por buscar nuevas moléculas, nuevas estrategias y nuevos mecanismos para tratar enfermedades oculares que por su trascendencia suponen un serio problema para los pacientes y por extensión para la sociedad Española y la sociedad mundial.

Les hablaré de afecciones de la superficie ocular, como el ojo seco, o las heridas corneales. Hablaré de patologías que conducen a la ceguera como el glaucoma o las cataratas y concluiré con los avances más recientes que hemos realizado para la administración de fármacos con el empleo de lentes de contacto.



## INTRODUCCION

Si algo ha condicionado y condiciona la vida en la Tierra es sin duda la luz (y la oscuridad). Se considera que desde que la tierra es tierra, el sol ha salido unas  $10^{15}$  veces. Por tanto no resulta descabellado pensar que los seres vivos que mejor saquen partido a la luz contarán con ventajas para sobrevivir en el planeta. Aquel que ve imágenes en lugar de distinguir luces y sombras cuenta, sin duda, con mayores probabilidades para lograr el premio de la supervivencia.

La visión, o mejor dicho, los ojos son uno de los elementos que más han contribuido a la selección natural de la mayoría de las especies.

El ojo es una estructura en general tan compleja que solamente es capaz de funcionar correctamente si está completo, es decir si posee todas las estructuras necesarias para permitir que la luz pueda enfocarse en la parte fotosensible del mismo, la parte con la que vemos, es decir en la retina.

La complejidad del ojo en la mayoría de los organismos llevó, a principios del siglo XIX al clérigo anglicano William Paley a buscar en el símil del reloj una explicación para la formación del ojo humano. Él decía, en su obra "Teología Natural", que cuando uno observa la maquinaria compleja de un reloj comprende que es necesario pensar en que una mente creadora está detrás de su diseño. Siguiendo el mismo razonamiento, la complejidad del ojo humano no podía ser sino una indicación clara de la existencia de un diseñador que podría ser Dios. Esta afirmación es el germen del creacionismo moderno denominado diseño inteligente.

Frente al razonamiento de William Paley, Charles Darwin por otro lado defendió una postura en la que el ojo había evolucionado de estructuras más sencillas a formas más sofisticadas incrementando su complejidad gradualmente a lo largo de millones de años (Darwin, 1882). Sin embargo, la idea de Darwin solo es posible si cada etapa de esa evolución constituye una mejora del paso anterior. En la actualidad conocemos lo suficiente en el mundo animal para saber que ésto es así.

Algunos organismos primitivos tienen solamente una pequeña mancha sensible a la luz. Este es el caso del alga unicelular *Euglena*, que con su mancha ocular o estigma, puede detectar diferencias entre luz y oscuridad, esencial para su supervivencia (Barsanti et al., 1997). Sin embargo, si esas manchas detectoras de luz se agrupan y se disponen sobre una superficie que gradualmente se va invaginando llegará un momento donde no todas ellas puedan recibir la luz directamente y por consiguiente ese “ojo primitivo” pueda claramente detectar la dirección de la misma (Arendt, 2003). Si las células que forman esa estructura fabrican además una sustancia gelatinosa es muy probable que ésta pueda actuar como una lente y permita focalizar la luz de una manera más clara y brillante en el fondo de la estructura, siendo ya esta disposición bastante parecida a la de un ojo tal y como lo concebimos en la actualidad.

De hecho, las transformaciones de las que he hablado con anterioridad han sido halladas en la naturaleza en diversos organismos. La *Euglena* tiene estigmas como ya les he comentado. Los platelmintos poseen una estructura invaginada con numerosas manchas sensibles a la luz, que les permiten detectar la sombra de los depredadores que les acechan. La visión borrosa de un caracol es suficiente para ayudarlo a detectar donde se encuentra el alimento y el ojo del pulpo presenta un cristalino que le permite tener una visión casi tan buena como la nuestra (Arendt et al., 2009).

Sin embargo aunque estemos en el escalón más alto de la evolución no debemos pensar por ello que nuestro ojo es la estructura más sofisticada que existe en la naturaleza. Sirvan como curiosidad algunos crustáceos de la familia de los estomatópodos. Estos organismos denominados “gamba mantis” por su semejanza en algunos aspectos con las *Mantis religiosas*, poseen unos ojos absolutamente únicos, pues presentan además de ojos compuestos, doce tipos diferentes de fotorreceptores, en contraposición con los tres que tenemos nosotros, que les permiten detectar la luz tanto en el rango del visible como ver en el ultravioleta y en el infrarrojo (Hanne et al., 2014). Sus ojos, de manera independiente, pueden ver en tres dimensiones, a diferencia de nosotros que necesitamos tener ambos ojos para poder hacerlo. Por último, estas mantis del mar, son capaces de detectar la luz polarizada (Kleinlogel and White, 2008). En resumen, estamos frente al organismo que presenta el ojo más sofisticado que conocemos (figura 1). Y porque vive en las costas orientales de Asia y Australia, pues sino probablemente lo usaríamos con fines culinarios en mi tierra, Galicia...

Volviendo a este organismo, estos animales son expertos en la visión en color. En teoría, por lo tanto, deberían ser mucho mejores para distinguir los colores que los humanos, pero se ha descubierto que no lo son, por tener una forma de codificar la información del color que es completamente diferente a todos los demás animales conocidos.



Figura 1. Fotografía de una gamba mantis donde se pueden observar sus fascinantes ojos.

Los seres humanos tenemos una visión basada en tres conos o células sensibles a los colores primarios: rojo, verde y azul (el sistema RGB, por las siglas en inglés). Por este motivo, el cerebro determina los colores de los objetos comparando la excitación relativa que recibe cada una de estas tres entradas de color en el ojo.

Una manzana roja, por ejemplo, excita mucho el receptor rojo (R) y menos el verde (G) y el azul (B). El resultado es que los ojos mandan un mensaje que el cerebro codifica como 'objeto rojo'.

Aunque no todos tenemos la capacidad de ver los colores correctamente. Una enfermedad relativamente frecuente relacionada con la visión del color es el daltonismo. El daltonismo es conocido también con el nombre de ceguera al color ya que las personas que lo poseen desarrollan dificultades para distinguir ciertos colores. Este trastorno, que es un defecto genético, recibe su nombre del físico y matemático John Dalton, por ser el primero en describirlo en 1798 (Hunt et al., 1995). La manera en la que esta enfermedad puede afectar a un paciente es muy variable y oscila desde la falta de capacidad para diferenciar cualquier color, en este caso se denomina acromatopsia, a un ligero grado de dificultad para distinguir algunos matices, normalmente entre el rojo y el verde. A pesar de que la sociedad en general considera que el daltonismo

pasa inadvertido en la vida diaria, supone un problema para los afectados en algunos ámbitos laborales.

El daltonismo es un defecto genético hereditario que se transmite generalmente por un alelo recesivo ligado al cromosoma X. Si un varón tiene un cromosoma X con esta deficiencia será daltónico, sin embargo en el caso de las mujeres, que poseen dos cromosomas X, sólo serán daltónicas si sus dos cromosomas X tienen la deficiencia. Este es el motivo principal por el cual existe más varones daltónicos que mujeres (Neitz and Neitz, 2011).

Los daltónicos no distinguen bien los colores debido al fallo de los genes encargados de producir los pigmentos de los conos, que son los fotoreceptores encargados de captar las imágenes en condiciones de iluminación. Así, dependiendo del pigmento defectuoso, la persona confundirá unos colores u otros. Por ejemplo si el pigmento defectuoso es el del rojo, el individuo no distinguirá el rojo ni sus combinaciones.

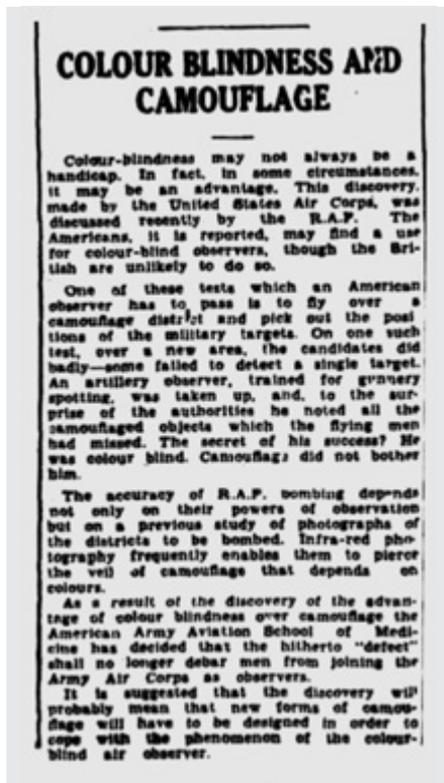


Figura 2. Noticia publicada el 26 de diciembre de 1940 en el Central Queensland Herald sobre las ventajas del daltonismo.

El daltonismo, por consiguiente, puede parecer un gran problema para el desarrollo de la vida normal, por lo menos en algunos individuos. Sin embargo ser daltónico puede también tener sus ventajas, aunque a priori pueda parecer lo contrario. ¿Qué ventaja puede tener un daltónico sobre alguien que no lo es?

Las propiedades de la visión de un daltónico y sus habilidades para describir determinados tipos de colores o mejor dicho determinados tipos de contrastes se conoce desde la década de los años 40 del siglo pasado. En particular, una noticia publicada el 26 de diciembre de 1940 en el Central Queensland Herald, puso de manifiesto las investigaciones realizadas entre el ejército aéreo de los Estados Unidos y la Royal Air Force (la RAF) británica sobre posible papel que podrían desempeñar los daltónicos en la descripción de mapas topográficos (figura 2).

En particular este artículo describe que los daltónicos tenían la habilidad de poder observar objetos en el te-

reno que aparentemente no eran percibidos por un ojo normal pues estaban camuflados. Lo que para una persona normal pasaba desapercibido se convertía en el caso de un daltónico en un objeto perfectamente discernible en el entorno. Esta habilidad fue rápidamente empleada por la RAF, no solamente en sus misiones aéreas sino también en el estudio y el análisis de las fotografías realizadas desde sus aviones. Dada esta habilidad por parte de los daltónicos, la RAF decidió eliminar este "defecto" de los boletines de alistamiento y crear una división de "color blind observers", es decir, observadores daltónicos. En gran manera los militares daltónicos de la RAF contribuyeron al éxito en numerosas incursiones por parte de los bombarderos de los aliados durante la segunda guerra mundial.

Independientemente de los aspectos curiosos de la visión del color, el ojo humano siempre es motivo de interés al ser uno de los sentidos que más empleamos para la vida diaria, y como tal es susceptible de sufrir alteraciones algunas de las cuales son frecuentes y poco importantes pero otras son de gravedad por las consecuencias que pueden acarrear.

Según la Organización Mundial de la Salud en el mundo hay aproximadamente 285 millones de personas con discapacidad visual de las cuales 39 millones son ciegas y 246 millones presentan baja visión (<http://www.who.int/publications/en/>). En términos mundiales los errores de refracción no corregidos constituyen la causa más importante de discapacidad visual pero en los países de ingresos medios y bajos las cataratas sigue siendo la principal causa de ceguera. La OMS considera que el 80% del total mundial de casos de discapacidad visual se pueden evitar o curar de alguna manera.

Estadísticamente hablando, la distribución mundial de las principales causas de discapacidad visual se corresponden en el 43% con el caso de errores de refracción, es decir miopía, hipermetropía o astigmatismo, no corregidos por medio de gafas, lentes de contacto o cirugía refractiva, seguidos por las cataratas no operadas, con un 33%, y continuando con el glaucoma con un 2%.

En términos globales, como ya hemos dicho anteriormente, el 80% de los casos de discapacidad visual son previsibles o curables. Esto es debido en parte a las mejoras alcanzadas por los gobiernos de los países implantando programas de prevención o incorporando la oftalmología a la atención primaria.

En nuestro país las patologías oculares más prevalentes son las cataratas, el glaucoma, la degeneración macular asociada la edad, el desprendimiento de retina y el ojo seco. No son evidentemente las únicas, puesto que existen otras de naturaleza infecciosa como la blefaritis o la uveítis, sin embargo, éstas que se mencionan son las más habituales en la consulta oftalmológica.

Los abordajes para solucionar estas patologías pueden ser muy diversos y normalmente se realizan a través de tratamientos farmacológicos y en algunos casos exclusivamente a través de cirugías oculares. No existen oficialmente tratamientos farmacológicos para las cataratas o el desprendimiento de retina pero sí para el glaucoma, el ojo seco y la degeneración macular asociada a la edad.

Centrándome en presente discurso de ingreso, éste se centrará en temas relevantes, candentes y problemáticos a la hora de abordar los tratamientos farmacológicos de algunas patologías oculares. Lo que este discurso pretende es fundamentalmente, proponer nuevas ideas, conceptos y estrategias que no aparecen en los libros de farmacología ocular más clásicos, siempre desde la perspectiva del trabajo realizado por mi y por mi grupo de investigación.

De este modo, se presentan a continuación nuevas perspectivas y abordajes en las patologías de la superficie ocular como el ojo seco, de las infecciones oculares, y el tratamiento de las abrasiones corneales superficiales. En un segundo lugar, de la problemática de un correcto control del humor acuoso y como ello puede desencadenar un glaucoma. En este caso el planteamiento se realizará presentando aproximaciones farmacológicas no convencionales para la bajada de la presión intraocular asociada al glaucoma. Se procederá a continuación a describir nuevas estrategias para el tratamiento farmacológico de las cataratas, para terminar con los estudios llevados a cabo con lentes de contacto para favorecer la administración de fármacos oculares.

## **La Superficie Ocular**

Se define como superficie ocular aquella parte de nuestro ojo que por ser la más superficial es a la vez la más visible y la que puede sufrir más las agresiones del ambiente en el que nos hallamos. La primera estructura biológica con la que nos encontramos en la superficie ocular es la lágrima. La película lagrimal forma una barrera natural acuosa que separa el ojo del medio ambiente circundante. La estructura de la lágrima puede ser dividida en tres partes, una capa lipídica, la más superficial, una acuosa y una capa mucosa, la más interna y en contacto con el epitelio de la cornea y conjuntiva. El mantenimiento de la superficie ocular se basa en un adecuado equilibrio entre estas tres capas.

Las principales tareas fisiológicas de la película lagrimal son mantener la superficie ocular humedecida y bien lubricada, aportar elementos nutricionales a la córnea, y eliminar materias extrañas y restos celulares generados en la superficie ocular. Todas estas funciones se consiguen mediante la producción de la lágrima, su flujo y el parpadeo. Por último podríamos añadir que también actúa como la primera barrera de defensa contra las infecciones de la superficie ocular.

Es indudable que si no se da una buena calidad de lágrima podemos tener serios problemas dentro de los cuales el principal es la patología multifactorial denominada ojo seco.

## El síndrome de ojo seco

El ojo seco es una dolencia que se inicia con síntomas desagradables de sequedad en los ojos y una sensación incomodidad que afecta a la actividad del que la padece, especialmente a medida que la enfermedad progresa. El número de pacientes con ojo seco está aumentando anualmente en consonancia con el envejecimiento de la sociedad y el aumento del empleo de video terminales como los ordenadores, televisores o tabletas. La prevalencia de ojo seco en 2009 en España era del 11,0% entre los adultos, siendo ligeramente más frecuente en las mujeres (11,9%) que en los hombres (9,0%), asociándose, en ambos casos claramente con el aumento de edad de la población (figura 3) (Viso et al., 2009).

Aunque la etiopatogenia exacta del ojo seco no se conozca, se cree que la disminución en el volumen de lágrima sobre la córnea y la conjuntiva bien por una carencia de la misma o por una acelerada evaporación, juegan un papel principal en esta patología. Las características clínicas del ojo seco incluyen malestar ocular, sensación de sequedad, sensación de la fatiga ocular, hiperemia, trastornos epiteliales queratoconjuntivales. Si estos síntomas y observaciones progresan, eventualmente pueden darse casos de anomalías en la

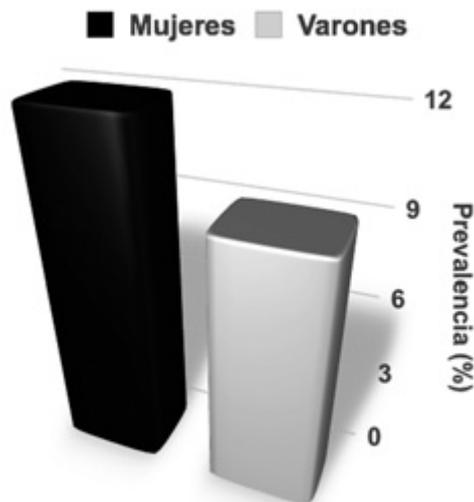


Figura 3. Distribución del ojo seco en la población española

visión. Por lo tanto, es muy importante abordar el tratamiento del ojo seco en una etapa temprana.

La humedad de la superficie ocular y otras mucosas, se mantiene por la secreción continua de líquido producido por glándulas exocrinas (Moss et al., 2008; Barker et al., 2005; Leiblum et al., 2009). En el ojo, el flujo lagrimal basal se ajusta a las variaciones en las condiciones ambientales y a la frecuencia de parpadeo (Dartt, 2009). El flujo lagrimal que ocurre en ausencia de irritación emocional o estímulos exógenos (lo que se denomina secreción lagrimal 'basal') aumenta notablemente tras sufrir irritaciones oculares (Acosta et al., 2004), ya que la superficie ocular es sensible a estímulos irritantes detectados por mecano nociceptores y nociceptores polimodales que son terminaciones del nervio trigémino sensibles a fuerzas mecánicas perjudiciales, al calor nocivo y a productos químicos irritantes, que evocan el dolor e irritación induciendo la lagrimación (Belmonte et al., 2004). Sin embargo, las estructuras neurales responsables de la detección de la sequedad de la superficie ocular en condiciones normales no han sido totalmente definidas.

El síndrome de ojo seco es una enfermedad caracterizada por la sequedad persistente de la conjuntiva que puede, en algunos casos, asociarse a déficits vitamínicos, como a la carencia de vitamina A, o a síndromes como el de Sjögren, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, quemaduras térmicas o químicas, o a fármacos como el atenolol, clorfeniramina, hidroclorotiazida, isotretinoína, ketorolaco, ketotifeno, levocabastina, levofloxacina, oxibutinina o tolterodina.

Independientemente de la etiología del ojo seco, resulta necesario buscar agentes que permitan restablecer las condiciones de hidratación que eviten el malestar en los pacientes de ojo seco. En este sentido, la mayoría de las aproximaciones son por medio de agentes humectantes, por lo que la demanda de fármacos que ayuden a resolver este serio problema es absolutamente necesario.

## **Identificación de los nucleótidos en las lágrimas y sus cambios en la patología del ojo seco**

La película lagrimal que cubre la superficie ocular presenta dos capas distintas: una capa lipídica externa producida por las glándulas de Meibomio y una capa interior que contiene una mezcla de mucinas, glicoproteínas, y diferentes componentes acuosos tales como electrolitos y glucosa, junto con otras proteínas (lisozima y lactoferrina, entre otras). La fase acuosa se produce principalmente en la glándula lagrimal principal y accesorias, sin embargo la conjuntiva también puede contribuir a la secreción del fluido que forma la película

lagrimal. El componente de mucina lo proporcionan las células caliciformes conjuntivales, así como las de la córnea y células epiteliales de la conjuntiva (Murube, 2012).

En las lágrimas humanas y en las de animales de experimentación como el conejo de Nueva Zelanda se ha detectado la presencia de mono y dinucleótidos por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (Pintor et al., 2002a, 2002b). En particular son relevantes los diadenosina polifosfatos, diadenosina tetrafosfato (Ap4A), y diadenosina pentafofosfato (Ap5A), ya que se han encontrado en concentraciones micromolares en las lágrimas de conejo. Las lágrimas humanas contienen también estos dinucleótidos junto con el diadenosina trifosfato (Ap3A) y el Ap4A, siendo este último el más abundante de todos ellos. Curiosamente, las concentraciones de diadenosina polifosfatos en conejos son un orden de magnitud mayores que las encontradas en los seres humanos. A pesar de esta diferencia, la relación Ap4A / Ap5A en conejos y seres humanos es un valor estable, siendo de 2.97 y 2.91, respectivamente. (Pintor et al., 2002a, 2002b).

Los nucleótidos en las lágrimas pueden ser liberados al medio externo por la ruptura celular o exocitosis neuronal, aunque también ha sido posible verificar la liberación de los nucleótidos como una consecuencia de la tensión de cizallamiento mecánico en el epitelio de la córnea (Srinivas et al., 2002). En los seres humanos, hay evidencia que apunta a un proceso de liberación mecánica de los nucleótidos, en particular Ap4A y Ap5A, como una consecuencia del efecto de los párpados sobre la superficie de la córnea. Individuos sanos invitados a parpadear a diferentes frecuencias, demostraron que sus lágrimas contenían más nucleótidos si parpadeaban con mayor frecuencia (Peral et al., 2006).

Un aumento en la frecuencia de parpadeo es un signo típico del síndrome de ojo seco y dicha respuesta se produce para compensar la inestabilidad lagrimal (Tsubota et al., 1996). Por lo tanto, no resulta extraño que las concentraciones de estas moléculas sean elevadas en los casos de ojo seco. Los pacientes con ojo seco sintomáticos, pero producción normal de lágrima, presentan en sus lágrimas niveles 5 veces superiores a los de los individuos normales en lo que se refiere a la concentración de Ap4A y 1,5 veces superiores en la de Ap5A. Este hecho se vuelve más llamativo en pacientes de ojo seco con un volumen de secreción lagrimal baja. En este caso los niveles de Ap4A y Ap5A aumentan 100 y 345 veces para Ap4A y Ap5A, respectivamente (Peral et al., 2006). Un matiz interesante ha sido encontrar diferencias entre las muestras de lágrimas provenientes de pacientes femeninos y masculinos. Las muestras de mujeres sintomáticas aparentemente tenían niveles más altos de dinucleótidos que las de los hombres. Esta divergencia da lugar a la posibilidad de que sea un

factor hormonal el que pueda ser responsable de dicha diferencia, aspecto éste que requerirá de más investigación.

En los pacientes con el Síndrome de Sjogren, la concentración Ap4A aumenta 42 veces y la de Ap5A, 595 cuando se comparan con individuos normales (Carracedo et al., 2010). La asociación entre el aumento de diadenosina polifosfatos en las lágrimas y la patología de ojo seco, ha permitido proponer al Ap4A biomarcador molecular para esta enfermedad (Pintor, 2007).

## **Efectos de los dinucleótidos sobre la secreción lagrimal**

El fisiología de la superficie ocular tanto en animales como en los humanos puede ser modificada por los nucleótidos y dinucleótidos presentes en la lágrima. Uno de los procesos fisiológicos regulados por nucleótidos extracelulares en la superficie ocular es la producción de lágrima. La instilación tópica de los mononucleótidos, UTP y ATP, aumenta la secreción lagrimal en conejos alrededor 4 veces según lo determinado por las pruebas del test de Schirmer (Murakami et al., 2000), mientras que los compuestos UDP y ADP no modifican la secreción lagrimal (Pintor et al., 2002b). Sobre la base de esta respuesta a los nucleótidos, el efecto parece estar mediado por los receptores P2Y2. Esta conclusión está reforzada por la estimulación de la secreción de cloruro y líquido neto en la dirección serosa a mucosa inducida por el receptor P2Y2 tras su activación en el epitelio conjuntival (Li et al., 2001b).

Los dinucleótidos también pueden estimular la secreción de lagrima. El diadenosin tetrafosfato, Ap4A, es capaz de aumentar notablemente la producción de lágrima, entorno a un 60% sobre el valor de secreción basal de la misma (medida en conejos de la raza Nueva Zelanda). El Ap5A y el Ap6A también son capaces de aumentar significativamente la producción de lágrima, entorno a un 20% (Pintor et al., 2002b). Asimismo, la aplicación del compuesto diuridina tetrafosfato (Up4U, también denominado con los nombres INS365, diquafosol, Prolacria o Diquas), un agonista selectivo P2Y2, induce un aumento transitorio de 1,5 veces la producción lagrimal en un modelo de rata (Fujihara et al., 2001).

La aplicación de los nucleótidos no sólo altera el volumen de lágrima (agua y electrolitos) sino que también afecta su composición modificando su contenido en proteínas. Además, la expresión y liberación de proteínas específicas tales como las mucinas también pueden ser modificadas por los nucleótidos. El UTP y el ATP estimulan la liberación de mucinas de la conjuntiva de conejos y en humanos a través de la activación de receptores P2Y2 (Jumblatt y Jumblatt, 1998). Del mismo modo, los mononucleótidos ATP UTP y el dinucleótido Up4U aumentan la secreción de mucinas al estimular las células caliciformes conjuntivales (Fujihara et al., 2001.; Murakami et al., 2003).

En vista del efecto simultáneo de los nucleótidos a través de los receptores P2Y2 sobre la secreción de fluido / mucina, se han probado agonistas del receptor P2Y2 en diferentes modelos animales de ojo seco para devolver la humedad y la rehidratación a la superficie ocular. De hecho, la diuridina tetrafosfato Up4U (INS365, Diquafosol, Prolacria o Diquas) de la que se habla anteriormente, se ha estado empleando como nuevo tratamiento para el ojo seco (Nichols et al., 2004). De hecho, desde 2012 la comercializa en Japón la empresa Santen Pharmaceuticals después de la finalización de los correspondientes ensayos clínicos.

Curiosamente, como se mencionó anteriormente, los pacientes con ojo seco presentaron mayores concentraciones de Ap4A y Ap5A que los sujetos normales (Peral et al, 2006;. Carracedo et al., 2010). Este aumento de los niveles pueden representar un proceso compensatorio por parte de los epitelios de la superficie ocular para preservar un fenotipo de superficie humectada mediante el aumento de la lágrima y las concentraciones adecuadas de mucinas. Sin embargo, claramente este incremento es incapaz de favorecer la secreción de más lágrima. Solamente el tratamiento con el compuesto Diquas, es capaz de inducir más secreción lagrimal. Tal vez esto sea debido a que se aplica en concentraciones entorno a 3 mM.

### Efecto protector de los nucleótidos frente a las infecciones

Otro efecto muy notable que se ha observado con los nucleótidos y dinucleótidos es que no sólo pueden modificar los niveles de mucinas sino que también pueden modificar los niveles de otras proteínas relevantes de la lágrima. En particular, se ha podido detectar cambios en los niveles de la lisozima, la proteína más abundante en las lágrimas tras la aplicación de estos compuestos (Peral et al., 2008). El UTP, Ap4A, y Up4U aumentan las concentraciones de lisozima en un 67, 93 y 119%, respectivamente, en comparación con los

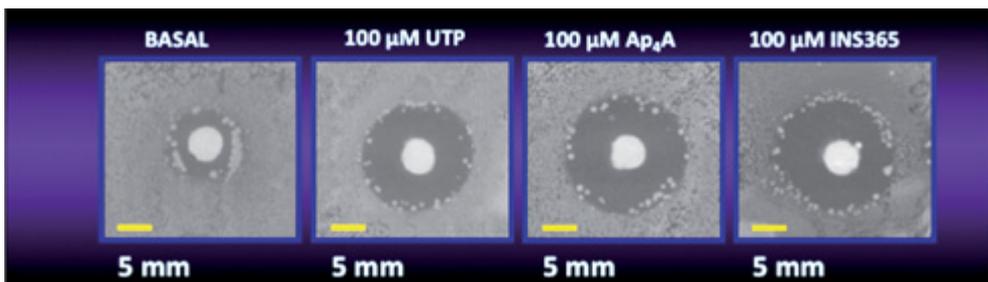


Figura 4. Efecto de los nucleótidos y dinucleótidos sobre la producción de lisozima medido por el método de difusión en agar.

niveles basales de esta proteína (figura 4). Éste enzima es especialmente relevante ya que se trata de uno de los primeros mecanismos de defensa contra las infecciones bacterianas. Este hecho quiere decir que la aplicación de los nucleótidos y dinucleótidos favorecerá la secreción de un agente que de manera natural va a prevenir las posibles infecciones por parte de microorganismos de tipo oportunista.

## **La melatonina y la cicatrización corneal**

La córnea es uno de los componentes más importantes de la vía óptica. Es un tejido de múltiples capas que se caracteriza por su transparencia, la avascularidad, la capacidad para refractar la luz y para filtrar radiación ultravioleta entrante. Dentro de las cinco capas de las que se compone, a saber: el epitelio corneal, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio, es la capa más exterior, el epitelio, la que se daña fácilmente debido a diversos factores. Estos incluyen la entrada de un cuerpo extraño, cualquier proceso traumático, un defecto en las lentes de contacto o el uso de cirugía refractiva para corregir alteraciones de refracción. Cuando esto sucede, comienza un proceso de cicatrización de la herida corneal regenerando el epitelio con el fin de mantener la correcta refracción de la luz. La cicatrización de las heridas corneales sucede en tres fases consecutivas que forman parte de un proceso continuo (Crosson et al., 1986). Los estudios han demostrado que estas tres etapas son (figura 5):

- 1º Fase de retardo o latencia (desde 0 horas a 10 horas después de la herida), en la que las células de los bordes de la herida se desprenden y las células próximas a la herida destruyen las uniones existentes entre ellas y con la membrana basal en la que se asientan.
- 2º Fase de migración celular (desde las 24 a las 36 horas después de la herida), en la que las células migran para tapar el área de la lesión y evitar infecciones oportunistas.
- 3º Fase de división o proliferación celular (que dura desde el fin de la fase de migración hasta semanas), con la que se restaura el espesor del epitelio corneal.

La renovación del epitelio corneal se ha demostrado que presenta una regulación circadiana sobre todo en la fase de migración y en la de mitosis, mostrándose en el caso de esta última una tasa de división celular de las células del epitelio corneal alta durante la noche y baja durante el día (Sasaki et al., 1995).

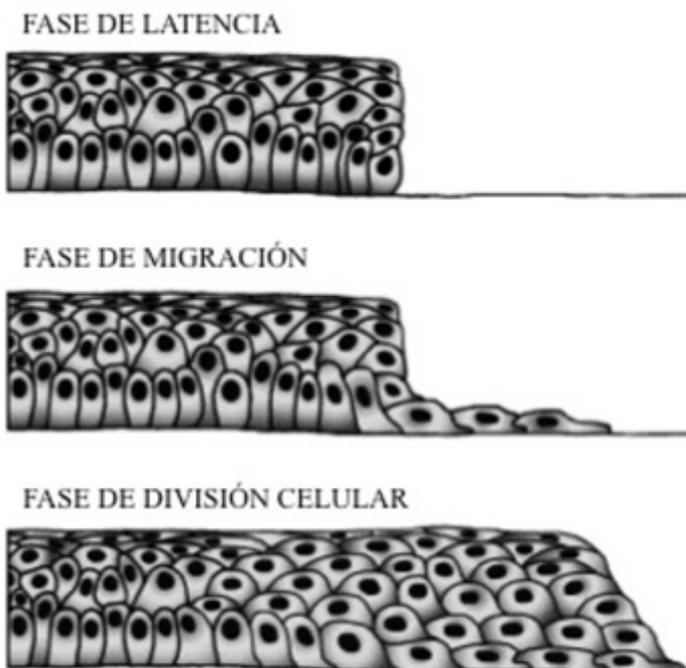


Figura 5. Etapas en el proceso de cicatrización corneal.

La activación de los procesos circadianos durante la noche están muy íntimamente ligados con la secreción del hormona melatonina (Lehrner, 1959). Si los procesos de reparación corneal suceden con mayor eficacia durante la noche uno puede pensar que la aplicación tópica de melatonina durante el día podría acelerar dichos procesos (Wahl et al., 2011).

Las acciones de la melatonina en los tejidos es llevada cabo a través de diversos receptores de membrana. Existen tres tipos de receptores de melatonina mamíferos. Estos se denominan MT1, MT2 y MT3. Los dos primeros ha sido clonados el tercero todavía no lo ha sido (Alarma-Estrany and Pintor, 2007) (figura 6). Estos receptores son de la familia de los receptores con siete dominios tras membrana acoplados a proteínas G. No obstante, no es extraño encontrarse todavía con la nomenclatura de los receptores para melatonina que se empleaba en organismos que no son mamíferos en artículos donde el modelo que se desarrollan es un mamifero. En este caso se denominan ML1, aquellos con mayor afinidad por la melatonina, en el rango picomolar, y ML2, los de baja afinidad por la melatonina, en el rango del nanomolar (Dubocovich, 1995). El ML1 incluye varias isoformas como las Mel1a, Mel1b and Mel1c. La forma Mel1a sería el ortólogo del receptor MT1, mientras que el Mel1b lo sería del MT2. El receptor MT3 se correspondería con el ML2 (Von Gall et al., 2002).

## Receptores de melatonina

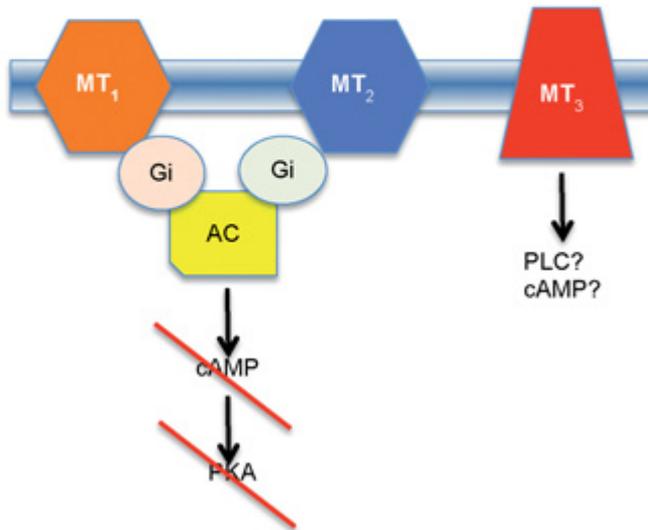


Figura 6. Esquema simplificado de los receptores de melatonina en mamíferos con sus cascadas de señalización intracelular.

Volviendo a la nomenclatura actual de los receptores para melatonina, tanto el receptor MT1 como el MT2 están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa. Por otro lado, no está claro cuál es el mecanismo de segundos mensajeros empleado por el receptor MT3 (Alarma-Estrany and Pintor, 2007).

La presencia de receptores de la melatonina en la córnea se ha investigado en peces, ranas, aves y muy recientemente en conejos. Varios estudios han descrito la presencia de receptores MT1 (Mel1a) y MT2 (Mel1b) en la córnea de diversas especies.

En el ojo de *Xenopus* todos los tipos celulares de la córnea, epitelio, queratocitos estromales y células endoteliales, expresan el receptor MT1 (Mel1a) o Mel1c (Wiechmann y Rada, 2003). Además de los receptores de melatonina MT1 (Mel1a), los receptores MT2 (Mel1b) presentan una banda inmunorreactiva de aproximadamente 65 kD tal y como demuestran los estudios de inmunotransferencia (western-blot). Estudios complementarios también realizados en modelos animales no mamíferos han demostrado que los subtipos de receptores MT1 (Mel1a) y Mel1c se expresan en la córnea del pollo, mientras que no así el MT2 (Mel1b). La presencia de receptores MT1 (Mel1a) en el endotelio corneal

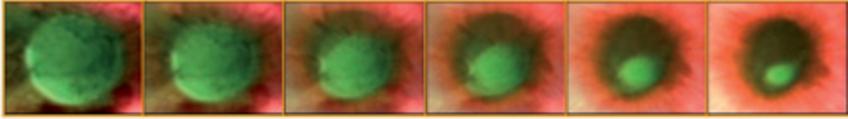
de pollo apoya la hipótesis de que la melatonina puede modular los ritmos diarios que tienen que ver con la hidratación de la córnea o su espesor (Rada y Wiechmann, 2006). Esto es importante porque la hidratación corneal, y en particular un exceso de hidratación, está relacionado con los edemas, que indefectiblemente producen visión borrosa. Por lo tanto, la melatonina presente en el humor acuoso y sus cambios pueden modular el estado de hidratación de la córnea, reduciendo el contenido de agua en la misma (Wahl et al., 2004).

Tomados en conjunto los resultados anteriores, hasta hace poco solo había pruebas mínimas de la existencia de receptores de melatonina del tipo MT2. Cuando se estudia la presencia de receptores de melatonina en córneas de mamíferos, se ha podido demostrar la existencia de receptores MT1 en las células endoteliales corneales humanas, en los queratocitos y en las células más basales de la córnea (Meyer et al., 2002).

Como se ha comentado, el epitelio de la córnea es la parte más superficial del ojo y por lo tanto sufre de accidentes tales como los causados por el introducción de un cuerpo extraño, el uso de lentes de contacto mal adaptadas e incluso de la cirugía refractiva tan de moda en la actualidad. Incluso sin la necesidad de pensar en procesos traumáticos como los anteriores, se ha podido demostrar que la renovación del epitelio corneal exhibe una regulación circadiana (Doughty, 1990). Esta diferencia día-noche sugiere que la melatonina podría estar involucrada en el ritmo circadiano de la migración y mitosis de las células de la córnea. Uno de los candidatos involucrados en el proceso de cicatrización de las heridas corneales es un receptor MT1 (Buffa et al., 1993; Wiechmann y Rada, 2003). Los estudios de cicatrización de las heridas corneales realizadas en conejos, también confirman la participación de la melatonina y sus receptores aunque no confirma la participación del receptor del tipo MT1. Parece claro que a concentraciones micromolares de melatonina se acelera significativamente la tasa de curación, permitiendo que las heridas cicatricen más rápidamente que en ausencia de esta neurohormona (Pintor et al., 2005). Este efecto se antagoniza por luzindol, lo que sugiere la presencia de receptores MT1 / MT2 de melatonina. En cultivos primarios de células del epitelio corneal de conejo se ha podido verificar este punto, ya que la melatonina y luzindol confirmaron los resultados observados "in vivo" (Crooke et al., 2014) (figura 6). Por otro lado estos estudios han permitido igualmente demostrar que el efecto de la melatonina es aumentar la velocidad de migración de las células en lugar de aumentar su tasa de mitosis.

Por otra parte, la tinción inmunocitoquímica de estas células demuestran la presencia de receptores de melatonina MT2 (Pintor et al., 2005; Crooke et al., 2014). Por lo tanto, ambos receptores MT1 y MT2 están presentes en el epitelio de la córnea, pero todavía no está claro si ambos contribuyen a acelerar la velocidad de migración de células epiteliales o si se combinan de forma se-

## Control



## Melatonina

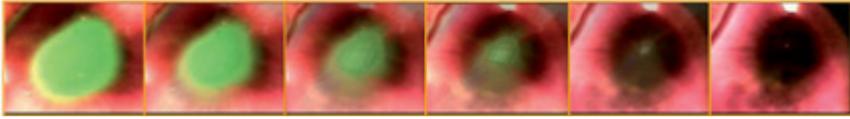


Figura 7. Efecto de la melatonina sobre la cicatrización corneal, donde se puede observar como la herida circular central se reduce más rápidamente cuando se aplica la neurohormona.

cuencial: uno para facilitar la migración celular y otro para activar la mitosis, completando así el proceso de cicatrización corneal.

Otro detalle interesante ha sido conocer el papel que puede tener la melatonina sobre la secreción lagrimal. La melatonina sola, si se aplica tópicamente en los conejos de Nueva Zelanda, inhibe parcialmente la producción de lágrima. Por otro lado la aplicación del dinucleótido Ap4A, aumenta la producción de lágrima como se ha comentado anteriormente. Sorprendentemente, cuando la melatonina y el Ap4A se aplican simultáneamente la cantidad de lágrima mejora un 34%, siendo este fenómeno controlado a través de un mecanismo que es sensible al antagonista de los receptores de melatonina luzindol (Hoyle et al., 2006).

# EL GLAUCOMA

El glaucoma es una neuropatía del nervio óptico que produce la ceguera. Este estado patológico se produce inicialmente como una consecuencia de una reducción en el flujo sanguíneo de la retina que poco a poco la daña partiendo desde la periferia hacia el centro de la retina (Nucci et al., 2007) (figura 8).

Uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo del glaucoma es la presión intraocular elevada. Si la presión es muy alta o se mantiene elevada durante un largo período de tiempo, aparte de los daños que se producen en la arteria ciliar, impidiendo el riego sanguíneo en la retina, se produce un daño mecánico del nervio óptico que va a afectar a la transmisión de la información a las zonas de la corteza visual (Brusini y Johnson, 2007).

La mayoría de las estrategias para el tratamiento del glaucoma se basan en la reducción de la presión intraocular. Desde el uso de pilocarpina en el siglo

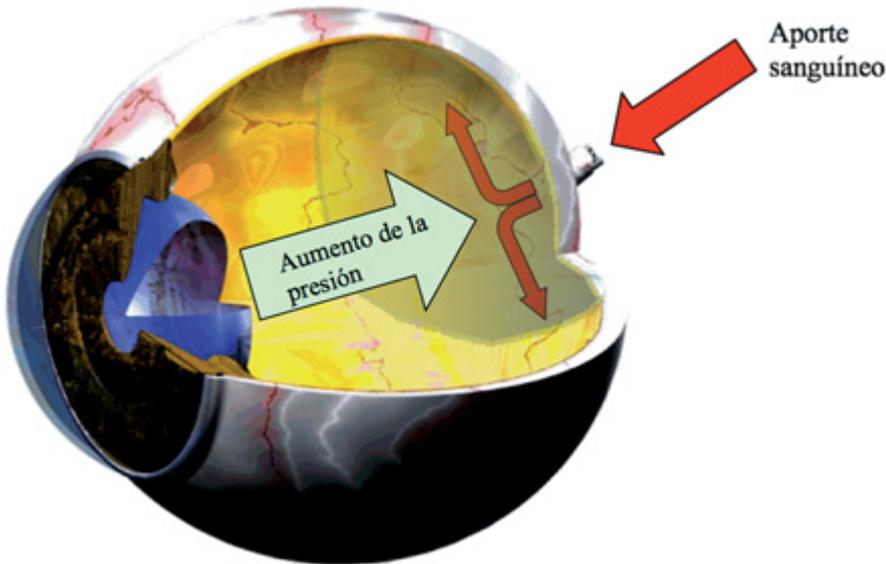


Figura 8. Diagrama explicando el proceso glaucomatoso como consecuencia de la elevación de la presión intraocular.

18 para el tratamiento de esta patología hasta hoy, la mayoría de los enfoques farmacológicos se han centrado en cuatro principales grupos de fármacos:

1. El uso de parasimpatomiméticos.
2. El uso de antagonistas de receptores beta adrenérgicos y agonistas de los receptores alfa adrenérgicos.
3. El empleo de inhibidores de las anhidrasas carbónicas.
4. El uso de análogos de las prostaglandinas.

Un análisis detallado de estas cuatro estrategias principales muestran la importancia del sistema nervioso autónomo en el control de la dinámica del humor acuoso, desde la activación de la vía colinérgica como el antagonismo de los receptores beta adrenérgicos. Ambas estrategias ayudan claramente a restaurar la producción normal del humor acuoso permitiendo que la presión vuelva a valores normales (Coca-Prados & Escribanos, 2007).

En este sentido, las principales tendencias en el tratamiento del glaucoma han sido la búsqueda de agentes más eficaces para modular la transmisión simpática y parasimpática que controlan la formación de humor acuoso y su drenaje. De hecho, las empresas farmacéuticas han hecho esfuerzos para mejorar la síntesis de compuestos adrenérgicos y en menor medida a agentes colinérgicos con el objeto de reducir la PIO, siempre de una manera más selectiva y con menos efectos secundarios.

No obstante, es interesante romper con la idea de mejorar compuestos ya existentes para tratar de buscar otros nuevos. Esta perspectiva redundará, por una parte, en que puedan ser usados por pacientes para los que las terapias actuales no funcionan. Al emplear dianas, receptores o enzimas diferentes a los empleados en la actualidad las probabilidades de éxito podrían aumentar ya que el abanico de fármacos disponibles aumentaría. Por otro lado, con nuevas dianas terapéuticas también sería posible disminuir potencialmente los efectos secundarios que existen en los fármacos actuales para el tratamiento del glaucoma. Siguiendo estas dos ideas, en las siguientes páginas se presentan nuevos candidatos para el tratamiento de la hipertensión ocular asociada al glaucoma.

## **Los nucleótidos y la presión intraocular**

Los nucleótidos y dinucleótidos son moléculas co-almacenadas con transmisores tales como la acetilcolina y noradrenalina en las vesículas sinápticas, tanto en el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central (Zimmermann, 1994). Los nucleótidos más representativos en el sistema ner-

vioso son la adenosina 5' trifosfato (ATP) y los dinucleótidos diadenosina tetrafosfato (Ap4A) y diadenosina pentafosfato (Ap5A). Cualquiera de estos nucleótidos son liberados desde las terminales nerviosas después de la estimulación producida por el potencial de acción junto con los transmisores clásicos. Cuando actúan sobre sus receptores pueden producir, entre otros efectos, la entrada del ion calcio con la consiguiente modificación del estado electrofisiológico de estas células, a veces modificando el umbral para la liberación de neurotransmisores y, a veces, induciendo la liberación de los neurotransmisores (Giraldez et al, 2001;. Pereira et al., 2000; Pintor et al., 1992).

En general, la acción de nucleótidos está mediada por los receptores P2, divididos en P2Y (receptores metabotrópicos de nucleótidos) y P2X (receptores ionotrópicos de nucleótidos). Los receptores metabotrópicos pueden ser divididos en P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14 de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y perfil farmacológico (Abbracchio et al., 2006). Los ionotrópicos, receptores P2X, son proteínas multimericas formadas por tres subunidades (subunidades P2X1-P2X7), aunque muy a menudo se presentan en conformaciones heteroméricas (Gever et al., 2006).

En el humor acuoso, el fluido transparente que ocupa el cámara anterior, la presencia de nucleótidos se ha sido demostrada por varios autores (Mitchell et al., 1998; Pintor et al, 2003b). Además, sus niveles pueden cambiar como consecuencia de algunos estados patológicos, tales como glaucoma. En este sentido, los niveles de ATP, por ejemplo, en el humor acuoso de pacientes con ataque agudo de glaucoma eran nueve veces mayores que los valores en el humor acuoso de individuos normales (Zhang et al., 2007). Un comportamiento semejante tiene el dinucleótido Ap4A en pacientes con glaucoma. En los pacientes enfermos la concentración de este dinucleótido fue 15 veces superior a a los valores de individuos sanos (Castany et al., 2011).

Aunque varios laboratorios han demostrado la presencia de nucleótidos en el humor acuoso, se sabe poco acerca de su origen. Aparte del hecho de ser liberado después de daño celular, su presencia puede provenir de la liberación de neurotransmisores en el cuerpo ciliar y del las terminaciones nerviosas del iris. Los trabajos realizados por Mitchell y colaboradores a finales de los años 90, describieron la presencia de ATP en el humor acuoso, siendo este liberado del epitelio ciliar y presentando valores de entre 4 y 8  $\mu\text{M}$  (Mitchell et al., 1998). Estos valores pueden cambiar ligeramente cuando se analiza todo el humor acuoso.

En la misma línea a lo descrito para el ATP, los mononucleótidos de adenina AMP, ADP y ATP se encuentran en todo el humor acuoso y presentan valores de concentración de 10,4  $\mu\text{M}$ , 1,9  $\mu\text{M}$ , y 1,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Los diadenosina polifosfatos están también presentes en este fluido presentando

concentraciones de  $0,34 \mu\text{M}$   $0,08 \mu\text{M}$  para el Ap4A y el Ap5A, respectivamente (Pintor et al., 2003b).

Los nucleótidos y dinucleótidos pueden además modificar la presión intraocular cuando se administran de manera tópica. Es interesante tener en cuenta que los nucleótidos pueden inducir efectos hipertensivos o hipotensos sobre la PIO en función de su estructura química. Los nucleótidos hipertensores comprenden sustancias tales como 2-MeSATP, ATP $\alpha\delta$  y el compuesto natural ATP. Todos ellos que producen un claro aumento en la PIO, que es máximo 2-3 h después de la instilación. Este perfil se corresponde con la activación de un receptor P2Y, aunque la degradación de estos nucleótidos por medio de las ectonucleotidasas y la concomitante formación de la correspondiente adenosina no se debe dejar de lado como posible explicación a la hipertensión inducida por estas moléculas (Pintor y Peral, 2001). La presencia de receptores P2Y2 en las células epiteliales del cuerpo ciliar ha sido descrita por lo que resultaría posible pensar que este tipo de receptor pueda ser el responsable de la acción de 2-MeSATP, ATP $\alpha\delta$ , así como otros agonistas P2Y2 (Farahbakhsh y Cilluffo, 2002) (figura 9).

Recientemente se ha podido comprobar que efectivamente el receptor P2Y2 tiene un papel hipertensor. Por ello, el antagonismo con bloqueantes de este receptor o el uso de un siRNA selectivo frente al mRNA de este receptor ha demostrado que cuando se evita su acción la PIO se reduce (Martin-Gil et al., 2012).

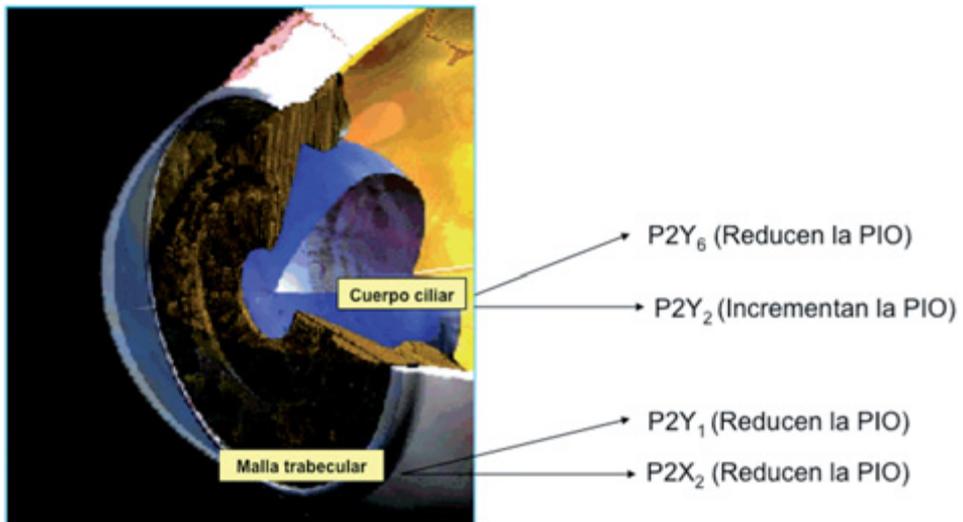


Figura 9. Distribución de los receptores purinérgicos P2 en el polo anterior del ojo y su papel en el control de la presión intraocular (PIO).

Curiosamente, otros análogos de ATP tales como  $\beta$ ,  $\gamma$ -meATP y  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP producen una clara y marcada reducción de la PIO en conejos con un comportamiento temporal similar al obtenido para los compuestos hipertensores (aproximadamente 3 h). El estudio concentración-respuesta permitió obtener valores de  $IC_{50}$  de 1,52 mg / ml y 0,55 mg / ml y una reducción máxima de la PIO de 36% y 45% para los compuestos  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP y  $\beta$ ,  $\gamma$ -meATP, respectivamente. Parece que el receptor activado por estos dos análogos es un receptor P2X2 que se encuentra en las terminales colinérgicas que se hallan en la malla trabecular (figura 9). La activación de este receptor P2X2 generaría un aumento de la liberación de acetilcolina, lo que facilita la relajación de la malla trabecular y por ende la evacuación del humor acuoso (Peral et al., 2009).

Los diadenosina polifosfatos muestran un comportamiento similar al observado para los mononucleótidos. De todos los dinucleótidos probados, el Ap4A es capaz de producir una clara reducción de la PIO, mientras que con el Ap2A, Ap3A o Ap5A lo que se obtiene es un efecto hipertensor. El Ap4A es un agonista potente que produce una disminución en la presión intraocular (29,6% de disminución), a concentraciones 3 órdenes de magnitud menores que las que producen el Ap2A, Ap3A o Ap5A cuando la aumentan (Pintor et al., 2003b). En cuanto al receptor que produce la disminución de la presión intraocular, sobre el que actúa el Ap4A, se trata del receptor P2Y1 que se encuentra ubicado en la zona de drenaje del humor acuoso, es decir en la malla trabecular (Soto et al., 2005) (figura 9). Es posible que Ap4A también active el receptor P2Y2 que eleva la presión, pero en el modelo del animal entero el efecto que predomina es el de disminución (Pintor et al., 2003a).

En resumen, aunque muchos nucleótidos pueden producir cambios en la PIO, teniendo en cuenta que la hipertensión ocular requiere de una reducción clara de la PIO, los compuestos sintéticos  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP y  $\beta$ ,  $\gamma$ -meATP y el Ap4A son los más adecuados para convertirse en fármacos para el tratamiento de la hipertensión ocular y el glaucoma.

## **El empleo de siRNAs en el tratamiento de la hipertensión ocular**

En las últimas décadas, el ARN de interferencia (ARNi), se ha convertido en una herramienta poderosa para la comprensión de la función de los genes, ya que permite "silenciar" la expresión de los mismos para comprender su papel biológico. El silenciamiento es un proceso génico post-transcripcional específico, inicialmente estudiado en *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Sin embargo, pronto resultó obvio que el ARNi no se limitaba a los nematodos y el silenciamiento puede ser inducido en diferentes organismos eucariotas tales como *Drosophila*, (Kennerdell y Carthew, 1998), *Trypanosoma* (ONG et al., 1998), el

pez cebra (Wargelius et al., 1999), la rana (Oelgeschlager et al., 2007.), *Hydra* (Lohmann et al., 1999) y en vertebrados (Wianny y Zernicka-Goetz, 2000). Estos mismos comportamientos de silenciamiento se habían observado en plantas y hongos, donde la introducción de transgenes exógenos son capaces de silenciar la expresión de los loci endógenos (Van der Krol et al., 1990).

RNAi está mediado por pequeños ARN de interferencia (siRNA) que se generan a partir de una hebra larga de RNA doble (dsRNA) de origen exógeno o endógeno (Elbashir et al., 2001). Estos dsRNA se escinden por la acción una ribonucleasa II (RNNase III) denominada DICER. Existen proteínas homólogas a Dicer que se han encontrado en *Schizosaccharomyces pombe*, *C. elegans*, *Drosophila*, plantas y mamíferos, lo que sugiere que este tipo de regulación es evolutivamente hablando antigua y conservada. El siRNA generado por DICER es un fragmento corto (21-23 nucleótidos) de ARN dúplex con 2 nucleótidos en cada extremo 3' terminal. Cada cadena contiene un fosfato en posición 5' y un hidroxilo en la posición 3'. A continuación este siRNA se incorpora a un complejo llamado nucleasa RISC (RNAinduced silencing complex). RISC excinde el siRNA y coloca la una de las dos hebras, la complementaria, en contacto con el RNAm que va a ser destruido, al que se une por complementariedad de bases. (Nykänen et al., 2001). La estructura generada es interpretada por la célula como errónea y es destruida por lo que la desaparecer el ARNm, la proteína que codificaba no se va a sintetizar (figura 10).

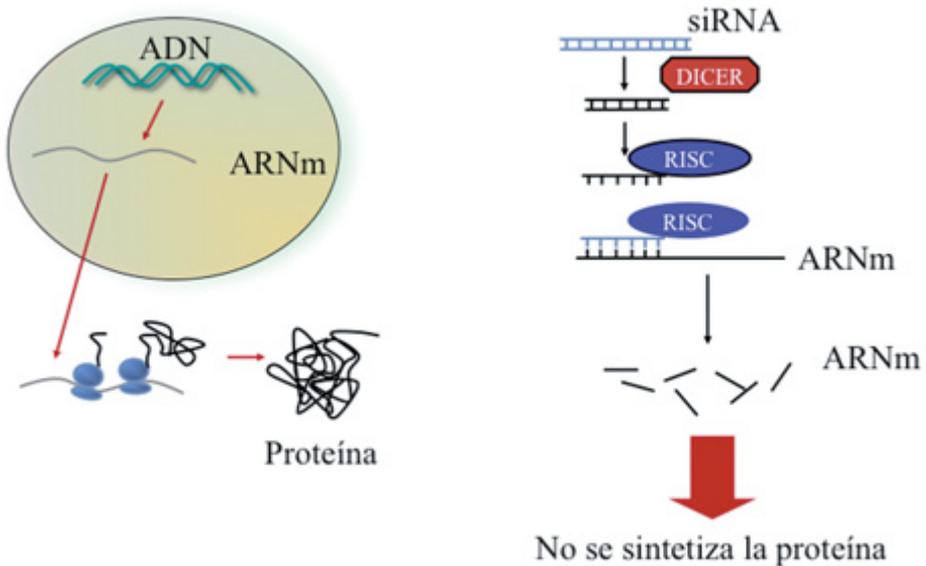


Figura 10. Esquema simplificado del proceso de síntesis de proteínas (a la izquierda) y el mecanismo de funcionamiento de los siRNA (a la derecha).

El comportamiento de RNAi puede ser muy variable. Puede tener su efecto rápidamente haciendo desaparecer las proteínas con cierta rapidez para pasar a ir disminuyendo su efecto en cuestión de horas, y desaparecer totalmente dentro de las siguientes 24 horas (Pruss et al., 1997).

La idea de utilizar ARNi para fines terapéuticos ha sido probada ampliamente en los últimos años (Shuey et al., 2002). Dónde las terapias con secuencias anti-sentido han fracasado, los métodos de aplicación mejorados y la optimización de las dianas para los RNAi están provocando emoción entre los investigadores en múltiples campos de la medicina (Shuey et al., 2002).

El ojo es un compartimento relativamente aislado lo cual le hace un órgano diana ideal para la terapia génica (Bumcrot et al, 2006;. Campochiaro, 2006). Los siRNA se han empleado con éxito en modelos animales de neovascularización ocular y en procesos de cicatrización usando diferentes tipos de formulaciones (Reich et al, 2003; Nakamura et al, 2004; Shen et al, 2006). Si el siRNA se inyecta en la cavidad vítrea se difunde fácilmente en todo el ojo y es detectable durante al menos cinco días (Shen et al., 2006). Las cantidades utilizadas en estas inyecciones intraoculares son pequeñas en comparación con las dosis utilizadas para estudios sistémicos. Además, la dilución que se produce de las pequeñas cantidades del siRNA que pueden escapar del ojo permiten suponer que es rápidamente degradado al llegar al torrente sanguíneo. Este hecho permite el silenciamiento local en el interior del ojo sin que exista un efecto sobre el mismo gen fuera del globo ocular. De este modo se reduce la probabilidad de efectos en otros tejidos que complicarían los tratamientos en el ojo.

Los tratamientos actuales para el glaucoma, incluyen el empleo de los beta-bloqueantes, alfa-agonistas y agonistas colinérgicos tienen, numerosos efectos adversos como alteraciones respiratorias, cardíacas y ciertos efectos secundarios del sistema nervioso central (Schwartz et al, 2004;. Lee and Higginbotham, 2005; Tsai and Kanner, 2005). Además, dependiendo del tratamiento, deben ser administrados una vez, dos veces o incluso hasta cuatro veces al día. Para muchos pacientes, sobre todo los que usan la aplicación tópica en forma de colirio, la terapia falla en muchos casos debido a un mal cumplimiento y persistencia en el tratamiento.

En la actualidad, algunos siRNA se han aplicado en el ojo para el tratamiento de la presión intraocular elevada asociada al glaucoma. El diseño de siRNA para silenciar dianas tales como los receptores adrenérgicos, la acetilcolinesterasa y las ATPasas, han permitido obtener resultados positivos de reducción de la PIO con efectos secundarios mínimos. Además, la duración del efecto en el tiempo con el siRNA es mucho mejor que el que se obtiene con los tratamientos farmacológicos clásicos. En general, todo siRNA probado, comienza a producir el efecto hipotensor después de la tercera dosis causando la dismi-

nución máxima de la PIO entre el tercer y quinto día posterior al comienzo del tratamiento. En general, todos aquellos siRNA que produjeron su efecto, recordemos que la selección de la secuencia es importante para el éxito del tratamiento, produjeron un descenso pronunciado y estadísticamente significativo de la PIO que duró casi cinco días. Se pueden conseguir mejoras en términos de los efectos máximos y efectos promedio en el tiempo de duración en función de la diana seleccionada, e incluso dentro de una determinada diana, escogiendo una determinada secuencia de oligonucleótidos como se ha comentado anteriormente.

El bloqueo de los receptores beta 2 adrenérgicos con compuestos tales como timolol puede ser imitado cuando la expresión de este receptor se inhibe por un secuencia selectiva de oligonucleótidos contra el ARNm que codifica para esta proteína. El silenciamiento de este receptor mediante la aplicación de cuatro dosis consecutivas produce una disminución de la PIO de  $14,01 \pm 0,75\%$ , registrándose dicha bajada durante 102 horas (Pintor et al., 2006). Además, un ensayo de dos tandas de cuatro días consecutivos con el mismo siRNA contra la mismo receptor beta 2 demuestra la falta de desensibilización, que se sabe que ocurre con algunos compuestos farmacéuticos. Por lo tanto, el tratamiento a largo plazo con este siRNA disminuye la IOP de una manera similar a como ocurre con otros medicamentos de aplicación de una sola dosis (reducción de la PIO,  $20,08 \pm 0,75\%$ ). Sin embargo, la principal diferencia es que el efecto de este medicamento dura más de 223 horas (Pintor et al., 2006).

Algunos tratamientos actuales utilizan agonistas alfa adrenérgicos para reducir la PIO (Pintor et al., 2006). La implicación de este receptor en el control de PIO ha sido motivo de controversia. Los experimentos con ratones knock-out que carecen de los receptores alfa adrenérgicos demuestran que al menos en los ratones, estos receptores no parecen estar involucrados en el control de la PIO. Curiosamente el silenciamiento de receptores alfa1A y alfa1b producen una reducción la PIO en conejos, sugiriendo que no solo los receptores beta adrenérgicos sino que también los alfa adrenérgicos serían responsables de la producción de humor acuoso en el cuerpo ciliar. Es importante tener en cuenta que al comparar ambos tipos de receptores adrenérgicos parece que los receptores beta adrenérgicos son más relevante que los alfa. Comparativamente hablando los beta adrenérgicos prolongan el silenciamiento, y por ende la bajada de la presión intraocular 24 horas más que los alfa adrenérgicos (Pintor et al., 2006).

La Na-K-ATPasa es otro objetivo interesante a tener en cuenta a la hora de buscar dianas sobre las que trabajar con los siRNA (Jiménez et al., 2007). La implicación de esta proteína en el mantenimiento de los gradientes iónicos en las células neurales y no neurales, es igualmente importante en la

producción de humor acuoso. Silenciando independientemente la subunidad alfa 1, alfa 2 o la beta1 obtenemos información relevante de la implicación de la ATPasa en la regulación de la producción del humor acuoso. El silenciamiento selectivo de las mencionadas subunidades demuestra que no existen tantas diferencias cuando se silencia una u otra subunidad de la ATPasa. En cualquier caso, ha sido posible ver que las reducciones en la PIO apenas sobrepasaban el 15% aunque este efecto permaneciese durante aproximadamente 100 horas (Jimenez et al., 2007).

Los agonistas colinérgicos se han utilizado en el pasado para el tratamiento del glaucoma. Dado que la farmacología clásica ha tratado de emplear agonistas colinérgicos el enfoque adoptado en el caso de los siRNA ha sido evitar la expresión de la acetilcolina esterasa (AChE) con el fin de permitir a la acetilcolina actuar durante un período de tiempo más largo sobre los correspondientes receptores colinérgicos.

El desarrollo de una secuencia de oligonucleótidos contra el ARNm que codifica para la acetilcolinesterasa nos ha permitido ver una reducción de la PIO en los conejos de un 25% en comparación con los animales no tratados (Peral et al., 2007). Este efecto se ha mantenido durante más de 100 horas, por lo tanto, la AChE se ha convertido en una diana a tener en cuenta como un nuevo enfoque para el tratamiento de hipertensión ocular por medio de esta nueva aproximación terapéutica. No obstante, es necesario señalar que los receptores de la acetilcolina están presentes en muchas de las estructuras intraoculares y que el hecho de mantener a este neurotransmisor más tiempo en la cámara anterior puede producir algunos efectos secundarios. Uno de estos efectos podría ser la contracción del músculo ciliar evitando el proceso de acomodación del cristalino. Este hecho impide a los pacientes enfocar las imágenes con las consecuencias negativas y desagradables que ello conlleva.

La importancia de este nuevo enfoque para la reducción de la PIO no es solamente la magnitud de la bajada de la presión sino también el tiempo de duración. En este sentido y en comparación con los fármacos comerciales los siRNA presentan un promedio de 100 horas de duración, a diferencia de los productos tales como Xalatan (Latanoprost al 0,005%, análogo de prostaglandinas) o timoftol (maleato de timolol, -bloqueante), que deben aplicarse una o dos veces al día.

En este momento, los resultados son alentadores ya que además de los efectos deseados, bajada de la PIO y larga duración del efecto, después de muchos ensayos con siRNA no ha sido posible encontrar ningún efecto secundario. Con nuestros resultados y los de otros autores realizados en el ojo (Reich et al, 2003; Nakamura et al, 2004; Shen et al., 2006), podemos sugerir que con las dosis administradas, es difícil producir efectos sistémicos, pero se nece-

sita más trabajo para confirmar la ausencia de efectos secundarios en otros órganos que no sean el ojo.

## **La melatonina y sus análogos en el tratamiento del glaucoma**

La melatonina es una neurohormona producida por la glándula pineal, que es un importante regulador de la reproducción estacional y los ritmos circadianos como ya se ha mencionado anteriormente (Lincoln et al., 1981). La mayoría de las acciones de la melatonina están mediadas a través de receptores de membrana. Han sido clonados dos subtipos de receptores de melatonina en mamíferos el MT1 y el MT2 (Reppert et al., 1994; Roca et al., 1996) (figura 6). El receptor MT3 se ha identificado como la enzima quinona reductasa 2 (QR2) que posee, en algunos modelos, las características de un receptor de melatonina (Nosjean et al., 2000).

La melatonina está presente en el humor acuoso, ya que es sintetizada entre otras estructuras oculares por los procesos ciliares, el cristalino y la retina (Alarma-Estrany and Pintor , 2007). Los niveles de melatonina en el humor acuoso varían a lo largo de el día. Por la mañana la concentración de esta sustancia es 6,4 pg / ml (Chiquet et al., 2006). Además, las concentraciones de melatonina en este fluido entre 08:00 y 16:00 h, son similares y significativamente más bajas que las que se registra entre las 22:00 y 01:00 h (Yu et al., 1990). Por lo tanto, los niveles de melatonina en el humor acuoso se incrementan en la oscuridad (Liu y Dacus, 1991). Por otra parte, la tasa de producción de humor acuoso en humanos disminuye apreciablemente durante el sueño (Ericson, 1958; Reiss et al., 1984; Koskela y Brubaker, 1991) y la presión intraocular disminuye. Dicha disminución es comparable con el efecto que se puede lograr con inhibidores de las anhidrasas carbónicas o con los antagonistas beta adrenérgicos (Reiss et al., 1984). Varios estudios han relacionado los cambios diurnos en la presión intraocular y la fluctuación de los niveles de melatonina, sugiriéndose la participación de algún mecanismo melatoninérgico en el control circadiano de la presión intraocular (Osborne and Chidlow, 1994;. Pintor et al., 2001).

Varios experimentos han demostrado que la melatonina y sus análogos son capaces de reducir la presión intraocular. Por ejemplo, la administración oral de melatonina fue capaz de reducir la PIO en humanos (Muestras et al., 1988).

Con la intención de buscar análogos de melatonina con un efecto mayor que la propia neurohormona, se ha ensayado alguno como la 5-metoxi-carbonilamino-N-acetiltriptamina (5-MCA-NAT). Este compuesto produjo una reducción dosis-dependiente de la PIO. Este efecto fue máximo a 100 mg/l, con una reducción de la presión de aproximadamente 40% en conejos (Pintor et al., 2001, 2003c) y del 19% en monos con glaucoma (Serle et al., 2004). El

efecto de este análogo dura más de 9 h en el caso de en conejo (Pintor et al., 2001) y al menos 18 h en los monos (Serle et al., 2004). Por lo tanto, la aplicación tópica de la melatonina y sus análogos en la superficie ocular y su posterior entrada al interior del ojo, pueden significativamente reducir la presión intraocular. Este hecho ha permitido sugerir a la melatonina (y a sus análogos) como fármaco potencial para el tratamiento de la hipertensión ocular y el glaucoma (Pintor et al., 2001).

Existen aspectos interesantes que apoyan la afirmación anterior. Por un lado, la evidencia disponible de que existen receptores de melatonina en el cuerpo ciliar de varias especies. Por otro lado la capacidad del cuerpo ciliar para sintetizar indolaminas (Alarma-Estrany y Pintor, 2007). En este sentido Osborne y colaboradores utilizando experimentos de autorradiografía y funcionales, mostraron la presencia de receptores para la melatonina plenamente activos en el cuerpo ciliar y en el iris del conejo (Osborne y Chidlow, 1994). Más tarde Wiechmann y coautores, utilizando técnicas de inmunocitoquímicas, observaron que en el epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar se podía medir la expresión del receptor Mel1c de melatonina (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 2001). Mas recientemente, por medio de inmunohistoquímica e inmuno transferencia (Western-blot), el receptor de melatonina MT2 ha sido detectado en los procesos ciliares del conejos albinos (Alarma-Estrany et al., 2008).

Sabiendo que el cuerpo ciliar es lugar de la formación del humor acuoso (Para et al., 2002) y sabiendo que es capaz de sintetizar melatonina (Martin et al., 1992), y habida cuenta de la existencia de los receptores MT2 (Alarma-Estrany et al., 2008), esta estructura ocular resulta un buen tejido sobre el que trabajar favoreciendo la actividad del sistema melatoninérgico. La melatonina se produciría de manera local y no contribuiría a alcanzar los niveles circulantes similares a los que se producen en la retina (Vaughan y Reiter, 1986). Por otro lado, por su ubicación en la superficie basolateral del epitelio ciliar no pigmentado, los receptores de la melatonina están posicionados para estar en el camino de la melatonina que se libera ya sea de la circulación o de la melatonina sintetizada por el cuerpo ciliar (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 2001).

Los mecanismos por los que la melatonina y análogos reducen la PIO no se conocen por completo. Sin embargo se van aclarando algunas conexiones con otros transmisores que ayudan a ver y a entender las interconexiones entre la melatonina y otros neurotransmisores. Por ejemplo, el pretratamiento en conejos con antagonistas colinérgicos y/o adrenergicos, abolen la respuesta hipotensora que presenta la melatonina y su análogo el 5-MCA-NAT (Pintor et al., 2003c). Además, después de una simpatectomía química por medio de reserpina o 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), tanto el agonista de los receptores MT2 (2-metoxi-6H-isoindolo [2,1-a] indol-11-il) etanamina N-butanoil-2 (llama-

do también IJK7) como el agonista MT3 5-MCA-NAT, fueron prácticamente incapaces de llevar a cabo el efecto hipotensor que poseen en ojos están intactos (Alarma-Estrany et al., 2007, 2008). Parece que el análogo de la melatonina y agonista MT3, el 5-MCA-NAT, está íntimamente vinculado al componente simpático que controla la síntesis del humor acuoso. El receptor de la melatonina MT3 se ha descrito en algunos modelos animales como la quinona rectasa 2 ó QR2 (Nosjean et al., 2000), por lo tanto, es interesante conocer si la actividad hipotensora del 5-MCA-NAT se lleva a cabo a través de la QR2 o por el contrario existe un receptor MT3 diferente a los receptores de melatonina MT2. Con la idea de arrojar un poco de luz en este asunto, los estudios que hemos realizado han demostrado que los los receptores MT2 de la melatonina y los marcadores que identifican el sistema nerviosos simpático en los procesos ciliares no colocizan (Alarma-Estrany et al., 2008).

Posteriormente, se ha podido demostrar que los receptores de melatonina presentes en los procesos ciliares están modulados por el sistema nervioso simpático. Es precisamente el neurotransmisor noradrenalina a través de -adrenoceptores el encargado de producir la fosforilación de los receptores de la melatonina, gracias a lo cual estos receptores mejoran su actividad hipotensora ocular (Alarma-Estrany et al., 2008). Esto explicaría porque cuando se destruye el sistema nervioso simpático con reserpina o 6-OHDA la actividad de la melatonina y sus derivados bajando la presión intraocular se ve seriamente comprometida.

Es obvio que la melatonina y sus análogos son sustancias potenciales para el tratamiento de la PIO pero es necesario conocer de qué manera estas sustancias están realizando su efecto, bien la disminución de la formación del humor acuoso o bien el aumento de la tasa de drenaje. También, es importante tener en cuenta que pese a que el interés principal de la melatonina y análogos radica en controlar la PIO, la descripción de la melatonina como una molécula neuroprotectora representa un valor añadido en la búsqueda de una nueva terapia eficaz en glaucoma (Osborne et al., 1999). La melatonina se ha definido como un prometedor agente neuroprotector en modelos experimentales de varios trastornos neurológicos y neurodegenerativos (Mayo et al., 1998; Pappolla et al., 1999; Reiter et al., 1999). Por lo tanto, sería interesante estudiar si los análogos de la melatonina, los compuestos IJK7 y 5-MCA-NAT mantienen las propiedades neuroprotectoras de la melatonina.

En resumen, el efecto hipotensor ocular de estas moléculas junto con la posible acción neuroprotectora podría convertir a estos compuestos en buenos candidatos para el tratamiento de la presión intraocular y glaucoma. Además, la melatonina parece estar relativamente libre efectos secundarios además de ser eficaz a bajas concentraciones (Muestras et al., 1988).

## **Las proteínas de transducción nuevas herramientas útiles para el control de la presión intraocular**

En la búsqueda de nuevos compuestos, más eficaces y más selectivos para el tratamiento de la hipertensión ocular y el glaucoma, siempre que se desee salir de las pautas clásicas, el investigador se siente obligado a romper con los moldes habituales y debe dar un paso más allá, tratando de encontrar soluciones originales. Es, hasta cierto punto habitual, que para la búsqueda de nuevos tratamientos para patologías como el glaucoma se diseñen y empleen nuevas moléculas. Sin embargo, cualquiera de estas nuevas moléculas van a realizar sus efectos generalmente a través de dos mecanismos principales: agonismo o antagonismo en un determinado tipo de receptor o la inhibición o activación de un determinado enzima (Uva et al., 2006).

Sin embargo, y en relación con el control de la presión intraocular, existe una tercera vía: explorar nuevos mecanismos para la reducción de la presión intraocular diferentes de los anteriores, basados en las técnicas bioquímicas más modernas y combinándolas con la fisiología y farmacología ocular más clásica.

Así pues, la dinámica del citoesqueleto celular es un área interesante sobre la que se puede trabajar. Esto resulta aun más interesante cuando se sabe que el punto principal del drenaje del humor acuoso, la malla trabecular, es susceptible de sufrir cambios morfológicos transitorios. Dichos cambios están ligados al citoesqueleto de estas células sobre las que las latrunculinas y otros agentes despolimerizantes de la actina pueden aumentar de la posibilidad de salida del humor acuoso (Peterson et al., 1999; Peterson et al., 2000) .

Una de las proteínas capaces de reorganizar el citoesqueleto de actina es la profilina. La profilina es una proteína pequeña (12-15 kDa) abundantemente expresada en todas las células eucariotas que se une a los monómeros de actina que catalizan el intercambio de ADP a ATP y promueve la polimerización de los filamentos de actina (Witke, 2004).

Recientemente, un enfoque novedoso para la entrada de las proteínas y otra sustancias a través de las membranas y tejidos biológicos ha surgido gracias al conocimiento de las proteínas con dominios de transducción derivados de la familia TAT (Schwarze et al., 1999). Estas proteínas permiten llevar a otras a través de la membrana celular desde el exterior de las células hacia el citoplasma de una manera independiente (Ho et al., 2001).

Resulta pues lógico tratar de combinar la habilidad de proteínas de transducción con otras como la profilina, con el objeto de hacerla llegar a la malla trabecular y hacer que esta facilite el drenaje del humor acuoso y por consiguiente la disminución de la presión intraocular. De este modo, una proteína recombinante obtenida por la fusión de profilina I con el dominio de transducción de PTD4, una versión más eficiente de TAT, ha sido capaz de cruzar las

membranas celulares de las células trabeculares y facilitar la salida del humor acuoso en un modelo bovino (Gomez-Cabrero et al., 2005).

Esta misma proteína recombinante ensayada "in vivo" reduce significativamente la presión intraocular. Además, esta reducción, del 20 %, fue equivalente a la obtenida con otros fármacos comerciales. Sin embargo el tiempo de duración del efecto de la PTD4-profilina se prolongó notablemente en comparación con los otros compuestos probados. Este hecho indica que la PTD4-profilina fue capaz de mantener una reducción de la presión intraocular más sostenida, probablemente porque está utilizando un mecanismo molecular diferente para reducir este parámetro fisiológico. En claro contraste con los mecanismos utilizados por los compuestos comerciales disponibles, el mecanismo de acción para PTD4-profilina acontece en el citoesqueleto de las células de la malla trabecular. De este modo, la modificación de la forma celular o la contractilidad favorecen la reducción de la resistencia hidrodinámica a la salida del humor acuoso, haciendo que la presión intraocular disminuya (Morales et al., 2007).

Es especialmente interesante considerar la bioquímica y propiedades farmacológicas del tándem PTD4- profilina. La combinación de estas dos moléculas proporciona un nuevo fascinante concepto, en claro contraste con los fármacos disponibles para el tratamiento de la hipertensión ocular. La profilina no actúa estimulando un receptor, antagonizándolo o inhibiendo un enzima, sino que lo hace modificando la arquitectura del citoesqueleto y por lo tanto mejorando la salida del humor acuoso.

## **Hacia donde vamos**

La comprensión de cómo el sistema nervioso controla la PIO y el posterior desarrollo de agonistas, antagonistas e inhibidores de diferentes dianas terapéuticas, ha sido el objetivo principal de las empresas a la hora de diseñar compuestos para el tratamiento del glaucoma. Estas empresas toman como base grupos de moléculas, como los antagonistas beta-adrenérgicos o los agonistas alfa-adrenérgicos, y los modifican con el fin de obtener compuestos más selectivos y eficaces para reducir la PIO.

El tratamiento del glaucoma es exigente y demanda más y mejores compuestos. Esto es principalmente debido a la falta de actividad de estos fármacos en algunos pacientes y a los efectos secundarios descritos para la mayoría de productos farmacéuticos disponibles. Está claro que es necesario ampliar las miras para el tratamiento de esta patología y sobre todo tratando de encontrar otros nuevos con efectos poderosos y reacciones adversas mínimas. El desarrollo de compuestos tales como nucleótidos, la melatonina y análogos, los siRNAs, o las proteínas de transducción, solos o en combinación con formulaciones ya existentes ayudarán aquellos pacientes que, por diversos motivos, no pueden usar los medicamentos para el glaucoma.

## **LAS CATARATAS Y SU TRATAMIENTO CON siRNA**

El cristalino es la estructura ocular, junto con la cornea, que permite enfocar las imágenes en la retina. Contiene altos niveles de proteínas en una organización estructural perfecta que hace que sea transparente. El cristalino es una estructura avascular que está rodeada por una membrana basal llamada cápsula. Las células epiteliales aparecen inmediatamente debajo de la cápsula, y células fibrilares o simplemente «fibras» forman el resto de este tejido ocular.

Desde el desarrollo embrionario y así sucesivamente, las células epiteliales realizan mitosis en la zona de ecuador. Las nuevas fibras formadas, se encuentran de forma concentrica sobre las fibras desarrolladas anteriormente, formando una estructura que se asemeja a una cebolla.

El cristalino es transparente, ya que no absorbe y dispersa mínimamente la luz que pasa a su través. La cantidad de luz que dispersa el cristalino es del 5% y ello se debe a las membranas plasmáticas de las fibras que lo componen. Como el volumen ocupado por estas membranas es del 0,05% del total, se puede concluir que los citoplasmas de las fibras son prácticamente transparentes. Sin embargo, el citosol de estas células contiene un 35% de biomoléculas, en particular proteínas solubles: las cristalinas.

El cristalino puede sufrir cambios debido a problemas metabólicos o simplemente debido al envejecimiento. Estas modificaciones deterioran las proteínas haciendo que se agreguen y precipiten, de manera que la transparencia se pierde gradualmente. Este proceso es conocido con el nombre de cataratas (Harding, 1991).

Desde una perspectiva clínica, las cataratas se pueden definir como el deterioro de la visión debido a una alteración de la transparencia del cristalino. Desde un punto de vista bioquímico, cualquier opacificación que produzca la dispersión de la luz es una catarata. La etiología de las cataratas es diversa y por lo tanto es muy difícil atribuir su causa exclusivamente a un solo factor. Lo que está claro es que un fallo en el metabolismo del cristalino es, sin duda, uno de los motivos. Esta vinculación con un fallo metabólico se ha demostrado claramente enfermedades sistémicas tales como la diabetes o la galactosemia.

No hay duda en la actualidad de que la mayor parte de los procesos metabólicos que se realizan en el cristalino lo llevan a cabo las células de su

epitelio. El intrincado sistema de uniones estrechas o GAP-junctions permiten a las células epiteliales comunicarse con las fibras más internas. La síntesis de los componentes estructurales y el mantenimiento de los sistemas de transporte en el cristalino dependen de una fuente continua de ATP. Este es un proceso de capital importancia, cuyo fin es mantener esta estructura perfectamente transparente. Este sentido la producción de energía depende casi en su totalidad del metabolismo de la glucosa, que es metabolizada por tres rutas principales: la glucólisis, ruta de las pentosas fosfato y la vía de los polioles. A su vez la glucosa puede ser transportada por dos tipos de transportes glucosa en el cristalino, GLUT1 y GLUT3, tomando el azúcar del humor acuoso que le rodea (Winkler and Riley, 1991; Merriman-Smith et al., 2003).

La vía glicolítica del cristalino no se diferencia a la de otros tejidos. Una de las principales enzimas reguladoras de esta vía, la hexoquinasa, está presente en niveles bajos y sólo se han sido descrito dos isoformas, la hexoquinasa I y II en esta estructura ocular. La Km de la hexoquinasa de tipo I es menor que la de tipo II, sin embargo, la hexoquinasa tipo II es más abundante que la I. Es probable que esta última se emplee cuando los niveles de glucosa se elevan (Kinoshita, 1955).

La concentración de la hexoquinasa disminuye a medida que el individuo envejece. Esta puede ser una de las razones por las que durante el envejecimiento el cristalino puede estar más predispuesto a patologías como las cataratas, fundamentalmente debido a la caída de los niveles de ATP que van a impedir el correcto funcionamiento del cristalino en procesos tales como el transporte activo que regula el equilibrio de electrolitos.

Además de la glucólisis, parte de la glucosa se metaboliza por la ruta o shunt de las pentosas fosfato. Esta vía no genera grandes cantidades de ATP, pero es esencial, ya que permite la síntesis de cantidades significativas de NADPH + H<sup>+</sup>, por parte de la primera enzima de esta vía, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. El NADPH + H<sup>+</sup> es esencial para funcionamiento tanto de la glutatión reductasa como de la ruta de los polioles. Se ha demostrado que alrededor del 14% de la glucosa se metaboliza por esta vía. La ruta de las pentosas fosfato se activa bajo condiciones de estrés oxidativo, ya que el glutatión (GSH) debe estar disponible para defender al cristalino frente a los radicales libres (Giblin et al., 1981).

La tercera vía metabólica que emplea la glucosa es la ruta de los polioles, que también se conoce como la vía de sorbitol. Esta ruta fue descrita por van Heyningen en 1959 después de la verificación de la acumulación de polioles en el cristalino. Las dietas con altas cantidades de glucosa, galactosa, o xilosa potencian la aparición de cataratas en modelos experimentales, siendo la ruta involucrada la vía de los polioles (Dvornik et al., 1973).

La ruta de sorbitol está formada solamente por dos enzimas, la aldosa reductasa, que emplea NADPH + H<sup>+</sup> como cofactor y en segundo lugar la poliol deshidrogenasa que utiliza NAD<sup>+</sup> como coenzima. Se considera que aproximadamente un tercio de la glucosa entra en el cristalino se metaboliza a través de la vía de sorbitol (Jedziniak et al., 1981).

La aldosa reductasa humana tiene una Km para la glucosa de 200 mM, y se encuentra ubicada principalmente en el epitelio del cristalino, ya que es donde se ha localizado el 70% de la actividad de esta enzima. Esto es importante porque significa que la concentración de sorbitol se acumula en un área muy pequeña del cristalino de modo que el efecto final es un aumento de 50 veces la concentración que sería de esperar si la distribución de la enzima fuese homogénea a lo largo de todo el cristalino (Crabbe and Goode, 1998).

La poliol deshidrogenasa (sorbitol deshidrogenasa) está presente en el cristalino de muchas especies, pero no se ha estudiado tan en profundidad como la aldosa reductasa. La sorbitol deshidrogenasa está más distribuida que de la aldosa reductasa. La poliol deshidrogenasa se encuentra el 50% en el epitelio y el 50% en el resto del cristalino. Curiosamente, a diferencia de la aldosa reductasa, la poliol deshidrogenasa no puede metabolizar inositol, glicerol o dulcitol (galactitol) (Jedziniak et al., 1973).

La importancia de la vía de los polioles es notable en los individuos que posean niveles elevados de azúcares en el plasma y en el humor acuoso. En individuos normales, debido a que la concentración de glucosa está entre 0,7 a 2,2 mM, la aldosa reductasa apenas funciona. Sin embargo, bajo condiciones patológicas tales como la diabetes, donde la concentración de glucosa esta entre 3 y 4,5 mM, la aldosa reductasa si podrá catabolizar la glucosa.

La importancia de esta ruta se vincula la actividad de otro enzima, la hexoquinasa, cuya actividad disminuye con la edad. Por lo tanto, dado que ambas enzimas tienen a la glucosa como un sustrato, el equilibrio entre las actividades de ambas proteínas es esencial para saber cual será el destino de la glucosa. La Km de la hexoquinasa presente en el cristalino es de 100 μM, de modo que a altas concentraciones de glucosa, el enzima está saturado. Este hecho hace que el vía sorbitol pase a ser relevante, máxime cuando se trate de individuos con diabetes o galactosemia. Aunque el enzima poliol deshidrogenasa tiene una Km baja para el sorbitol, este poliol se acumula en cantidades importantes en el cristalino debido a que este enzima está presente en menos cantidad que la aldosa reductasa. Se considera que hay 30 veces más aldosa reductasa que poliol deshidrogenasa en los modelos animales estudiados. Sin embargo, en los seres humanos concentración de poliol deshidrogenasa del cristalino es 80 veces más alta que la de la aldosa reductasa. Este hecho es lo que indica es que aunque es probable la existencia de cataratas debido a la vía

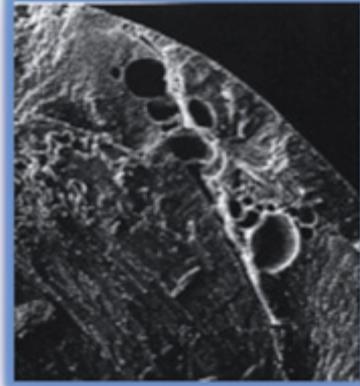
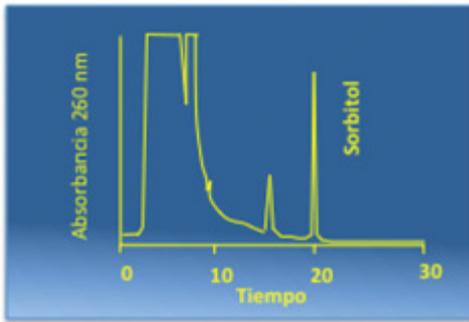


Figura 11. Acumulación de polioles en el cristalino tal y como se puede detectar por técnicas cromatográficas (a la izquierda) y sus efectos formando estructuras vacuolares en el cristalino (a la derecha).

de los polioles, es necesario hacer un estudio muy cuidadoso en la experimentación con animales a la hora de extrapolar los resultados a los seres humanos (Kinoshita et al., 1955).

La adición o la administración de suplementos de glucosa o galactosa a animales de laboratorio como los conejos de la raza Nueva Zelanda, ha permitido observar cambios morfológicos importantes en el cristalino. Por ejemplo, ha sido observada la aparición de estructuras en forma de vacuolas en el cristalino después de la administración de altas cantidades de glucosa en la dieta de los animales. Este efecto fue más rápido cuando los animales fueron alimentados con galactosa (efectos visibles en 3 semanas) que cuando se administra glucosa (efectos visibles a los 3 meses). La razón de todas estas diferencias es la ruta de polioles. Tanto la glucosa como la galactosa son metabolizados por la aldosa reductasa, rindiendo respectivamente sorbitol y dulcitol (galactitol). Aunque ambos azúcares se procesan de manera similar, el sorbitol transformarse en fructosa por la poliol deshidrogenasa, mientras que el dulcitol no es sustrato para este último enzima (figura 11).

En conclusión, ambos sustratos, la glucosa y la galactosa, inducen la acumulación de polioles, más rápido en el caso de galactosa. En cualquier caso y en última instancia van producir un efecto hiperosmótico que se traduce en una absorción de agua a través de la acuaporina 1 (AQ1) y la acuaporina 0 (AQ0, también conocida como proteína MIP). Esta entrada de agua desde el humor acuoso tiende a contrarrestar el gradiente osmótico producido por la acumulación de los polioles en el cristalino (Verkman et al., 2008).

En las últimas décadas, el ARN de interferencia (ARNi), se ha convertido en una herramienta poderosa para la comprensión de la función de los genes, ya que permite “silenciar” la expresión de los mismos para comprender su papel biológico. El silenciamiento es un proceso génico post-transcripcional específico, inicialmente estudiado en *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Sin embargo, pronto resultó obvio que el ARNi no se limitaba a los nematodos y el silenciamiento puede ser inducido en diferentes organismo eucariotas tales como *Drosophila*, (Kennerdell y Carthew, 1998), *Trypanosoma* (ONG et al., 1998), el pez cebra (Wargelius et al., 1999), la rana (Oelgeschlager et al, 2007.), *Hydra* (Lohmann et al., 1999) y en vertebrados (Wianny y Zernicka-Goetz, 2000). Comportamientos de silenciamiento similares se habían observado en plantas y hongos, donde introducción de transgenes exógenos silencian la expresión de los loci endógenos (Van der Krol et al., 1990).

RNAi está mediado por pequeños ARN de interferencia (siRNA) que se generan a partir de una hebra larga de RNA doble (dsRNA) de origen exógeno o endógeno (Elbashir et al., 2001). Estos dsRNA se escinden por una ribonucleasa II (RNNase III) denominada DICER. Proteínas homólogas a Dicer se pueden encontrar en *Schizosaccharomyces pombe*, *C. elegans*, *Drosophila*, plantas y mamíferos, lo que sugiere que este tipo de regulación es evolutivamente hablando antiguo y conservado. El siRNA generado por DICER es un fragmento corto (21-23 nucleótidos) de ARN dúplex con 2 nucleótidos en cada extremo 3' terminal. Cada cadena contiene un fosfato en posición 5' y un hidroxilo en la posición 3'. A continuación este siRNA se incorpora a un complejo llamado nucleasa RISC (RNAinduced silencing complex). RISC excinde el siRNA y coloca la una de las dos hebras, la complementaria, en contacto con el RNAm que va a ser destruido, al que se une por complementariedad de bases. (Nykänen et al., 2001). La estructura generada es interpretada por la célula como errónea y es destruida por lo que la desaparece el ARNm, la proteína que codificaba no se va a sintetizar (figura 10).

Hay muchos objetivos que podrían ser utilizados para tratar de detener las cataratas. Sin embargo, el silenciamiento de ciertas proteínas podría parar, en teoría, la progresión de esta patología. Por ejemplo, el silenciamiento de la aldosa reductasa podría ser de interés, ya que conduce a la generación de polioles que desencadenan el choque osmótico inicial que inicia las cataratas. Sería interesante saber si la desaparición y por ende la interrupción de esta ruta metabólica reduce significativamente la aparición de cataratas sin producir otros efectos de tipo inesperado.

Otra proteína interesante podría ser el transportador de glucosa GLUT1. Esta proteína tiene una Km mayor que el otro transportador de glucosa

presente en la lente, GLUT3. Este último es responsable de la afluencia masiva de glucosa en situaciones patológicas tales como la diabetes.

Una tercera posibilidad podría ser la acuaporina AQ1, ya que tiene un papel en la entrada de agua de los humores acuoso y vítreo y puede ser directamente responsable de la entrada de agua cuando existe una excesiva concentración de polioles en el interior del cristalino.

Las razones para la elección de estos tres objetivos son, en primer lugar, que juegan un papel dominante en el desarrollo de las cataratas. En segundo lugar, el silenciamiento selectivo no va a abolir completamente los procesos, tales como el metabolismo de los azúcares, o el transporte o trasiego del agua.

Por un lado, la aldosa reductasa utiliza la glucosa, pero no parece ser esencial para mantener la carga energética del cristalino, por lo que su silenciamiento podría evitar la aparición de cataratas sin producir, aparentemente, efectos colaterales. Por otra parte, si se silencia GLUT1 la glucosa puede entrar por el otro transportador, GLUT3, que siempre está saturado en condiciones fisiológicas, garantizando la entrada de glucosa para la producción de ATP. Respecto al silenciamiento de la acuaporina 1 (AQ1), impediría la entrada del agua pero la otra acuaporina, la AQ0, aseguraría el flujo de agua hacia el interior del cristalino.

Este puede ser el momento de comenzar el uso de nuevos métodos bioquímicos para revertir o detener condiciones patológicas, como las cataratas. La posibilidad abierta por la tecnología de los siRNA puede cambiar la falta de interés por parte de las empresas farmacéuticas en el desarrollo de compuestos para el tratamiento de las opacidades del cristalino.

## **LAS LENTES DE CONTACTO COMO DISPOSITIVOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS**

El ojo se caracteriza por su estructura compleja y su alta resistencia al paso de sustancias hacia su interior. Esta dificultad no solamente se hace patente cuando pensamos en la invasión por parte de los microorganismos sino que también afecta a la entrada de fármacos a su interior. Tanto es así, que uno de los principales retos de la farmacología ocular es facilitar el paso de sustancias con propiedades terapéuticas al interior del ojo para poder curar las patologías intraoculares.

Actualmente, más del 90% de los fármacos oftálmicos se aplican tópicamente en forma de soluciones o suspensiones (Ghate and Edelhauser, 2006). Estas formulaciones muestran generalmente una baja biodisponibilidad ocular debido a diversos factores tales como lagrimeo reflejo, el parpadeo, el drenaje nasolagrimal, la degradación metabólica y por supuesto la impermeabilidad relativa de la córnea, principalmente de su epitelio. Como consecuencia de todo ello los fármacos oftálmicos tienen un corto tiempo de residencia en la superficie del ojo. Se estima que la residencia es de menos de 5 min y que sólo de un 1 - 5% de un fármaco aplicado tópicamente es absorbido hacia el interior (Lang, 1995). La pérdida de fármaco, que va a ir a parar a la circulación sistémica, conduce, en primer lugar a un desperdicio de la sustancia y en segundo lugar podría favorecer la aparición de efectos secundarios sistémicos indeseables.

Para superar la baja biodisponibilidad ocular asociada con la administración ocular tópica de medicamentos en forma de colirios se han diseñado sistemas de administración de fármacos alternativos (Kompella et al., 2010; Rawas-Qalaji et al., 2012). En este contexto, las lentes de contacto blandas (LC) se perfilan como un nuevo vehículo para el suministro de los fármacos oftálmicos. En el ojo, las LC se separan de la córnea por una capa delgada de fluido llamada lágrima o película postlenticular. La película lagrimal postlenticular se mezcla lentamente con el resto de la lágrima estimándose dicho tiempo en aproximadamente 30 minutos (McNamara et al., 1999). Por lo tanto, los fármacos oftálmicos liberados de la LC tendrían un tiempo de residencia en la córnea de por lo menos 30 min. Este dato es importante si lo comparamos con los 5 minutos que tardan en desaparecer un fármaco de la superficie del ojo

(Creech et al., 2001). El mayor tiempo de residencia conduce a una mejora de la biodisponibilidad del fármaco que reduciría la cantidad de fármaco que entra en la circulación sistémica, aumentando de esa forma la eficacia terapéutica y la prevención de los efectos secundarios. El potencial de las LC de cargar fármacos convencionales utilizados para el tratamiento de problemas oculares ha sido ya valorada por algunos autores (Gupta and Aqil, 2012; Guzman-Aranquez et al., 2012).

La mayoría de los estudios realizados han sido en ensayos in vitro, mientras que la validación in vivo de lentes de contacto con estos fines terapéuticos no ha sido tan ampliamente examinada. Las lentes de contacto disponibles comercialmente se fabrican utilizando diferentes materiales que presentan cambios significativos en su contenido de agua y en la carga electrostática, entre otras propiedades (Karlgaard et al., 2003). Estas variaciones en los materiales pueden tener un efecto relevante en la interacción LC-fármaco, y por lo tanto afectando a las tasas de absorción del fármaco y a su liberación.

Se han desarrollado estudios iniciales sumergiendo lentes de contacto hidrofílicas comerciales a base de hidrogeles de poli-(2-hidroxietil metacrilato) (pHEMA) (Jain, 1988; Kim and Chauhan, 2008; Li and Chauhan, 2007) o de materiales altamente permeables al oxígeno basados hidrogeles de silicona (Kim et al., 2008; Peng et al., 2012). Las LC de hidrogeles de silicona (SiH) son muy recomendables pues transmiten más oxígeno que los materiales convencionales, por lo tanto, disminuyen los casos de hipoxia clínicos asociados con el uso prolongado de las lentes de contacto. Este hecho es interesante ya que estas LC pueden representar una opción mejor si lo que deseamos es emplearlas como vehículos de administración de fármacos para aplicaciones terapéuticas dilatadas en el tiempo.

Las nuevas sustancias que están emergiendo como agentes potenciales para el tratamiento del ojo seco, podrían ser buenas candidatas a ser administradas desde las LC. Entre estas, los dinucleótidos son interesantes ya que su aplicación tópica induce lágrima estimulando la secreción del componente acuoso así como la secreción de mucinas (proteínas clave que contribuye para el mantenimiento y la lubricación de la película lagrimal). El dinucleótido diadenosin tetrafosfato (Ap4A) produce un aumento de la secreción lagrimal de alrededor de un 60% por encima de los valores basales en modelos como el conejo albino de Nueva Zelanda (Pintor et al., 2002b). Del mismo modo, la aplicación de otros dinucleótidos como la diuridina tetrafosfato (Up4U, INS365, diquafosol), es también capaz de producir un aumento transitorio de la secreción lagrimal de unas 1,5 veces en un modelo de ojo seco desarrollado en la rata (Fujijara et al., 2001). De hecho este dinucleótido se ha desarrollado como un nuevo tratamiento para el ojo seco y, después de la finalización de ensayos

clínicos, se ha puesto a la venta en Japón comercializado por el laboratorio Santen Pharmaceuticals (Nakamura et al., 2012).

Los trabajos realizados en nuestro grupo con dos lentes de hidrogel convencionales (Omafilcon A, que es un material no iónico y Ocufilecon D, que es iónico) y dos lentes de contacto de hidrogel de silicona (comfilecon A, que es no iónico y Balafilcon A que es iónico), con parámetros similares (diámetro, curva base y espesor central), han demostrado la utilidad de este modo de administración. La incorporación de un fármaco en la lente se puede lograr mediante diferentes técnicas como la carga de con nanopartículas coloidales, impresión molecular, o simplemente empapando la lente en una solución que contenga el fármaco (Guzman-Aranguez et al., 2012).

El método de inmersión de las lentes de contacto en una solución que contuviera el compuesto Ap4A es sencillo y muy práctico. Cuando las LC son empapadas en una solución que contiene el dinucleótido, el compuesto se difunde en la matriz de la lente donde queda atrapado el tiempo suficiente para, posteriormente ser liberado cuando se transfiere a la lágrima, tal y como ocurre para otros compuestos (Li and Chauhan, 2006). De hecho, un número de grupos de investigación están trabajando en el desarrollo de LC que liberen medicamentos con la idea de tratar el ojo seco. Se han venido empleando varias moléculas que favorecen la rehumectación tales como el ácido hialurónico o la hidroxipropil metilcelulosa (Ali and Byrne, 2009; Scheuer et al., 2010).

Sin embargo, empapar las LC con una solución de ácido hialurónico no permite cargar una cantidad suficiente, por lo que la liberación de este compuesto se ha demostrado que ocurría en menos de 1 hora (Scheuer et al., 2010). Teniendo en cuenta las características de la patología de ojo seco, se han realizado también ensayos con ciclosporina, con el objetivo de reducir la inflamación asociada a la sequedad ocular. En este caso, la liberación de la ciclosporina de las lentes de contacto, resultó ser muy exitosa ya que el fármaco antiinflamatorio fue liberado de la lente dentro de una ventana terapéutica de 14 días (Peng and Chauhan, 2011).

Cuando los estudios son realizados con el compuesto Ap4A, los estudios *in vitro* de la liberación de las lentes de contacto demuestran este compuesto se libera al menos durante dos horas (Dominguez-Godinez, et al., 2013). Es importante comentar que de todas las lentes de contacto ensayadas, las de hidrogel de silicona fueron las que tuvieron un proceso de liberación más retardado (figura 12).

Indudablemente las propiedades químicas y el contenido de agua se han sugerido como elementos clave de la lente de contacto de cara a la mayor o menor captación o asociación del fármaco y a su posterior liberación (Karlgaard

et al., 2003). Las lentes convencionales de hidrogel se hacen en poliHEMA que son materiales hidrófilicos, por su parte los hidrogeles de silicona tienen varios monómeros de siloxano por lo que este material es menos hidrófilico (Kim et al., 2008).

Los estudios realizados con el compuesto Ap4A, sugerían una mejor interacción con las LC de hidrogel convencional que con las lentes de hidrogel de silicona, debido a sus propiedades hidrófilicas. De hecho, las lentes de contacto hidrófilicas liberan más dinucleótido que las lentes de SiH en los primeros minutos.

En cuanto a contenido de agua, la liberación del fármaco es mayor en la LC con más contenido de agua. Probablemente esto es debido a la absorción de agua que llevará consigo el transporte del compuesto Ap4A al interior de la lente de contacto (Phan et al., 2013). De hecho, la liberación del Ap4A se correlaciona bien con el contenido de agua que posee la lente. Sin embargo parece que hidrófilicidad y el contenido de agua no son los principales factores que pueden influir en la liberación del dinucleótido. La carga iónica del material de la LC puede ser el factor principal en la liberación del Ap4A. En este sentido, es importante señalar que Ap4A es un dinucleótido que presenta cuatro fosfatos que, en pH neutro, aportan cuatro cargas negativas (Pintor et al., 1996). Este podría ser el motivo por el que las lentes con carga iónica, también con carga negativa, puedan repeler al Ap4A. Esto puede producir dos efectos indeseables, ya sea una mala carga del dinucleótido o / y una liberación rápida de la lente debido a la repulsión entre las cargas negativas de Ap4A y el material de lente de contacto.

Otra diferencia importante entre ambas lentes de SiH es la presencia de un tratamiento superficial de oxidación de plasma en la lente iónica Balafilcon A, que no está presente en la lente no iónica Comfilcon A. Estos tratamientos de plasma se han aplicado a la primera generación de lentes de contacto de SiH con el fin de contrarrestar la naturaleza hidrófoba de los restos de siloxano. Este aspecto también podría desempeñar un papel en la cinética de absorción y liberación del Ap4A.

Hay numerosos estudios *in vitro* sobre la administración de fármacos desde LC, pero no hay tantos *in vivo* evaluando comportamiento de liberación de dichos fármacos. El conejo de Nueva Zelanda y el perro Beagle son los modelos más utilizados para los estudios *in vivo* de liberación de fármacos desde lentes de contacto. (Tieppo et al., 2012; Xu et al., 2011; Schultz and Morck, 2010). Los estudios iniciales pretendían estudiar todas aquellas lentes que se habían valorado *in vitro* también *in vivo*. Sin embargo, las lentes de contacto de hidrogel son difíciles de adaptar a los conejos se secan a la primera hora del porte y la membrana nictitante del animal expulsaba la lente del ojo.

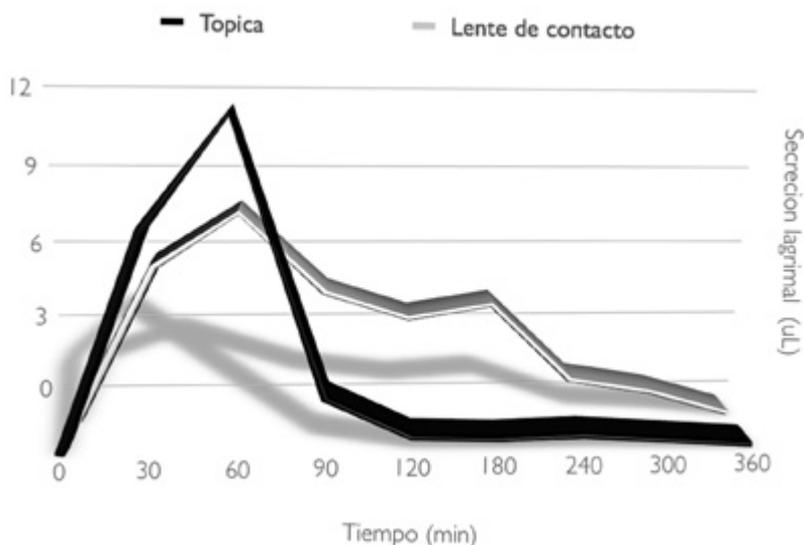


Figura 12. Efecto del Ap4A sobre la secreción lagrimal a lo largo del tiempo, comparando la aplicación tópica y el empleo de lentes de contacto cargadas con el dinucleótido.

Los estudios que se han realizado con las otras lentes han demostrado que el comfilcon A, un SiH no iónico, puede mantener la concentración de Ap4A en la lágrima del conejo en torno al 2  $\mu\text{M}$  (valor establecido como una concentración necesario aumentar lágrima secretion) durante 60 min, en comparación con 5 min que permanece la administración tópica. El efecto de Ap4A liberado de las lentes de material comfilcon A, un SiH no iónico, duró más de 300 minutos, 5 veces más en comparación con el tiempo de presencia del Ap4A la superficie (figura 12).

En cuanto a que mecanismo es el que pone en marcha el dinucleótido Ap4A, todo indica que es la activación de los receptores purinérgicos de tipo P2Y2. Parece pues que los receptores P2Y2 presentes en la glándula lagrimal principal y accesorias (Cowlen et al., 2003) son estimulados por el Ap4A y este efecto se mantiene aún cuando los niveles del dinucleótido han disminuido en la superficie ocular. Por lo tanto, el dinucleótido puede actuar sobre la glándula lagrimal para inducir la secreción lagrimal (Peral et al., 2008; Pintor et al., 2004). En este sentido, el dinucleótido puede proporcionar una gran comodidad en los pacientes con sequedad ocular y podría ser particularmente útil para prevenir el disconfort por el porte de las propias lentes de contacto. Sin embargo, es necesario ser cuidadoso con la extrapolación de estos resultados in vivo obtenidos en modelos animales, ya que existen diferencias obvias que podrían afectar a la tasa de liberación del dinucleótido. La diferencia más impor-

tante es la frecuencia de parpadeo, menor en conejos, (Maurice, 1995), sobre todo teniendo en cuenta su papel en la liberación natural de Ap4A (Peral et al., 2006), así como en el porte de la LC. En este sentido, es necesario obtener resultados con seres humanos, ya que parpadean más a menudo lo que permite niveles tónicos más altos del Ap4A debido a la estimulación mecánica durante el parpadeo en sí (Peral et a., 2006).

Queda aún un largo recorrido por realizar donde entre otros experimentos se requerirá una investigación profunda para ver como afecta la concentración del nucleótido en los procesos de carga y de liberación.

Resumiendo, es posible utilizar lentes de contacto comerciales como sistemas de administración para moléculas que inducen la sección lágrimal. Los experimentos realizados con la molécula Ap4A demuestran que su liberación es más lenta y su acción más eficaz y duradera cuando en lugar de ser instilada es liberada desde una lente de contacto. Esta perspectiva es de gran interés, puesto que no solamente se puede emplear para la liberación de fármacos con acciones en la superficie ocular sino que puede emplearse para administrar fármacos con dianas intraoculares para patologías como el glaucoma, las cataratas o la degeneración macular.

## CONCLUSIONES

Aunque el avance del conocimiento es sin duda la clave del desarrollo científico y tecnológico, también es obvio que no basta por si mismo para transformar el mundo. Una parte importantísima de la actividad científica esta dedicada enteramente en convertir las grandes ideas en no menos grandes aplicaciones que mejoran la vida de las personas y generan crecimiento económico.

Buscar nuevas aproximaciones farmacológicas para las patologías oculares es un reto que no solo se queda en el ámbito de la investigación sino que además tiene una trascendencia muy importante a nivel social. Las enfermedades que he relatado en el presente discurso, son sin duda alguna importantes por cuanto en la mayoría de los casos son incapacitantes y potencialmente pueden llevar a producir ceguera.

Quiero simplemente para terminar comentar que la ilusión y el empeño que me ha movido a investigar en todos estos temas tienen su origen en mi espíritu aventurero, que a diferencia de los personajes de Julio Verne, que tanto leía de niño, no tienen su escenario en el mundo visible sino en el mundo de lo que no se puede ver. He cambiado los paisajes del mundo y los viajes en globo o en cohete de Julio Verne, por las exploraciones con mi microscopio y mis viajes como si fuera un rayo de luz por el interior del ojo.

Y si se me permite y parafraseando al Capitan Nemo en una de sus frases de la novela 20.000 Leguas de Viaje Submarino, me gustaría decir:

“...Mientras Dios no se encargue de esta gente, me encargare yo...”

He dicho.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281–341.
- Acosta MC, Peral A, Luna C, et al. Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(7):2333–2336.
- Alarma-Estrany P, Pintor J (2007). Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther* 2007;113:507–522.
- Alarma-Estrany, P., Crooke, A., Mediero, A., Peláez, T., Pintor, J., (2008) Sympathetic nervous system modulates the ocular hypotensive action of MT2-melatonin receptors in normotensive rabbits. *J Pineal Res.* 45, 468–475.
- Alarma-Estrany, P., Crooke, A., Peral, A., Pintor, J., (2007) Requirement of intact sympathetic transmission for the ocular hypotensive effects of melatonin and 5-MCA-NAT. *Auton. Neurosci.* 137, 63–66.
- Alarma-Estrany, P., Pintor, J., (2007) Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol. Ther.* 113, 507–522.
- Ali M, Byrne ME. (2009) Controlled release of high molecular weight hyaluronic acid from molecularly imprinted hydrogel contact lenses. *Pharm Res.* 26:714-726.
- Arendt, D (2003) Evolution of eyes and photoreceptor cell types, *Int. J. Dev. Biol.* 47, 563–571.
- Arendt D, Hausen H, Purschke G. (2009) The 'division of labour' model of eye evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364(1531):2809-2817.
- Barker KE, Savage NW. Burning mouth syndrome: an update on recent findings. *Aust Dent J* 2005;50(4):220–223.
- Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, et al. Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul Surf* 2004;2(4):248–253.
- Brusini, P., Johnson, C.A., (2007) Staging functional damage in glaucoma: review of different classification methods. *Surv. Ophthalmol.* 52, 156–179.
- Buffa, A., Rizzi, E., Falconi, M., Matteucci, A., Baratta, B., Fantazzini, A., et al. (1993). Bromodeoxyuridine incorporation in corneal epithelium: an immunocytochemical study in rats. *Boll Soc Ital Biol Sper* 69, 767–773.

- Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V., Sah, D.W., (2006) RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.* 2, 711–719.
- Campochiaro, P.A., (2006) Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene Ther.* 13, 559–562.
- Carracedo G, Peral A, and Pintor J (2010) Diadenosine polyphosphates in tears of Sjogren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5452–5459.
- Castany M, Jordi I, Catala J, Gual A, Morales M, Gasull X, Pintor J. (2011) Glaucoma patients present increased levels of diadenosine tetraphosphate, Ap(4)A, in the aqueous humour. *Exp Eye Res.* 92(3):221-226.
- Chiquet, C., Claustrat, B., Thuret, G., Brun, J., Cooper, H.M., Denis, P., (2006) Melatonin concentrations in aqueous humor of glaucoma patients. *Am. J. Ophthalmol.* 142, 325–327.
- Coca-Prados, M., Escribano, J., (2007) New perspectives in aqueous humor secretion and in glaucoma: the ciliary body as a multifunctional neuroendocrine gland. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 239–262.
- Cowlen MS, Zhang VZ, Warnock L, Moyer CF, Peterson WM, Yerxa BR. (2003) Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by in situ hybridization. *Exp Eye Res.* 77:77-84.
- Crabbe MJ, Goode D (1998) Aldose reductase: a window to the treatment of diabetic complications? *Prog Retin Eye Res* 17: 313-383.
- Creech JL, Chauhan A, Radke CJ. (2001) Dispersive mixing in the posterior tear film under a soft contact lens. *Ind Eng Chem Res.* 40:3015-3026.
- Crooke A, Guzman-Aranguez A, Mediero A, Alarma-Estrany P, Carracedo G, Pelaez T, Peral A, Pintor J. (2014) Effect of Melatonin and Analogues on Corneal Wound Healing: Involvement of Mt2 Melatonin Receptor. *Curr. Eye Res.* 3:1-10.
- Crosson CE, Klyce SD, Beuerman RW (1986). Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;27:464–473.
- Dartt DA. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res* 2009;28(3):155–177.
- Darwin, C. (1882) *The Origin of Species by Means of Natural Selection*, sixth ed., John Murray, London.
- Doughty, M. J. (1990). Morphometric analysis of the surface cells of rabbit corneal epithelium by scanning electron microscopy. *Am J Anat* 189, 316–328.

- Dubocovich, M. L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 16, 50–56.
- Dutta D, Cole N, Willcox M (2012). Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses. *Mol Vis*. 18:14-21.
- Dvornik E, Simard-Duquesne N, Krami M, Sestanj K, Gabbay KH, et al. (1973) Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by an aldose reductase inhibitor. *Science* 182: 1146-1148.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 15, 188–200.
- Ericson, L.A., (1958) Twenty-four hourly variations of the aqueous flow; examinations with perilimbal suction cup. *Acta Ophthalmol*. 37 (Suppl 50), 1–95.
- Farahbakhsh, N.A., Cilluffo, M.C., (2002) P2 purinergic receptor-coupled signaling in the rabbit ciliary body epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 43, 2317–2325.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Fujihara T, Murakami T, Fujita H, Nakamura M, and Nakata K (2001) Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:96–100.
- Fujihara T, Murakami T, Fujita H, Nakamura M, Nakata K. (2001) Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42:96-100.
- Gever, J.R., Cockayne, D.A., Dillon, M.P., Burnstock, G., Ford, A.P.D.W., (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol*. 452, 513–537.
- Ghate D, Edelhauser HF. (2006) Ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 3:275-287.
- Giblin FJ, Nies DE, Reddy VN (1981) Stimulation of the hexose monophosphate shunt in rabbit lens in response to the oxidation of glutathione. *Exp Eye Res* 33: 289-298.

- Giraldez, L., Diaz-Hernandez, M., Gomez-Villafuertes, R., Pintor, J., Castro, E., Miras-Portugal, M.T., (2001) Adenosine triphosphate and diadenosine pentaphosphate induce  $[Ca^{2+}]_i$  increase in rat basal ganglia aminergic terminals. *J. Neurosci. Res.* 64, 174–182.
- Gomez-Cabrero, A., Comes, N., Gonzalez-Linares, J., De Lapuente, J., Borrás, M., Pales, J., Gual, A., Gasull, X., Morales, M., 2005. Use of transduction proteins to target trabecular meshwork cells: outflow modulation by profiling I. *Mol. Vis.* 9, 1071–1082.
- Gupta H, Aqil M. (2012) Contact lenses in ocular therapeutics. *Drug Discov Today.* 17(9-10):522-527.
- Guzman-Aranguez A, Colligris B, Pintor J. (2012) Contact lenses: promising devices for ocular drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther.* 29(2):189-99.
- Hanne, H., Thoen, H.H., How, M.J., Chiou, T.H. and Marshall, J. (2014) A Different Form of Color Vision in Mantis Shrimp. *Science* 343, 411-413.
- Harding J (1991) *Cataract: biochemistry, epidemiology and pharmacology.* London, UK: Chapman & Hall.
- Ho, A., Schwarze, S.R., Mermelstein, S.J., Waksman, G., Dowdy, S.F. (2001) Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 61, 474–477.
- Hoyle, C. H. V., Peral, A., & Pintor, J. (2006). Melatonin potentiates tear secretion induced by diadenosine tetraphosphate in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 552, 159-161.
- Hunt, D.M., Dulait, K. S., Bowmaker, J. K. and Mollon, J.D. (1995) The Chemistry of John Dalton Color's Blindness. *Science*, 267, 984-988.
- Jain MR. (1988) Drug delivery through soft contact lenses. *Br J Ophthalmol.* 72:150-154.
- Jedziniak JA, Chylack LT Jr, Cheng HM, Gillis MK, Kalustian AA, et al. (1981) The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 314-326.
- Jedziniak JA, Yates EM, Kinoshita JH (1973) Lens polyol dehydrogenase. *Exp Eye Res* 16: 95-104.
- Jimenez, A., Sesto, A., Pintor, J., Mediero, A., Peral, A., (2007)  $Na^+/K^+$  ATPase: a new target for treating ocular hypertension by RNAi. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Abstract 4809/B100.
- Jumblatt JE and Jumblatt MM (1998) Regulation of ocular mucin secretion by P2Y2 nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva. *Exp Eye Res* 67:341–346.

- Karampatakis V, Karamitsos A, Skriapa A, Pasiadis G. (2010) Comparison between normal values of 2- and 5-minute Schirmer test without anesthesia. *Cornea*. 29:497-501.
- Karlgard CC, Wong NS, Jones LW, Moresoli C. (2003) In vitro uptake and release studies of ocular pharmaceutical agents by siliconcontaining and p-HEMA hydrogel contact lens materials. *Int J Pharm*. 257(12):141-151.
- Kennerdell, J.R., Carthew, R.W., (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95,1017–1026.
- Kim J, Chauhan A. (2008) Dexamethasone transport and ocular delivery from poly(hydroxyethyl methacrylate) gels. *Int J Pharm*. 353(1-2):205-222.
- Kim J, Conway A, Chauhan A. (2008) Extended delivery of ophthalmic drugs by silicone hydrogel contact lenses. *Biomaterials*. 29:2259-2269.
- Kinoshita JH (1955) Carbohydrate metabolism of lens. *AMA Arch Ophthalmol* 54: 360-368.
- Kleinlogel, S. and White, A.G. (2008) The Secret World of Shrimps: Polarisation Vision at Its Best. *Plos One*, 2 (5), e2190.
- Kompella UB, Kadam RS, Lee VH. (2010) Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv*. 1:435-456.
- Koskela, T., Brubaker, R.F., (1991) The nocturnal suppression of aqueous humor flow in humans is not blocked by bright light. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 32, 2504–2506.
- L. Barsanti, V. Passarelli, P.L. Walne, P. Gualtieri, (1997) In vivo photocycle of the *Euglena gracilis* photoreceptor, *Biophys. J*. 72, 545–553.
- Lang JC. (1995) Ocular drug-delivery conventional ocular formulations. *Adv Drug Deliv Rev*. 16:39-43.
- Lazarowski ER. (2010) Quantification of extracellular UDP-galactose. *Anal Biochem*. 396:23-29.
- Lee, D.A., Higginbotham, E.J., (2005) Glaucoma and its treatment: a review. *Am. J. Health-Syst. Pharm*. 62, 691–699.
- Leiblum SR, Hayes RD, Wanser RA, et al. Vaginal dryness: a comparison of prevalence and interventions in 11 countries. *J Sex Med* 2009;6(9):2425–2433.
- Lerner, A. B., Case, J. D., & Heinzelman, R. V. (1959). Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* 81, 6084–6085.

- Li CC, Chauhan A. (2007) Ocular transport model for ophthalmic delivery of timolol through p-HEMA contact lenses. *J Drug Deliv Sci Technol.* 17:69-79.
- Li CC, Chauhan A. (2006) Modeling ophthalmic drug delivery by soaked contact lenses. *Ind Eng Chem Res.* 45:3718-3734.
- Li Y, Kuang K, Yerxa B, Wen Q, Rosskothan H, and Fischbarg J (2001b) Rabbit conjunctival epithelium transports fluid, and P2Y<sub>2</sub> receptor agonists stimulate Cl<sup>-</sup> and fluid secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C595–C602.
- Lincoln, G.A., Almeida, O.F., Arendt, J., (1981) Role of melatonin and circadian rhythms in seasonal reproduction in rams. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 30, 23–31.
- Liu, J.H., Dacus, A.C., (1991) Endogenous hormonal changes and circadian elevation of intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 496–500.
- Lohmann, J.U., Endl, I., Bosch, T.C., (1999) Silencing of developmental genes in Hydra. *Dev. Biol.* 214, 211–214.
- Martin-Gil A, de Lara MJ, Crooke A, Santano C, Peral A, Pintor J. (2012) Silencing of P2Y<sub>2</sub> receptors reduces intraocular pressure in New Zealand rabbits. *Br J Pharmacol.* 165(4b):1163-1172.
- Martin, X.D., Malina, H.Z., Brennan, M.C., Hendrickson, P.H., Lichter, P.R., (1992) The ciliary body—the third organ found to synthesize indoleamines in humans. *Eur. J. Ophthalmol.* 2, 67–72.
- Maurice D. (1995) The effect of the low blink rate in rabbits on topical drug penetration. *J Ocul Pharmacol Ther Fall.* 11:297-304.
- Mayo, J.C., Sainz, R.M., Uria, H., Antolin, I., Esteban, M.M., Rodriguez, C., (1998) Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J. Pineal Res.* 24, 179–192.
- McNamara NA, Polse KA, Brand RJ, Graham AD, Chan JS, McKenney CD. (1999) Tear mixing under a soft contact lens: effects of lens diameter. *Am J Ophthalmol.* 127:659-665.
- Merriman-Smith BR, Krushinsky A, Kistler J, Donaldson PJ (2003) Expression patterns for glucose transporters GLUT1 and GLUT3 in the normal rat lens and in models of diabetic cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3458-3466.
- Meyer, P., Pache, M., Loeffler, K. U., Brydon, L., Jockers, R., Flammer, J., et al. (2002). Melatonin MT-1 receptor immunoreactivity in the human eye. *Br J Ophthalmol* 86, 1053–1057.

- Mitchell, C.H., Carre, D.A., McGlinn, A.M., Stone, R.A., Civan, M.M., (1998) A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7174–7178.
- Morales M, Gómez-Cabrero A, Peral A, Gasull X, Pintor J. (2007) Hypotensive effect of profilin on rabbit intraocular pressure. *Eur J Pharmacol.* 567(1-2):145-148.
- Moss SE, Klein R, Klein BE. Long-term incidence of dry eye in an older population. *Optom Vis Sci* 2008;85(8):668–674.
- Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, and Nakata K (2000) P2Y2 receptor stimulation increases tear fluid secretion in rabbits. *Curr Eye Res* 21:782–787.
- Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, and Nakata K (2003) P2Y2 receptor elicits PAS-positive glycoprotein secretion from rabbit conjunctival goblet cells in vivo. *J Ocul Pharmacol Ther* 19:345–352.
- Murube J (2012) The origin of tears. II. The mucinic component in the XIX and XX centuries. *Ocul Surf* 10:126–136.
- Nakamura M, Imanaka T, Sakamoto A. (2012) Diquafosol ophthalmic solution for dry eye treatment. *Adv Ther.* 29:579-589.
- Nakamura, H., Siddiqui, S.S., Shen, X., Malik, A.B., Pulido, J.S., Kumar, N.M., Yue, B.Y., (2004) RNA interference targeting transforming growth factor-beta type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol. Vis.* 10, 703–711.
- Neitz, J. and Neitz, M. (2011) The genetics of normal and defective color vision. *Vis Res* 51(7):633-651.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K., Ullu, E., (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14687–14692.
- Nichols KK, Yerxa B, and Kellerman DJ (2004) Diquafosol tetrasodium: a novel dry eye therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 13:47–54.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275, 31311–31317.
- Nucci, C., Tartaglione, R., Cerulli, A., Mancino, R., Spanú, A., Cavaliere, F., Rombolà, L., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Morrone, L.A., et al., (2007) Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat. *International Review of Neurobiology*, vol. 82. Academic Press, pp. 397–406.

- Nykanen A, Haley B, Zamore PD (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-321.
- Nykänen, A., Haley, B., Zamore, P.D., (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309–321.
- Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D., DeRobertis, E.M., (2007) The evolutionarily conserved BMP-binding protein twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405, 757–763.
- Osborne, N.N., Chidlow, G., (1994) The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye. *Exp. Eye Res.* 59, 3–9.
- Osborne, N.N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J.H., Wood, J.P., Nash, M.S. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 43 (1), S102–S128.
- Pappolla, M.A., Chyan, Y.J., Poeggeler, B., Bozner, P., Ghiso, J., LeDoux, S.P., et al., (1999) Alzheimer beta protein mediated oxidative damage of mitochondrial DNA: prevention by melatonin. *J. Pineal Res.* 27, 226–229.
- Peng CC, Ben-Shlomo A, Mackay EO, Plummer CE, Chauhan A. (2012) Drug delivery by contact lens in spontaneously glaucomatous dogs. *Curr Eye Res.* 37:204-211.
- Peng CC, Burke MT, Carbia BE, Plummer C, Chauhan A. (2012) Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy. *J Control Rel.* 162:152-158.
- Peng CC, Chauhan A. (2011) Extended cyclosporine delivery by silicone-hydrogel contact lenses. *J Control Rel.* 154:267-274.
- Peral A, Carracedo G, Acosta MC, Gallar J, Pintor J.(2006). Increased levels of diadenosine polyphosphates in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:4053-4058.
- Peral A, Dominguez-Godinez CO, Carracedo G, Pintor J. (2008) Therapeutic targets in dry eye syndrome. *Drug News Perspect.* 21:166-176.
- Peral A, Gallar J, Pintor J. (2009) Adenine nucleotide effect on intraocular pressure: Involvement of the parasympathetic nervous system. *Exp Eye Res.* 89(1):63-70.
- Peral A, Loma P, Yerxa B, and Pintor J (2008) Topical application of nucleotides increase lysozyme levels in tears. *Clin Ophthalmol* 2:261–267.
- Peral, A., Loma, P., Mediero, A., Sesto, A., Pintor, J., Jimenez, A.I., (2007) Effect of several siRNA in the treatment of ocular hypertension and glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4808.

- Pereira, M.F., Hernandez, M.D., Pintor, J., Miras-Portugal, M.T., Cunha, R.A., Ribeiro, J.A., (2000) Diadenosine polyphosphates facilitate the evoked release of acetylcholine from rat hippocampal nerve terminals. *Brain Res.* 879, 50–54.
- Peterson, J.A., Tian, B., Bershady, A.D., Volberg, T., Gangnon, R.E., Spector, I., Gieger, B., Kaufman, P.I. (1999) Latrunculin-A increases outflow facility in the monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 931–941.
- Peterson, J.A., Tian, B., Geiger, B., Kaufman, P.L. (2000). Effect of latrunculin-B on outflow facility in monkeys. *Exp. Eye Res* 70, 307–313.
- Phan CM, Subbaraman LN, Jones L. (2013) In vitro uptake and release of natamycin from conventional and silicone hydrogel contact lens materials. *Eye Contact Lens.* 39:162-168.
- Pintor J (2007) A molecular marker for dry eye. *Arch Soc Esp Oftalmol* 82:129–130.
- Pintor J, Bautista A, Carracedo G, Peral A. (2004) UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea. *Ophthalmic Physiol Opt.* 24:186-193.
- Pintor J, King BF, Ziganshin AU, Miras-Portugal MT, Burnstock G. (1996) Diadenosine polyphosphate-activated inward and outward currents in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *Life Sci.* 59:PL179-PL184.
- Pintor J, Peral A, Hoyle CH, et al. (2002b) Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:291-297.
- Pintor J, Peral A, Hoyle CH, Redick C, Douglass J, Sims I, and Yerxa B (2002b) Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand White rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 300:291–297.
- Pintor J, Peral A, Pelaez T, Carracedo G, Bautista A, and Hoyle CHV (2003a) Nucleotides and dinucleotides in ocular physiology: new possibilities of nucleotides as therapeutic agents in the eye. *Drug Dev Res* 59:136–145.
- Pintor, J. J., Carracedo, G., Mediero, A., Guzman-Aranguéz, A., Irazu, M., Pelaez, T., et al. (2005). Melatonin increases the rate of corneal re-epithelialisation in New Zealand white rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, A2152.
- Pintor, J., (2003) Nucleotides as a new alternative for the treatment of ocular hypertension. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 78, 295–296.
- Pintor, J., Diaz-Rey, M.A., Torres, M., Miras-Portugal, M.T., (1992) Presence of diadenosine polyphosphates—Ap4A and Ap5A—in rat brain synaptic

- terminals. Ca<sup>2+</sup> dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci. Lett.* 136, 141–144.
- Pintor, J., Martin, L., Pelaez, T., Hoyle, C.H., Peral, A., (2001) Involvement of melatonin MT (3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 416, 251–254.
- Pintor, J., Peláez, T., Hoyle, C.H., Peral, A., (2003c) Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 138, 831–836.
- Pintor, J., Peral, A., (2001) Therapeutic potential of nucleotides in the eye. *Drug Dev. Res.* 52, 190–195.
- Pintor, J., Peral, A., Pelaez, T., Carracedo, G., Bautista, A., Hoyle, C.H.V., (2003a) Nucleotides and dinucleotides in ocular physiology: new possibilities of nucleotides as therapeutic agents in the eye. *Drug Dev. Res.* 59 (1), 136–145.
- Pintor, J., Peral, A., Pelaez, T., Martin, S., Hoyle, C.H.V., (2003b) Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 342–348.
- Pintor, J.J., Mediero, A., Jimenez, A., Sesto, A., Gonzalez de Buitrago, G., Peral, A., (2006) siRNA in the treatment of ocular hypertension targeting alpha and beta adrenoceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Abstract 403/B61.
- Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Bowman Vance V (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9: 859-868.
- Pruss, G., Ge, X., shi, X.M., Carrington, J.C., Vance, V.B., (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9, 1749–1759.
- Rada, J. A., & Wiechmann, A. F. (2006). Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 25–33.
- Rawas-Qalaji M, Williams CA. (2012) Advances in ocular drug delivery. *Curr Eye Res.* 37:345-356.
- Reich, S.J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A.M., Bennett, J., Tolentino, M.J., (2003) Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.* 9, 210–216.

- Reiss, G.R., Lee, D.A., Topper, J.E., Brubaker, R.F., (1984) Aqueous humor flow during sleep. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 776–778.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Cabrera, J., D’Arpa, D., Sainz, R.M., Mayo, J.C., et al., (1999) The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol. Signals Recept.* 8, 56–63.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T., (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177–1185.
- Roca, A.L., Godson, C., Weaver, D.R., Reppert, S.M., (1996) Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology* 137, 3469–3477.
- Samples, J.R., Krause, G., Lewy, A.J., (1988) Effect of melatonin on intraocular pressure. *Curr. Eye Res.* 7, 649–653.
- Sasaki M, Masuda A, Oishi T (1995). Circadian rhythms of corneal mitotic rate, retinal melatonin and immunoreactive visual pigments, and the effects of melatonin on the rhythms in the Japanese quail. *J Comp Physiol A*;176:465–471.
- Scheuer CA, Fridman KM, Barniak VL, Burke SE, Venkatesh S. (2010) Retention of conditioning agent hyaluronan on hydrogel contact lenses. *Cont Lens Anterior Eye.* 33(Suppl 1):S2-S6.
- Schultz CL, Morck DW. (2010) Contact lenses as a drug delivery device for epidermal growth factor in the treatment of ocular wounds. *Clin Exp Optom.* 93:61-65.
- Schultz CL, Poling TR, Mint JO. (2009) A medical device/drug delivery system for treatment of glaucoma. *Clin Exp Optom.* 92:343-348.
- Schwartz, G.F., Reardon, G., Mozaffari, E., (2004) Persistency with latanoprost or timolol in primary open-angle glaucoma suspects. *Am. J. Ophthalmol.* 137 (1 Suppl), S13–S16.
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., Dowdy, S.F. (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569–1572.
- Serle, J.B., Wang, R.F., Peterson, W.M., Plourde, R., Yerxa, B.R., (2004) Effect of 5-MCA-NAT, a putative melatonin MT3 receptor agonist, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes. *J. Glaucoma* 13, 385–388.
- Shen, J., Samul, R., Silva, R.L., Akiyama, H., Liu, H., Saishin, Y., Hackett, S.F., Zinnen, S., Kossen, K., Fosnaugh, K., Vargeese, C., Gomez, A., Bouhana,

- K., Aitchison, R., Pavco, P., Campochiaro, P.A., (2006) Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther.* 13, 225–234.
- Shuey DJ, McCallus DE, Giordano T (2002) RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov Today* 7: 1040-1046.
- Shuey, D.J., McCallus, D.E., Giordano, T., (2002) RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov. Today* 7, 1040–1046.
- Soluri A, Hui A, Jones L. (2012) Delivery of ketotifen fumarate by commercial contact lens materials. *Optom Vis Sci.* 89:1140-1149.
- Soto, D., Pintor, J., Peral, A., Gual, A., Gasull, X., (2005) Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1042–1051.
- Srinivas SP, Mutharasan R, and Fleiszig S (2002) Shear-induced ATP release by cultured rabbit corneal epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 506 (Pt A): 677–685.
- Tieppo A, White CJ, Paine AC, Voyles ML, McBride MK, Byrne ME. (2012) Sustained in vivo release from imprinted therapeutic contact lenses. *J Control Rel.* 157:391-397.
- To, C.H., Kong, C.W., Chan, C.Y., Shahidullah, M., Do, C.W., (2002) The mechanism of aqueous humour formation. *Clin. Exp. Optom.* 85, 335–349.
- Tsai, J.C., Kanner, E.M., (2005) Current and emerging medical therapies for glaucoma. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 10, 109–118.
- Tsubota K, Hata S, Okusawa Y, Egami F, Ohtsuki T, and Nakamori K (1996) Quantitative videographic analysis of blinking in normal subjects and patients with dry eye. *Arch Ophthalmol* 114:715–720.
- Uva, M.G., Longo, A., Reibaldi, M., Reibaldi, A. (2006) The effect of timolol-dorzolamide and timolol-pilocarpine combinations on ocular blood flow in patients with glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 141, 1158–1160.
- van Bijsterveld OP. (1969) Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol.* 82:10-14.
- Van der Krol, A.R., Mur, L.A., de Lange, P., Mol, J.N., Stuitje, A.R., (1990) Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol. Biol.* 14, 457–466.
- Vaughan, G.M., Reiter, R.J., (1986) Pineal dependence of the Syrian hamster's nocturnal serum melatonin surge. *J. Pineal Res.* 3, 9–14.

- Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH (2008) Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res* 27: 420-433.
- Viso E, Rodriguez-Ares MT, Gude F. Prevalence of and associated factors for dry eye in a Spanish adult population (the Salnes Eye Study). *Ophthalmic Epidemiol* 2009;16(1):15–21.
- Von Gall, C., Stehle, J. H., & Weaver, D. R. (2002). Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309, 151–162.
- Wahl C, Li T, Takagi Y, Howland H (2011). The effects of light regimes and hormones on corneal growth in vivo and in organ culture. *J Anat*; 219: 766–775.
- Wargelius, A., Ellingsen, S., Fjose, A., (1999) Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 156–161.
- White CJ, Byrne ME. (2010) Molecularly imprinted therapeutic contact lenses. *Expert Opin Drug Deliv.* 7:765-780.
- White CJ, McBride MK, Pate KM, Tieppo A, Byrne ME. (2011) Extended release of high molecular weight hydroxypropyl methylcellulose from molecularly imprinted, extended wear silicone hydrogel contact lenses. *Biomaterials.* 32:5698-5705.
- Wianny, F., Zernicka-Goetz, M., (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70–75.
- Wiechmann, A. F., & Rada, J. A. (2003). Melatonin receptor expression in the cornea and sclera. *Exp Eye Res* 77, 219–225.
- Wiechmann, A.F., Wirsig-Wiechmann, C.R., (2001) Melatonin receptor mRNA and protein expression in *Xenopus laevis* nonpigmented ciliary epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 73, 617–623.
- Winkler BS, Riley MV (1991) Relative contributions of epithelial cells and fibers to rabbit lens ATP content and glycolysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2593- 2598.
- Witke, W. (2004) The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends. Cell Biol.* 14, 461–469.
- Xinming L, Yingde C, Lloyd AW, et al. (2008) Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: a review. *Cont Lens Anterior Eye.* 31:57-64.

- Xu J, Li X, Sun F. (2011) In vitro and in vivo evaluation of ketotifen fumarate-loaded silicone hydrogel contact lenses for ocular drug delivery. *Drug Deliv.* 18:150-158.
- Yu, H.S., Yee, R.W., Howes, K.A., Reiter, R.J., (1990) Diurnal rhythms of immunoreactive melatonin in the aqueous humor and serum of male pigmented rabbits. *Neurosci. Lett.* 116, 309–314.
- Zhang, A., Jian, Ge Li., Reigada, D., Laties, A.M., Mitchell, C.H., (2007) Acute increase of intraocular pressure releases ATP into the anterior chamber. *Exp. Eye Res.* 85 (5), 637–643.
- Zimmermann, H., (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17, 420–426.



CONTESTACIÓN DE LA EXCMA. SRA. DOÑA M<sup>a</sup> TERESA  
MIRAS PORTUGAL AL DISCURSO DE INGRESO  
COMO ACADÉMICO DE NÚMERO  
DEL EXCMO. SR. D. JESÚS J. PINTOR JUST

LEÍDO EL 6 DE NOVIEMBRE DE 2014

EN LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA, MADRID.



*Excmo. Sr. Presidente,*  
*Excmas. y Excmos. Señoras y Señores Académicos,*  
*Señoras y Señores,*

Como miembro de esta Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España me cabe hoy, y ahora, el privilegiado encargo de contestar al discurso de ingreso como Académico de Número, en tan docta corporación, del Doctor Jesús Pintor Just, elegido en Junta General el día 19 de diciembre de 2013 para ocupar la medalla número 36, en la que tan honrosamente le precedió el Excmo. Académico don Gaspar Gonzalez. Me resulta especialmente gratificante este honroso cometido pues aunque la brillante personalidad y logros científicos y académicos del Dr. Pintor Just son de sobra conocidos por los aquí presentes, este acto me permite resaltar los méritos que avalan su trayectoria vital y profesional, que me propongo sean absolutamente exactos, aun a sabiendas de mi afecto. De igual modo no quisiera que estas palabras se interpreten como un encargo rutinario, pues son profundamente sentidas.

### **Su trayectoria vital.**

Permítanme mencionar algunos datos de la biografía del Dr. Pintor Just. Nació en Vigo el 26 de diciembre de 1964. No es de extrañar que uno de sus poetas predilectos sea Martin Codax y especialmente su poema *¿Ondas do mar de Vigo, se vistes meu amigo?* Sus padres Jesús Pintor y Maria José Just, y su hermano Luis lo rodearon de cariño y afecto. Siempre fueron conscientes de su vocación por la ciencia y siempre se mostraron orgullosos de él. Mencionaré, además, que su padre empleado de banca, es también un apasionado de la historia del cine, a quien recurren los cinéfilos en busca de información. La vena familiar de la química y la farmacia le viene por vía materna y se remonta a su bisabuelo que fue químico-farmacéutico en Madrid y regentó la farmacia de la calle Serrano esquina con la calle Padilla a principios del siglo XX, despla-

zándose entre los años 1920-30 a Santander donde fue el Director Técnico del Laboratorio Farmacéutico, Pérez del Molino.

Todos los amigos y compañeros del Dr. Pintor destacan entre sus muchas cualidades su afabilidad y facilidad para hacer amistades y conservarlas a lo largo de muchos años. Esta característica le viene desde muy temprana edad, de alguna de ellas he tenido conocimiento en mi refugio galaico, en Carballiño, cuando el Dr. Pintor realiza alguna visita veraniega acompañado de su “peña de Vigo”. Descubrí que esta indestructible hermandad se fraguó durante su etapa de educación infantil, antes denominado parvulario, en el Colegio Alemán de Vigo del que conserva la mayoría de sus amigos en la actualidad.

Siguiendo su trayectoria, es en tercer curso de bachillerato, BUP, cuando descubre la Bioquímica como una disciplina fascinante para explicar cómo es la vida, y surge el embrión de su vocación científica. Lo que de nuevo nos confirma la importancia que tiene una educación secundaria de calidad.

Inicia sus estudios de la licenciatura de Biología en la Universidad de Vigo y tiene la suerte de ser alumno de un excepcional profesor de bioquímica, el químico orgánico Antonio Ibáñez Paniello, quien orienta definitivamente su vocación hacia la Bioquímica. La universidad de Vigo por aquel entonces no tenía la especialidad de Bioquímica y al finalizar tercer curso consigue convencer a su padre para venir a Madrid. Viene a la Universidad Complutense para hacer 4º y 5º y se encuentra que no hay equivalencia de planes de estudio, entre Galicia y Madrid, y tiene que cursar al mismo tiempo asignaturas de primer curso que se impartían entre las facultades de Química y Biología. Es fácil de imaginar la dificultad añadida, con el auténtico lio de aulas, facultades y asignaturas. Lo que nos hace reflexionar sobre la necesidad de armonizar planes de estudio y contenidos curriculares sin dejarlos al arbitrio de cada Universidad, sobre todo ahora que estamos en Europa.

Mientras realiza sus estudios de licenciatura se incorpora como alumno interno al laboratorio del departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV que por aquel entonces yo dirigía. Me lo envió el Profesor Gavilanes, con una recomendación, *“es trabajador, es inteligente, tiene mucha imaginación, está ansioso por trabajar en un laboratorio, pero contrólalo”*. En efecto, el Dr. Pintor, Suso, se incorporó de inmediato al laboratorio, se apasionó por las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, midiendo con técnicas de gran nivel y precisión las actividades enzimáticas de ecto-nucleotidasas, enzimas de la cara externa de la membrana plasmática, que por entonces nadie estudiaba y eran unas desconocidas. Señalar que era un virtuoso de los cromatogramas, siendo los más perfectos que había visto jamás. Cuidadoso, perfeccionista, poniendo las manos al servicio de su inteligencia, la verdad es que era un diamante pulido.

No comprendí el significado de la palabra “contrólalo” que el Profesor Gavilanes había deslizado entre los múltiples elogios hasta un día de mayo en el que el joven investigador, Suso, tenía que realizar el examen de biotecnología, última asignatura de su licenciatura; tan absorto estaba con los resultados de sus experimentos que se olvidó por completo de asistir al examen. Seguramente todavía resuenan en sus oídos la larga serie de lindezas, algunas en gallego, que le dirigimos, con la consecuencia de que no podría volver a pisar el laboratorio hasta que no hubiera desecho el entuerto. Finaliza su licenciatura el 22 de Junio de 1989, precisamente el día del cumpleaños de su madre. El trabajo que estaba realizando, objeto de la regañina, era la primera publicación de su prolífica carrera investigadora, se envió a publicar un mes más tarde de finalizar su licenciatura, saliendo publicado al inicio del año siguiente, 1990, en los Archives of Biochemistry and Biophysics , siendo el primer autor.

Realiza la Tesis Doctoral con una beca del plan de formación de profesorado, procediendo a su lectura el día 27 de septiembre de 1993, exactamente 13 años antes de que naciera su hijo Javier. Su tesis fue calificada de sobresaliente *cum laude* y lleva por título: *Los diadenosina polifosfatos nuevos transmisores del sistema purinérgico: localización, receptores y función*. El trabajo presentado era una reorganización del contenido de 12 artículos publicados en revistas internacionales de los cuales era primer autor en nueve de ellos y datos adicionales no publicados que se enviaron posteriormente. Además antes de leer su tesis realizó dos estancias predoctorales, una en la Universidad Johann Wolfgang Goethe de Frankfurt, Alemania en 1990, con el Prof. Herbert Zimmermann y otra en el Bogomoletz Institute de Kiev, Ucrania en 1992 con el Profesor Oleg Krishtal de ambas estancias se publicaron trabajos de colaboración muy citados. Posiblemente Bach influyó en su productividad y en la armonía de sus resultados ya que solía realizar sus experimentos mezclados con los acordes de los grandes compositores del barroco y del romanticismo. Eso sí, a todo volumen y hasta bien entrada la noche. Excepto los días en que salía temprano para arbitrar, pues el Dr. Pintor era arbitro nacional e internacional de Hockey sobre hierba, que es un deporte por el que siente pasión y practicó desde 1980 hasta el año 2006 en que nace su hijo.

La etapa postdoctoral la realiza en el University College de Londres en 1994, con el profesor Geoffrey Burnstock, gracias a una beca para el extranjero de la Fundación Ramón Areces, que eran y son de las más elitistas y exigentes de este país. Este fue su primer contacto con la fundación de la que se puede considerar casi un hijo adoptivo. Fue una etapa muy fructífera del Dr. Pintor, no solamente por la abundante producción científica, siete publicaciones internacionales firmadas con el Padre Fundador del Área Purinérgica, el Profesor Geoffrey Burnstock, sino también porque fue capaz de montar y hacer funcionar

todos los equipos de HPLC y otros muchos del Instituto de Investigación del University College. Con esto afirmo, que es además un manitas capaz de poner en funcionamiento los equipos más complejos y hacerles un pequeño “apaño” para adaptarlos a nuevas técnicas, o como es el caso más reciente reinventarlos para superar las precarias economías de tiempos de crisis. Claro está que este valor añadido se convierte en indispensable para todo laboratorio innovador. Durante su estancia londinense, sigue practicando deporte y ejerciendo de árbitro de hockey siendo muy solicitado, pues por su forma de ser se convirtió en indispensable para arbitrar los partidos entre pakistaníes, hindúes o entre diferentes etnias o creencias religiosas. Lo cual vista la situación actual debería de ser considerado como un mérito y virtud indispensable para mediar en situaciones delicadas.

Antes de destacar su trayectoria docente e investigadora permítanme destacar otro aspecto, se casó en 1998 con Asunción Peral, que le ayudaría a formar el grupo de la por aquel entonces Escuela de Óptica y Optometría, tan productivo e importante en farmacología y fisiopatología ocular y madre de su hijo Javier. Se fueron de viaje de novios a Jordania, visitando Petra y otras muchas ruinas, pues el Dr. Pintor es un apasionado del arte y la cultura de Mesopotamia, con todas las civilizaciones que ahí han florecido. Una de las ilusiones y deseos que le faltan por cumplir es poder visitar el zigurat de Ur. Aún conservo una pequeña tablilla de arcilla que me regalaron, que se supone es el primer alfabeto, y ahora cuando la tengo entre mis manos, desearía de todo corazón que la ilusión del Dr. Pintor se cumpla pues supondría que todavía podremos disfrutar en el futuro de las construcciones de esas poderosas civilizaciones que entre unos y otros están destruyendo sin piedad, sin tener en cuenta que son: la cuna de la transcripción alfabética, de las matemáticas, de las leyes escritas, de la predicción de los ciclos naturales con la observación de las estrellas, del origen de nuestra agricultura y ganadería y de las aleaciones de metales, además del hierro. Un cierto paralelismo existe en la Canción a las Ruinas de Itálica de Rodrigo Caro:

*Estos, Fabio, ¡ay dolor!, que ves ahora  
campos de soledad, mustio collado,  
fueron un tiempo Itálica famosa.*

.....

*¡oh fábula del tiempo, representa  
cuánta fue su grandeza y es su estrago!*

.....

Los pensamientos de nostalgia le duran poco al Dr. Pintor, pues es una persona vitalista, se enfrenta de cara a los problemas y me admira porque siempre conecta con la gente y piensa en positivo de todos los seres humanos. Así, unida a su pasión por la historia antigua, le gusta la literatura fantástica y de modo especial Julio Verne, sin olvidar que sus poetas predilectos, debía de haber dicho poetisas son Rosalía y la que fue su profesora de literatura en bachillerato, Luz Pozo, actualmente miembro de la Academia de Galicia. Sin olvidar que se ha reciclado en literatura infantil, pues disfruta contándole cuentos a su hijo y llevándolo a todo tipo de exposiciones, sobre todo de aviones y barcos, en los que se ha convertido en un experto, sin olvidar el manejo del pequeño microscopio que le ha regalado.

Al Dr. Pintor no se le puede aplicar el verso de Rosalía: *No subas tan alto, pensamiento loco*, pues todo lo que piensa tiene la virtud de convertirlo en algo real y seguramente apasionante. Es un optimizador nato y capaz de convertir algún laboratorio que bien podría ser un desierto, en un espléndido vergel. El Dr. Pintor no se queja, se pone manos a la obra, afila las neuronas y construye.

No quiero dejar pasar una faceta importante del Dr. Pintor, su exquisito sentido de la estética. Muchos de Ustedes lo habrán constatado en las conferencias que ha impartido en esta Real Academia. Puedo asegurarles que en los congresos internacionales nadie se olvida de asistir a las conferencias de Suso, así le llaman todos, pues van a disfrutar de la buena ciencia, bien envuelta y con comprensión asegurada, ya que es un excelente comunicador. Lo mismo ocurre en sus clases del día a día docente, o en las ilustraciones para sus artículos científicos. La estética es un valor añadido y si acompaña a la buena ciencia la hace más atractiva y se difunde mejor.

Finalizo este apartado señalando que el Dr. Pintor es actualmente Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la nueva Facultad de Óptica y Optometría y es muy aleccionador seguir los pasos de su actividad docente e investigadora que desarrollaré en el próximo capítulo.

## **Comentarios a su actividad docente e investigadora.**

### *Méritos docentes*

El Dr. Pintor es un docente excepcional que entusiasma a sus alumnos y ha recorrido todos los estamentos de la carrera docente, desde ayudante a catedrático.

Cuando finaliza su tesis doctoral en 1993, obtiene una plaza de profesor ayudante en la entonces Escuela de Óptica y Optometría que durará hasta

1995, pues era una sección del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV. En 1998 obtiene un puesto de Profesor asociado a tiempo completo. En 2002 obtiene por oposición la plaza de Profesor titular de la Escuela Universitaria de Óptica, y en 2005 Profesor Titular de Universidad. En esta etapa le nombran Subdirector de la Escuela de Óptica y Optometría y dedica un gran esfuerzo a conseguir nuevos espacios de investigación acondicionados y modernos, que cuajaron como excelentes laboratorios de investigación, lo que consigue a través de Fondos FEDER. Otro de sus grandes objetivos en esta etapa fue tratar de conseguir que la titulación se homologara a las titulaciones europeas e impartiera un master de calidad. Eran frecuentes sus viajes a todos los rincones de la Europa Comunitaria para armonizar con Bolonia, o conseguir que las reuniones se celebraran aquí. Lo consiguió, hoy día en su centro se imparte el grado, un master de calidad e instalaciones adecuadas con buenos laboratorios de investigación, donde se han leído múltiples tesis, y los doctorandos proceden de muy diferentes partes del mundo. Resueltas todas esas batallas con éxito, actualmente ya no es la Escuela sino la Facultad de Óptica y Optometría de la UCM, de la que es Catedrático desde 2011.

En estos 21 años de docencia ininterrumpida, el Dr. Pintor, ha impartido 18 asignaturas diferentes, entre grado, postgrado, master y doctorados. Un apartado importante de su labor docente ha sido y es la dirección de tesis doctorales, habiendo dirigido 14, junto con trabajos fin de carrera y de master, y en la actualidad está dirigiendo otras 3, teniendo doctorandos de otros países y continentes. El Dr. Pintor es el clásico docente/ investigador que no comprende la investigación separada de la docencia y de la necesidad de transmitirla, pues nuestra ciencia es algo vivo y palpitante que avanza a la velocidad en que cuaja el pensamiento en experimentos concretos. Este aspecto de la velocidad a la que avanza la ciencia la dejó reflejada un decano de la facultad de medicina de Harvard, cuando en el discurso de graduación a los nuevos profesionales les exhortó a seguir estudiando y en contacto con los avances de su profesión, con las siguientes palabras: *No olvidéis que la mitad de lo que os hemos enseñado es falso, pero no sabemos de qué mitad se trata.* Yo añadiría, que esto es absolutamente cierto pues desconocemos los escenarios futuros en que desarrollaremos la actividad profesional y esos cambios aunque paulatinos requieren de nuevos conocimientos y de adaptación. Este proceso necesita cómplices, en el mejor sentido de la palabra, que no son otros que docentes investigadores ilusionados y capaces de otear el futuro.

### *Méritos investigadores*

Resumir el Currículo investigador del Dr. Pintor no es tarea fácil. Ilustrar con algunos números los principales méritos recogidos en su currículo

es un punto de partida, pero las cifras y números, aunque valiosos, no dan una idea exacta del valor de sus hallazgos y méritos:

Ha sido y es investigador principal de 15 proyectos de investigación competitiva a nivel nacional e internacional y de otros 15 en proyectos nacionales e internacionales competitivos, como miembro del equipo investigador.

Ha sido y es investigador principal de 14 convenios nacionales e internacionales de desarrollo de proyectos innovadores. El primer contrato lo firmó en el año 2000, con el laboratorio farmacéutico americano –Inspire Pharmaceuticals– titulado: *New substances lowering intraocular pressure: novel compounds for the treatment of ocular hypertension*, con una duración de tres años y una cuantía de 300.000 euros de la época. Desde entonces ha firmado otros muchos, siempre asociados al desarrollo de alguna de las múltiples patentes registradas. Ya que es cada vez más importante poner en valor las ideas y los descubrimientos realizados, y el Dr. Pintor es consciente de ello. Este es el motivo de patentar sus descubrimientos, o bien el *modus operandi* conocido actualmente como “*know-how*”. En la actualidad alcanzan un número de 22, y de ellas 8 son patentes mundiales. La última todavía en liza es la administración de ciertos fármacos para el tratamiento de glaucoma, u otras patologías oculares, mediante las lentes de contacto con liberación retardada.

En los 24 años de carrera investigadora, que abarcan desde 1990 hasta 2014, las publicaciones científicas alcanzan un total 181 en revistas internacionales indexadas y 22 capítulos de libros, que han recibido un total de 3.250 citas y resultan en un índice de Hirsch de 34, lo que es un valor muy alto para cualquier investigador y cuanto más si todavía no ha cumplido los 50 años.

Creo que el Dr. Pintor ha hecho suya la frase de José Ortega y Gasset: “*Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión*” y participa plenamente en el debate de la ciencia a alto nivel en todos los foros nacionales e internacionales. Por ese motivo, sus publicaciones están recogidas en las mejores revistas de su especialidad y pertenecen en su inmensa mayoría al primer cuartil o primer decil. Así en el área de Farmacología son numerosas sus publicaciones en el *British Journal of Pharmacology*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *European Journal of Pharmacology*, *Expert Opinion in Drug Discovery*, *Journal of Medicinal Chemistry*, *Current Medicinal Chemistry*, *Molecular Pharmacology*, *Neuropharmacology*, *Pharmacogenetics and Genomics*, *Pharmacology and Therapeutics*, etc. En el área de investigación Oftalmológica destacan las siguientes revistas, *Experimental Eye Research*, *Investigative Ophthalmology & Visual Sciences*, *Current Eye Research*, etc. En el área de Bioquímica y Neurociencias están entre otras, *Journal of Neurochemistry*, *Journal of Pineal Research*, *Purinergic Signaling*, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *Bone*, *Biochemical Pharmacology*, *Journal of Membrane Biology*, *Archives of Biochemistry*

and Biophysics, Life Sciences, FEBS Letters, Analytical Biochemistry, Neuroscience, Journal of Biological Chemistry, JBC, Diabetes, FASEB Journal, Journal of Physiology London, PlosOne etc...

La gran labor de investigación del Dr. Pintor se ha desarrollado en diferentes frentes. Al comienzo, en su etapa predoctoral y post-doctoral temprana, se centró en el estudio de los diadenosina polifosfatos que habían sido descubiertos en mi laboratorio unos años antes en vesículas neurosecretoras. El Dr. Pintor amplía y enriquece el área, pues demuestra su secreción de tejidos nerviosos y neuroendocrinos, su presencia en perfusión cerebral *in vivo* y la existencia de receptores presinápticos, en una serie de artículos que siguen siendo punto de partida y por lo tanto ampliamente citados. Al año siguiente de leer su tesis, en 1994, le conceden el premio de "*Honorary Young Lecturer*" de la European Society for Neurochemistry que además del diploma acreditativo, incluía la invitación con todos los gastos pagados para impartir una conferencia en el 10º Congreso de la European Society for Neurochemistry (ESN) que se celebró en Tel Aviv (Israel) (1994).

Los diadenosina polifosfatos le han seguido acompañando durante toda su carrera investigadora, hasta la actualidad, y siempre le han dado mucha suerte. Ha demostrado su presencia en la lágrima, sus patologías asociadas y sus poderosos efectos sobre la presión intraocular y la re-epitelización corneal. Posteriormente inicia y amplía las actividades de los dinucleótidos a otros receptores, de la familias ionotrópicas P2X y metabotrópicas P2Y, y las propiedades de estos receptores expresados en células transfectadas al disponer de las correspondientes construcciones en DNA plasmídicos. Una vez en la Escuela, ahora Facultad de Óptica y Optometría comienza el estudio sistemático de estos compuestos y asimila la secreción lacrimal con una cierta analogía a la secreción neural o neuroendocrina. En efecto los dinucleótidos y otros muchos nucleótidos son secretados en la lágrima y el Dr. Pintor fue poco a poco desvelando todo su potencial terapéutico y de diagnóstico, desde glaucoma 1998, al tratamiento de ojo seco 2000.

Inicia seguidamente una nueva área en donde asocia los diversos nucleótidos con la melatonina y sus derivados viendo los efectos sobre la re-epitelización corneal en el año 2002. En el año 2003 abre un nuevo frente con el estudio de la acondroplasia y distintas vías para abordar su tratamiento con aproximaciones muy originales. No desdeña las nuevas tecnologías como herramientas poderosas y aplica los RNA interferentes a los tratamientos de glaucoma, ojo seco etc... Es de destacar que todos estos resultados que cuajan en excelentes publicaciones, lo hacen también como patentes.

Resulta lógico que una persona tan emprendedora como el Dr. Pintor pronto viera la posibilidad de crear una empresa de base tecnológica sobre todo cuando en el año 2004 fue el Ganador del segundo Concurso de Ideas Spin-

Off de Investigación Madri+d en el área de biotecnología de la Comunidad de Madrid, para la creación de una empresa. El Título del proyecto fue: *“Asesoría de investigación farmacológica: al servicio de otras empresas”* (2004). En el año 2005 funda la compañía de base tecnológica OcuPharm Diagnostics, que proporciona servicios a universidades, centros de investigación y compañías biotecnológicas y farmacéuticas que sirven de apoyo a los estudios de ciencia básica y preclínicos relacionados con la evaluación de fármacos, estudios bioquímicos, farmacológicos y fisiológicos para el ojo y sus patologías. Entre sus principales clientes están el grupo de la Dra. Bilha Fisher de la Universidad Bar-Ilan y la Dra. Pnina Fishman de la compañía Can Fite Biopharma de Petach-Tivka, ambas en Israel. En ese mismo año 2005, entra como Académico correspondiente en la Real Academia Nacional de Farmacia, colaborando en todo momento y desarrollando su labor sin escatimar esfuerzo. A esto se suma que ha sido el Ganador del IV concurso de patentes de Madri+d por la Mejor Patente. Título del patente: *“Uso de nucleótidos y dinucleótidos para el tratamiento de infecciones en la superficie ocular”* (2007).

No he comentado que sus participaciones en congresos son muy numerosas y es un invitado constante en los congresos Internacionales Purinérgicos a impartir conferencias, como ha sido el caso de los de Japón 2012 y de Bonn 2014 y en todos los anteriores. Es un invitado en todos los congresos mundiales de ARVO que se celebran normalmente en Florida todos los años en el mes de Mayo, y donde se detallan los últimos avances en oftalmología. Otras muchas invitaciones a congresos de bioquímica, neurociencias y farmacología, son las que recibe el Dr. Pintor, por ello animo a los presentes a curiosear en su curriculum vitae, pues da una idea de su enorme esfuerzo, pero también del aprecio que profesan sus colegas al buen hacer y la buena ciencia que le acompañan.

Finalizaré diciendo que es evaluador y pertenece a diversos comités científicos nacionales e internacionales. Siendo Editor de la revista Purinergic Signalling desde su fundación y del Autonomic Nervous System y evaluador de la mayoría de revistas del área.

Como dicen los poetas gallegos del grupo Brétema (Niebla):

*quen mais semente, mais sega,  
quen mais segue, mais leva,  
o home que non traballe,  
lévalle o demo a colleita.*

El que más siembre más siega  
El que más siegue mas lleva  
El hombre que no trabaje  
Lleva el diablo su cosecha.

El Dr. Pintor es un sembrador de ideas, tiene el don de sembrar en el tiempo adecuado, no se detiene ante las dificultades y no renuncia nunca a recoger los frutos y darles el valor que merecen.

## Comentarios a su discurso de ingreso

En su discurso de ingreso el Dr. Jesús Pintor nos ha mostrado su amplia experiencia y conocimiento en un tema de gran trascendencia para esta Real Academia Nacional de Farmacia, que él ha titulado **«Sobre la búsqueda de nuevas aproximaciones farmacológicas para el tratamiento de las patologías oculares»**.

En el cual deja constancia de la importancia de la ciencia básica para comprender el funcionamiento del órgano visual, su complejidad anatómica y funcional. Haciendo hincapié en las nuevas posibilidades de desarrollo farmacológico derivadas de los compuestos señalizadores descubiertos en las estructuras visuales y su relevancia en las patologías asociadas.

Comienza su discurso con una brillante exposición de las ventajas evolutivas que adquirieron los organismos vivos capaces de detectar la luz que van desde los unicelulares como el alga *Euglena*, a los platelmintos, los crustáceos y toda la escala de radiaciones capaces de ser detectadas, incluyendo la luz polarizada de las mantis del mar, denominación que reciben por su apariencia semejante a las *Mantis religiosas*, insectos depredadores y voraces.

La estructura ocular de los animales superiores, sobre todo la humana fascinó durante siglos a los filósofos naturalistas, anatómicos y médicos desde hace más de 2.500 años. Muchos filósofos antiguos entre ellos Platón y Empédocles entre otros, afirman que la vista es de fuego. Esta concepción ígnea del ojo fue criticada por Aristóteles, en su libro *de Sensu*, y Teofastro en el suyo titulado, *de Sensibus*, defendiendo la naturaleza acuosa del ojo y la importancia de que el medio acuoso sea transparente. Una excelente y documentada revisión sobre estos escritos ha sido realizada por Javier Aguirre. (2012), en su artículo *“la crítica de Aristóteles y Teofastro a la concepción del ojo ígneo”*.

Ya en tiempos de Roma, Galeno describe muchas de las propiedades del ojo, siendo el transmisor del conocimiento de los anatomistas de Alejandría. Galeno hace especial referencia al cristalino, como elemento indispensable de la visión y la interferencia que suponían las cataratas en el paso de la luz. El trabajo de Galeno fue recogido por los grandes médicos de la cultura árabe y sobre todo por Hunayn Ibn Ish (809-877), quien realiza el primer estudio científico del ojo con dibujos anatómicos de gran precisión. Un excelente trabajo histórico muy bien documentado ha sido realizado por el Dr. Juan Murube (2007).

El ojo, y su estudio anatómico, no fueron ajenos a la curiosidad de uno de los grandes científicos y pensadores del Renacimiento, Leonardo da Vinci (1452) quien en su documento *Dell' occhio*, nos deja, no solo datos científicos y los estudios anatómicos más perfectos hasta el momento, sino también algunas de las frases más repetidas en la literatura referentes a nuestros ojos (edición 1993), (Heitz 2009).

Como curiosidad está la descripción de cómo hacer cortes del ojo sin perder su contenido, que ilustra bien las soluciones imaginativas en ausencia de los sofisticados sistemas de que disponemos hoy en día.

*“Al hacer la anatomía del ojo, para poder ver bien el interior sin derramar el humor acuoso, tenemos que colocar todo el ojo en clara de huevo y cocerlo hasta que se solidifique, para luego cortar el huevo y el ojo transversalmente, de suerte que no se derrame nada de la parte seccionada”.*

Resulta casi enternecedora una descripción tan sutil y tan eficaz, análoga a los bloques de inclusión utilizados en la preparación de cortes anatómicos actuales para la microscopia electrónica, aunque estos son más resistentes.

La descripción del ojo en clave poética y funcional de Leonardo, en este libro, es también uno de los fragmentos más repetidos por su belleza y contenido:

*«El ojo, que es la ventana del alma, es el órgano principal por el que el entendimiento puede tener la más completa y magnífica visión de las infinitas obras de la naturaleza.*

*¿No vemos acaso que el ojo abarca la belleza de todo el universo...? Asesora y corrige todas las artes de la humanidad... Es el príncipe de las matemáticas, y las ciencias que en él se fundan son absolutamente ciertas. Ha medido las distancias y la magnitud de las estrellas. Ha descubierto los elementos y su ubicación... Ha dado luz a la arquitectura, la perspectiva y el divino arte de la pintura. ¿Qué alabanzas pueden hacer justicia a su nobleza?*

Setenta y tres años más tarde que Leonardo, nació en Amusco, cerca de Palencia, Juan Valverde de Amusco (c-1525), quizás el anatomista más importante del siglo XVI en España. Seguidor de Vesalio, decide trasladarse a Italia para mejorar su conocimiento científico y poder efectuar disecciones con mayor libertad. Escribe un magnífico tratado sobre: *“Historia de la composición del cuerpo humano”* que fue impreso en Roma en 1556, con un gran número de ilustraciones, que fueron además las primeras impresas. Se hicieron numerosas reimpresiones del libro hasta el siglo XVIII y entre los aspectos que nos interesan se encuentra la descripción de los músculos que mueven el ojo y el curso de

los vasos que los irrigan, así como su entrada al cerebro, las que conocemos como arterias carótidas, y los primeros atisbos para comprender la anatomía del cerebro. Una excelente publicación recogiendo su legado ha sido realizada por Martin-Araguz et al. (2001) y de ella he tomado la información.

El ojo y los mecanismos de la visión han seguido fascinando a los investigadores de todos los tiempos, por su perfecta integración y la necesidad de la estructura compleja intacta para realizar el proceso. Comenta el Dr. Pintor los problemas evolutivos y la dificultad que tenía Darwin para explicar su origen y evolución, claro está que el gran pensador y naturalista inglés desconocía en aquella época los pigmentos visuales y su aparición tan temprana entre los organismos vivos.

En nuestros días las estructuras oculares, sobre todo la retina, son objeto de un estudio en profundidad tratando de paliar o restaurar su función. Falta todavía mucho para que se vendan en el mercado negro los ojos de diseño obtenidos por ingeniería genética y posiblemente Blade Runner no se moverá por las calles de los Angeles en el año 2019. Necesitará, sin duda, algo más de tiempo, pero los últimos hallazgos con células embrionarias pluripotentes y células reprogramadas capaces de incorporarse a la arquitectura funcional de la retina, han abierto el camino hacia la reparación en los casos de degeneración retiniana, una de las causas de ceguera más importantes en el mundo occidental.

Entrando en la parte central de su discurso el Dr. Pintor centra su atención inicialmente en la superficie ocular, aquella que por estar expuesta es la que puede sufrir más agresiones por alteración del medio ambiente. Se concentra en el estudio de la lágrima como elemento indispensable para nutrir, humedecer y eliminar materiales extraños de la superficie ocular y como sus alteraciones están implicadas en muchas de las patologías oculares.

Ciertamente el Dr. Pintor saca petróleo de la lágrima. Pues aplicando las tecnologías de cromatografía de alta resolución, HPLC, encuentra en la composición lacrimal múltiples nucleótidos y dinucleótidos, nunca antes descritos, siendo capaz de asociarlos a aspectos fisiológicos y patológicos concretos en los trabajos posteriores de su grupo. En el año 2002 en la revista alemana *Pflugers Archives*, describe por vez primera la presencia de diadenosina polifosfatos en las lágrimas, lo que constituyó un verdadero hito, pues hasta aquel momento solamente habían sido descritos en vesículas de secreción neuroendocrinas y neurales (Pintor et al.2002, a, b). Los poderosos efectos reportados para estos compuestos y otros nucleótidos sobre la secreción lacrimal y su composición abrieron una nueva línea de trabajo, como muy bien ha señalado el Dr. Pintor en su discurso, hasta llegar al más reciente en que al más puro estilo de nuevo galeno biotecnológico desarrolla el modo de administrarlos incluidos

en lentes de contacto blandas (Guzman-Aranguez et al. 2013). Es posible que sea por el contagio de esta Real Academia.

Todavía más reciente, pues solamente ha aparecido la versión electrónica de su trabajo, el Dr Pintor ha resuelto el enigma de las bases moleculares para que el compuesto diadenosina tetrafosfato actúe reduciendo la presión intraocular. Para ello demostró que después de su administración actúa a través de receptores P2Y2. Acto seguido altera la permeabilidad de las uniones estrechas del epitelio corneal que son la barrera que controla el acceso a las estructuras internas del ojo. Si impedimos la actividad de los receptores mediante el RNA de interferencia o siRNA del receptor P2Y2, los diadenosina tetrafosfato carecen de efecto. Este hallazgo es algo de excepcional importancia pues abre la puerta a la administración de fármacos a las estructuras internas del ojo, si se administra conjuntamente, o un poco después del diadenosina tetrafosfato, mejorando la administración de fármacos y consecuentemente su eficiencia terapéutica (Lom et al. 2014).

La utilización de RNA de interferencia para distintos componentes oculares es una técnica muy empleada por el Dr. Pintor. En su discurso cita específicamente los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos que han permitido reducir la presión intraocular con efectos secundarios mínimos y prolongados en el tiempo. Me complace que haya hecho alusión a estos trabajos en su discurso de ingreso, pues por ellos recibió el Premio de la Real Academia en el concurso científico del año 2011, siendo posteriormente publicado en los Anales RANF (Pintor 2012).

No podía faltar en el discurso del Dr. Pintor una amplia referencia a las cataratas y los aspectos bioquímicos de las proteínas del cristalino que se requieren para que sean transparentes. La pérdida de esta transparencia es lo que produce las cataratas, que son la primera causa de ceguera, pero fácilmente reversible si se extraen. Aunque como comenta el Dr. Pintor las cataratas presentan una etiología muy diversa, las debidas al metabolismo alterado de los glúcidos son las más frecuentes. Los enzimas del metabolismo glucídico, los transportadores de glucosa o hexosas en general y la misma proteína de membrana aquaporina tipo 1 o tipo 0 podrían servir para actuar con RNA de interferencia e impedir el exceso del metabolismo de glúcidos en el cristalino o la excesiva entrada de agua cuando la concentración de polioles es excesiva.

Finalizo este apartado reconociendo el valor del conocimiento aportado en este discurso de entrada, que se corresponde con la producción propia del beneficiario, su gran cultura científica y su visión de lo nuevo que se está gestando para solucionar los problemas que han acompañado al ser humano desde la remota antigüedad, como es el de la pérdida de visión hasta alcanzar la ceguera.

Jorge Luis Borges, el gran escritor argentino, con una larga historia familiar de ceguera hereditaria, nos deja con un toque de ironía el sentimiento y el consuelo de la pérdida de la visión en su obra *–Siete noches–*: «*Nadie rebaje a lágrima o reproche / esta declaración de la maestría / de Dios que con magnífica ironía / me dio a la vez los libros y la noche*». Quizás si hubiera nacido un siglo más tarde, sus problemas de visión se habrían resuelto y sus obras literarias tendrían otro color.

La ciencia de alto nivel que se podrá aplicar en el mañana para solucionar los problemas entrañablemente humanos, empieza siendo investigación básica de calidad y necesariamente siempre original en el día de hoy.

### **Consideración final**

He tratado de exponer ante Ustedes los méritos que concurren en el Dr. Jesús Pintor Just, quisiera, y espero, que esta presentación mía haya sido oportuna y objetiva. No obstante, permitanme incidir en que a sus dotes de investigador une el haber sido capaz de hacer florecer la ciencia en un lugar que no tenía nombre y que actualmente es una Facultad con excelentes laboratorios donde se aloja la escuela científica que ha conseguido crear, reconocida mundialmente y que no duda en preservar el valor de sus descubrimientos para capitalizar las ideas y traspasarlas a la sociedad.

Es seguro que Jesús Pintor Just, tendrá un futuro brillante, seguro y solidario en esta Real Academia Nacional de Farmacia, y es para mí un honor en nombre de todos los Académicos desearle que su andadura sea continuada, larga, fértil y venturosa.

He dicho

*Madrid 6 de noviembre de 2014.*

*M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal*

*Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia*

*Medalla número 48.*

## BIBLIOGRAFIA

- Aguirre J. (2012). La crítica de Aristóteles y Teofastro a la concepción del ojo ígneo". *EMERITA, Revista de Lingüística y Filología Clásica*, LXXX 1, 2012, pp. 89-106.
- Blade Runner (1982), película dirigida por Ridley Scott. Basada en la novela *The Bladerunner*, de Alan E. Nourse
- Borges JL. *Siete Noches*. Madrid: Editorial Alianza; 1995.
- Da Vinci L. Cuaderno de notas. M.E. Editores. Madrid. 1993.
- Guzman-Aranguez A, Colligris B, Pintor J. (2013) .Contact lenses: promising devices for ocular drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013 Mar; 29(2):189-99.
- Heitz RF.(2009). Regarding the Manuscript D « Dell' occhio « of Leonardo da Vinci. *Hist Sci Med*. 2009 Apr-Jun;43(2):199-208.
- Lom P, Guzman-Aranguez A, Pérez de Lara MJ, Pintor J. (2014). Diadenosine tetraphosphate induces tight junction disassembly increasing corneal epithelial permeability. *Br J Pharmacol*. 2014 Oct 9. doi:10.1111/bph.12972
- Martin-Araguz A, Bustamante-Martinez C, Toledo-León D, Lopez-Gomez M, Moreno-Martinez JM (2001). The neuroanatomy of Juan Valverde de Amusco and medicine at the time of the Spanish renaissance. *Revista de Neurología*. 2001 Apr 16-30; 32(8):788-97.
- Murube J. (2007) Hunain's Eye: The oldest preserved scientific image of the ocular surface. *The ocular surface*. 5, 3 pp.-207-212.
- Pintor J, (2012) Silencing  $\alpha 2$ -adrenergic receptor reduces intraocular pressure: A new approach for glaucoma therapy · *Anales RANF* vol. 78, 2, pp 230-240.
- Pintor J, Carracedo G, Alonso MC, Bautista A, Peral A. Presence of diadenosine polyphosphates in human tears. *Pflugers Arch*. 2002 Jan;443(3):432-6.
- Pintor J, Peral A, Hoyle CH, Redick C, Douglass J, Sims I, Yerxa B. Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Jan;300(1):291-7.







