



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISION ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA

FUNDACION CONDE DE VALENCIANA

**CUANTIFICACION DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN LAGRIMA DE PACIENTES
EN TRATAMIENTO CON FARMACOS ANALOGOS DE PROSTAGLANDINAS.**

TESIS DE POSGRADO

Para obtener el diplomado de especialidad en:

OFTALMOLOGÍA

PRESENTA:

Dra. Daniela Icxel Martínez Martínez

ASESOR DE TESIS:

Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio.

Médico Adscrito del Instituto Conde de Valenciana

México, DF

Julio 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Enrique L. Graue Wichers

Profesor de curso

Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio

Director de tesis

Dr. José Luis Rodríguez Loaiza

Jefe de enseñanza

INDICE

Introducción	4- 12
Planteamiento del Problema	13
Pregunta de investigación	13
Justificación	13
Objetivos	13
Diseño	13
Material y Métodos	14- 16
Resultados	17- 18
Bibliografía	19- 23

INTRODUCCIÓN

Los análogos de prostaglandinas de uso oftálmico son hipotensores oculares que regulan el flujo de salida uveoescleral hacia el espacio supracoroideo y venas episclerales, inhibiendo la acción de metaloproteinasas (MMP) en el metabolismo de la matriz extracelular en el cuerpo ciliar y otras estructuras oculares.

Los fármacos análogos de prostaglandina F_{2a} , tienen un receptor antagonista selectivo del prostanoide FP el cual reduce la presión intraocular incrementando el flujo de salida del humor acuoso. La reducción de la presión intraocular en el hombre empieza alrededor de 3 a 4 horas después de la administración y el efecto máximo se alcanza después de 8 a 12 horas. La reducción de presión se mantiene por lo menos 24 horas.

Estudios en animales y el hombre indican que el principal mecanismo de acción es un flujo de salida uveoescleral incrementado, aunque se ha reportado en el hombre una disminución de la resistencia de salida de flujo, puede ocurrir una hiperemia conjuntival o episcleral de leve a moderada durante el tratamiento tópico.

El tratamiento crónico con análogos de prostaglandinas en ojos de monos, los cuales se habían sometido a la extracción de lentes extracapsulares no afectó los vasos sanguíneos de acuerdo con lo que se determinó por angiografía con fluoresceína, ni indujo una pérdida de fluoresceína en el segmento posterior de ojos humanos seudofáquicos durante el tratamiento a corto plazo.

El profármaco se absorbe bien a través de la córnea y todo el fármaco que entra al humor acuoso se hidroliza durante su paso a través de la córnea. Los estudios en el hombre indican que el pico de concentración en el humor acuoso se alcanza aproximadamente 2 horas después de la aplicación tópica. Después de la administración tópica en monos, el fármaco se distribuye principalmente en el segmento anterior, la conjuntiva y los párpados de los ojos.

Sólo cantidades diminutas del fármaco alcanzan el segmento posterior. El metabolismo principal ocurre en el hígado. La vida media en el plasma es de 17 minutos en el hombre. Los metabolitos principales, el 1,2-dinor y el 1,2,3,4-tetranor, no ejercen ninguna o sólo una débil actividad biológica en los estudios en animales y se excretan principalmente en la orina.

Las citocinas o interleucinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para comunicación intercelular, son producidas por varios tipos celulares, principalmente por el Sistema Inmune. Estos mediadores solubles controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación e inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos.

Las citocinas y quimiocinas desempeñan un importante papel en el mantenimiento y coordinación de los procesos inflamatorios de la superficie ocular. Aunque diversos estudios han demostrado la presencia de algunas de estas moléculas en lágrima de sujetos sanos, no existe un consenso sobre qué citocinas y quimiocinas se encuentran de forma natural en la película lagrimal ni su concentración.

En estudios recientes se ha demostrado que las citocinas se unen a un receptor de superficie celular específico generando cascadas de señalización celular que alteran la función celular. Esto incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción que resultan en la producción de otras citocinas, o un aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas, o la supresión de su propio efecto mediante retroregulación.

Más de 100 péptidos genética y estructuralmente diferentes son reconocidos como citocinas. Son muy potentes y actúan uniéndose a receptores específicos sobre la superficie celular. Son producidas por diferentes tejidos y tipos celulares. Las citocinas secretadas por linfocitos se llaman linfocinas y aquellas producidas por macrófagos son monocinas.

Las citocinas tienen vida corta actuando a nivel local en forma autocrina y paracrina, solo algunas citocinas son normalmente presentes en la sangre que son capaces de actuar a distancia; por ejemplo: eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de células totipotenciales (SCF) y factor estimulante de las colonias de monocitos (MSCF). Cada citocina es producida por una sub-población celular en respuesta a diferentes estímulos, induciendo una característica constelación de efectos en cascada agonista, sinérgica o antagónica alterando funcionalmente la célula blanco. Sus actividades son redundantes o sobrepuestas, es decir varias citocinas diferentes comparten o inducen los mismos cambios o acciones biológicas.

Las principales citocinas que actúan en la respuesta inespecífica o inflamación son: Interleucina 1 (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina

8 (IL-8), Interleucina 12 (IL-12), Interleucina 16 (IL-16) e Interferones. Todas ellas son pro-inflamatorias. IL-6 e IL-12, además, actúan en la inmunidad específica: IL-6 es un factor autocrino de linfocitos B7 mientras que IL-12 estimula la Inmunidad celular citotóxica.

En inflamación los macrófagos son estimulados para producir múltiples moléculas tales como Óxido Nitrico (NO), quimocinas, leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas y complemento. Todas esas moléculas forman la respuesta inflamatoria, caracterizada por permeabilidad vascular aumentada y reclutamiento de células inflamatorias. Fuera de efectos locales las monocinas tienen efectos sistémicos que contribuyen a las defensas del huésped tales como: inducción de fiebre y proteínas de respuesta aguda inflamatoria.

La respuesta inflamatoria es beneficiosa cuando las monocinas se producen en cantidad adecuada pero deletérea y fatal si se producen en exceso, las citocinas más tóxicas son IL-1 y TNF las cuales son las principales mediadoras de la respuesta aguda inflamatoria generalizada característicos del choque séptico y la falla multi-sistémica orgánica.

Estas moléculas inflamatorias son finamente reguladas por múltiples inhibidores y antagonistas; rápidamente está emergiendo evidencia sobre citocinas anti-inflamatorias, las cuales son las interleucinas 10, 13, 24 y 42 (producidas por linfocitos Th2). Específicamente IL-10 es una proteína de 35-kD producida por células B, T y Mj activados, cuyas principales actividades in vitro incluyen supresión de la activación de macrófagos y de la producción de TNF- γ , IL-1, IL-6 e IL-8; de especial interés es conocer que IL-10 también inhibe la producción de IFN- γ por las células Th1 y NK, estos datos se

complementan con experimentos en modelos murinos donde la neutralización o bloqueo de IL-10 lleva a elevados niveles de TNF e IL-6 y al suministrar IL-10 exogenamente mejora la supervivencia y reduce las citocinas inflamatorias. Es de resaltar que existe otra citocina poderosamente antiinflamatoria que actúa sobre muchas células blancas: el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); esta interleucina es muy importante en la regulación y su actividad incrementada induce consecuencias indeseables de la respuesta inmune tales como fibrosis, angiogénesis e inmunosupresión en cáncer.

Generalmente las citocinas actúan como mensajeros intercelulares produciendo:

1. Activación de los mecanismos de inmunidad natural:
 - a. activación de los macrófagos y otros fagocitos.
 - b. activación de las células NK.
 - c. activación de los eosinófilos, inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado
2. Activación y proliferación de células B, hasta su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.
3. Intervención en la respuesta celular específica.
4. Intervención en la reacción de inflamación, tanto aguda como crónica.
5. Control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea.
6. Reparación tisular.

Las citocinas siendo inespecíficas respecto del antígeno, pueden ejercer acciones de modo específico. Son varios los mecanismos que explican esta

particularidad: Regulación muy fina de los receptores de cada citoquina: los receptores se expresan en determinadas células una vez que éstos han interactuando con el antígeno. La citocina sólo alcanza concentraciones adecuadas para actuar en el estrecho espacio que queda entre dos células interactuantes, por ejemplo los que se forman en el complejo TH:B, donde se alcanzan mejor esos niveles de citocinas. Existen diferentes clases de receptores de membrana para citocinas, pero se pueden agrupar en seis familias: Receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas: que poseen varios dominios extracelulares de tipo Ig. Como ejemplo: IL 1, IL 1 B, IL 16. Receptores de factores de crecimiento hemopoyéticos o CLASE I. Pertenecen a la familia de receptores alfa, beta y gamma. Se han reconocido en este grupo, las siguientes citocinas: IL 2, IL-3, IL-5, IL 6, IL 7, IL 9, IL 13, IL 15, GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocitos-monocitos) y G-CSF (Factor estimulador de colonias de Granulocitos). El receptor para el GM-CSF se expresa en los PMN como una clase única de alta afinidad (Kd de 199 pM; entre 300 a 2800 receptores por célula). Los progenitores mieloides, eritrocitos, células dendríticas, megacariocitos, células plasmáticas, ciertos linfocitos T, células endoteliales, eosinófilos, macrófagos, monocitos y células mieloides leucémicas expresan receptores, las dos últimas de afinidad intermedia (Kd de 10 a 40 pM) y el resto de baja afinidad (Kd <2 pM).

La orquestación simultánea de varias respuestas y la redundancia del sistema inmunitario queda quizá mejor ilustrada a través de la estructura de algunos de los receptores de interleucinas. El receptor de la IL-2 consta de tres cadenas: alfa, beta y gamma. La expresión de las tres cadenas da lugar al receptor de IL-2 de alta afinidad; La expresión de las cadenas beta y gamma da lugar sólo

a un receptor de IL-2 de afinidad intermedia, La cadena alfa representa sólo un receptor de afinidad baja.

Recientemente se ha demostrado que las mutaciones o eliminaciones de la cadena gamma del receptor de la IL-2 constituyen la base molecular de la inmunodeficiencia grave combinada ligada al cromosoma X (IDGC). Resulta interesante señalar que las mutaciones de las cadenas alfa o beta del receptor de la IL-2 no dan lugar a la IDCG (al menos en modelos animales). Esta aparente discrepancia se debe a que la cadena gamma del receptor de la IL-2 es también parte del complejo receptor para la IL-4, la IL-7, la IL-9 y la IL-15; esta cadena se denomina ahora cadena gamma común. El receptor de la IL-15 comparte las cadenas beta y gamma con el receptor de la IL-2. La cadena α del receptor de la IL-13 es idéntica a la cadena alfa del receptor de la IL-4.

Recientemente se han producido avances importantes en la dilucidación de la ruta que conduce desde la unión de la citocina con el receptor de la célula diana hasta la activación de la transcripción de los genes cuyos productos son responsables de los efectos de dichas citocinas. He aquí un modelo general que se puede aplicar a muchos receptores de las clases I y II:

1. La citocina provoca la dimerización de las dos subunidades del receptor (cadenas alfa y beta), en el caso de las quimiocinas se produce la dimerización de sus receptores, lo que coloca cercanas a sus respectivas colas citoplásmicas.
2. Una serie de proteín-quinasas de la familia de JAK (JANUS QUINASAS) se unen a las colas agrupadas de las subunidades del receptor, con lo que se esas quinasas se activan.

3. Las JAK se autofosforilan.
4. Las JAK fosforilan a su vez determinadas tirosinas de las colas del receptor,
5. Entonces proteínas de otra familia, llamada STAT (transductores de señal y activadores de transcripción) se unen a algunas de las tirosinas fosforiladas de las colas del receptor, quedando cerca de las JAK.
6. Las JAK fosforilan a las STAT unidas a las colas del receptor.
7. Al quedar fosforiladas, las STAT pierden su afinidad por las colas del receptor, y en cambio tienden a formar dímeros entre sí. (Las tirosinas fosforiladas que han quedado libres en las colas del receptor sirven para unir nuevos monómeros de STATs).
8. Los dímeros de STAT fosforilados emigran al núcleo de la célula, donde actúan ahora como activadores de la transcripción de ciertos genes, al unirse a secuencias especiales en la parte 5' respecto de las porciones codificadoras.

MECANISMO DE REGULACIÓN DE CITOCINAS

El distinto espectro de citocinas secretadas por las dos subpoblaciones de linfocitos TH1 y TH2 determina los efectos biológicos diferenciales durante el curso de la respuesta inmune. Las dos poblaciones linfocitarias están sujetas a finos controles cruzados. Las células TH1: producen IL-2, IFN- γ y TNF- β . Son responsables de funciones de inmunidad celular (activación de linfocitos TC e hipersensibilidad de tipo retardado), destinadas a responder a parásitos intracelulares (virus, protozoos, algunas bacterias). Las células TH2 producen: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Actúan como colaboradoras en la activación de las células B, y son más apropiadas para responder a bacterias extracelulares y a

helmintos. También están implicadas en reacciones alérgicas (ya que la IL-4 activa la producción de IgE y la IL-5 activa a los eosinófilos)

En los años recientes está cada vez más claro que el resultado de la respuesta inmune depende en buena medida de los niveles relativos de células TH1 y TH2: en una respuesta a patógenos intracelulares existe un aumento de citocinas de TH1, mientras que en respuestas alérgicas y ante helmintos es superior el nivel de las de TH2.

Un punto importante en todo esto es la existencia de una regulación cruzada entre TH1 y TH2; El IFN-gama secretado por las TH1 inhibe la proliferación de las TH2. Por su lado, la IL-10 secretada por las TH2 inhibe la secreción de IL-2 e IFN-gama por parte de las TH1. Esta inhibición en realidad no es directa: la IL-10 produce un descenso marcado de la cantidad de MHC-II de las células presentadoras de antígeno, que por lo tanto ya no pueden ejercer bien su papel de activar a las TH1 (Recordemos: MHC-I: determinan glucoproteínas de membrana que aparecen en casi todas las células nucleadas, que sirven para presentar antígenos peptídicos de células propias alteradas a los linfocitos T citotóxicos (TC); MHC-II: determinan glucoproteínas de membrana de células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B), y que sirven para presentar antígenos peptídicos a linfocitos T); Además, las TH2 inhiben por sus citocinas la producción en macrófagos del óxido nítrico (NO) y otros bactericidas, así como la secreción por estos macrófagos de IL-1, IL-6, IL-8 y otras citocinas. Este fenómeno de regulación negativa cruzada explica las ya antiguas observaciones de que existe una relación inversa entre la producción de anticuerpos y la hipersensibilidad de tipo retardado.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe una diferencia significativa en la cantidad de citocinas proinflamatorias en la lágrima de los pacientes que usan análogos de prostaglandinas para el control de glaucoma?

JUSTIFICACION

Los fármacos prostanoideos son actualmente muy empleados para el tratamiento tópico del glaucoma, no existe un estudio previo en el que se cuantifiquen los valores de citocinas proinflamatorias que se ven relacionadas con el uso de este tipo de medicamentos

OBJETIVOS

Analizar las citocinas proinflamatorias que se incrementan en la película lagrimal de pacientes que utilizan análogos de prostaglandinas de manera crónica para el tratamiento de glaucoma.

DISEÑO

Estudio experimental, prospectivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo una muestra de lagrime a pacientes del servicio de glaucoma de esta institución que se encuentran utilizando fármacos análogos de prostaglandinas y se analizó la muestra para cuantificar las citocinas proinflamatorias encontradas en ella con el paquete Quantikine para inmunoensayo de Interleucina 12 p40 humana, Interleucina 17 y Factor de crecimiento transformante B1, así mismo se tomó muestra de lagrime en un segundo grupo de pacientes del servicio de glaucoma que utilicen hipotensores oculares no análogos de prostaglandinas y un tercer grupo de pacientes sanos que no utilizan medicamento tópico ocular en los cuales también se analizará la muestra de lagrime para cuantificar la cantidad de citoquinas proinflamatorias.

Se realizó la cuantificación de acuerdo a los lineamientos establecidos en el manual de cuantificación de cada citocina de la siguiente manera:

IL-12:

- 1._ Preparar todos los reactivos.
- 2._ Agregar 100 microlitros de diluyente RD1W a cada pared.
- 3._ Agregar 100 microlitros de muestra a cada pared. Incubar 2 horas (TA).
- 4._ Aspirar y lavar 4 veces.

Aspirar y lavar cada pared, repitiendo el proceso en un total de 3 veces para hacer 4 lavados. Lavar cada pared con solución de Buffer de lavado (400 microlitros). Después de cada lavado remover el remanente de Buffer de lavado por aspiración y decantado. Invertir la placa en una toalla de papel limpia.

- 5._ Agregar 200 microlitros de IL-4 conjugada en cada pared. Incubar (para células del plasma [2 hrs] y otras [1 hr]).

6._ Aspirar y lavar 4 veces.

7._ Agregar 200 microlitros de solución del sustrato en cada pared. Incubar a 30 minutos. Proteger de la luz.

8._ Agregar 50 microlitros de solución de parado en cada pared. Leer a 450 nm durante 30 min. Λ 540 o 570 nm.

IL-17:

1._ Preparar todos los reactivos.

2._ Agregar 100 microlitros de diluyente RD1-36 a cada pared.

3._ Agregar 100 microlitros de muestra a cada pared. Incubar 3 horas (TA).

4._ Aspirar y lavar 3 veces.

Aspirar y lavar cada pared, repitiendo el proceso en un total de 3 veces para hacer 4 lavados. Lavar cada pared con solución de Buffer de lavado (400 microlitros). Después de cada lavado remover el remanente de Buffer de lavado por aspiración y decantado. Invertir la placa en una toalla de papel limpia.

5._ Agregar 200 microlitros de IL-4 conjugada en cada pared. Incubar durante 1 hora.

6._ Aspirar y lavar 3 veces.

7._ Agregar 200 microlitros de solución del sustrato en cada pared. Incubar a 30 minutos. Proteger de la luz.

8._ Agregar 50 microlitros de solución de parado en cada pared. Leer a 450 nm durante 30 min. Λ 540 o 570 nm.

TGF-1:

- 1._ Preparar todos los reactivos.
- 2._ Agregar 50 microlitros de diluyente de ensayo a cada pared.
- 3._ Agregar 50 microlitros de muestra a cada pared. Incubar 2 horas (TA).
- 4._ Aspirar y lavar 4 veces.

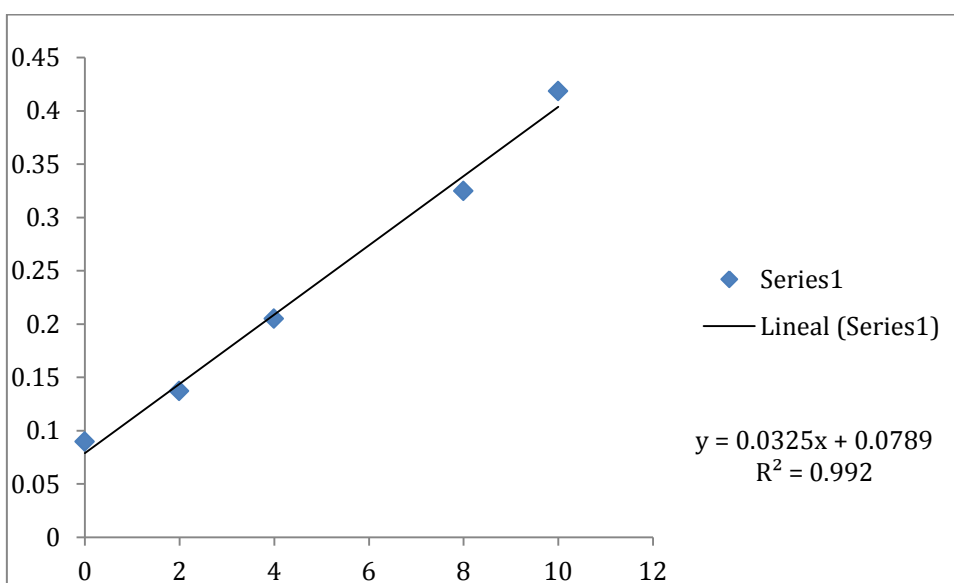
Aspirar y lavar cada pared, repitiendo el proceso en un total de 3 veces para hacer 4 lavados. Lavar cada pared con solución de Buffer de lavado (400 microlitros). Después de cada lavado remover el remanente de Buffer de lavado por aspiración y decantado. Invertir la placa en una toalla de papel limpia.

- 5._ Agregar 100 microlitros de IL-4 conjugada en cada pared. Incubar durante 2 horas.
- 6._ Aspirar y lavar 4 veces.
- 7._ Agregar 100 microlitros de solución del sustrato en cada pared. Incubar a 30 minutos. Proteger de la luz.
- 8._ Agregar 100 microlitros de solución de parado en cada pared. Leer a 450 nm durante 30 min. \wedge 540 o 570 nm.

RESULTADOS

Las muestras de cada grupo fueron analizadas encontrando los siguientes valores:

Curva patrón que muestra el análisis de proteína total encontrado por cada muestra en cada uno de los grupos.



	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
# M	Abs.	ug/uL	Abs.	ug/uL	Abs.	ug/uL
1	0.092	0.40307692	0.095	0.49538462	0.127	1.48
2	0.091	0.37230769	0.092	0.40307692	0.088	0.28
3	0.095	0.49538462	0.09	0.34153846	0.091	0.37230769
4	0.091	0.37230769	0.162	2.55692308	0.153	2.28
5	0.088	0.28	0.119	1.23384615	0.09	0.34153846
6	0.094	0.46461538	0.089	0.31076923	0.089	0.31076923
7	0.093	0.43384615	0.088	0.28	0.087	0.24923077
8	0.094	0.46461538	0.099	0.61846154	0.16	2.49538462
9	0.086	0.21846154	0.092	0.40307692	0.096	0.52615385
10	0.11	0.95692308	0.092	0.40307692	0.12	1.26461538
11	0.165	2.64923077	0.102	0.71076923	0.091	0.37230769
12	0.093	0.43384615	0.092	0.40307692	0.235	4.80307692
13	0.135	1.72615385	0.092	0.40307692	0.15	2.18769231
14	0.094	0.46461538	0.09	0.34153846	0.182	3.17230769
15	0.173	2.89538462	0.096	0.52615385	0.095	0.49538462

Tabla de proteína total encontrada en cada muestra

	I			II			III		
# M	µg/µL	Volumen total	Prot. Total	µg/µL	Volumen total	Prot. Total	µg/µL	Volumen total	Prot. Total
1	0.218	5	1.09230769	0.280	30	8.4	0.249	5	1.24615385
2	0.280	25	7	0.311	20	6.21538462	0.280	30	8.4
3	0.372	10	3.72307692	0.342	30	10.2461538	0.311	50	15.5384615
4	0.372	3	1.11692308	0.342	5	1.70769231	0.342	15	5.12307692
5	0.403	34	13.7046154	0.403	10	4.03076923	0.372	3	1.11692308
6	0.434	5	2.16923077	0.403	15	6.04615385	0.372	40	14.8923077
7	0.434	10	4.33846154	0.403	5	2.01538462	0.495	20	9.90769231
8	0.465	10	4.64615385	0.403	50	20.1538462	0.526	3	1.57846154
9	0.465	3	1.39384615	0.403	20	8.06153846	1.265	15	18.9692308
10	0.465	3	1.39384615	0.495	40	19.8153846	1.480	5	7.4
11	0.495	12	5.94461538	0.526	50	26.3076923	2.188	20	43.7538462
12	0.957	62	59.3292308	0.618	15	9.27692308	2.280	10	22.8
13	1.726	10	17.2615385	0.711	42	29.8523077	2.495	80	199.630769
14	2.649	36	95.3723077	1.234	40	49.3538462	3.172	40	126.892308
15	2.895	6	17.3723077	2.557	50	127.846154	4.803	10	48.0307692

BIBLIOGRAFIA

1. Lopilly Park HY, Kim JH, Lee KM, Park CK. Effect of prostaglandin analogues on tear proteomics and expression of cytokines and matrix metalloproteinases in the conjunctiva and cornea. *Exp Eye Res.* 2012 Jan;94(1):13-21. doi: 10.1016/j.exer.2011.10.017. Epub 2011 Nov 4.
2. Malvitte L, Montange T, Vejux A, Baudouin C, Bron AM, Creuzot-Garcher C, Lizard G. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br J Ophthalmol.* 2007 Jan;91(1):29-32. Epub 2006 Aug 30.
3. Broadway D, Grierson I, Hitchings R. Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva. *Br J Ophthalmol* 1993. 77, 590–596.
4. Broadway D, Grierson I, O'Brien C. *et al*/Adverse effects of topical antiglaucoma medication. I. The conjunctival cell profile. *Arch Ophthalmol* 1994. 1437–1445.
5. Cook E B, Stahl J L, Lowe L. *et al*/Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *J Immunol Methods* 2001. 109–118.

6. Pflugfelder S C, Jones D, Ji Z. *et al* Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999. 201–211.
7. Barton K, Monroy D C, Nava A. *et al* Inflammatory cytokines in the tears of patients with ocular rosacea. *Ophthalmology* 1997. 1868–1874.
8. Khan S S, Smith M S, Reda D. *et al* Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytometry* 2004. 35–39.
9. DuPont N C, Wang K, Wadhwa P D. *et al* Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J Reprod Immunol* 2005. 175–191.
10. Baudouin C, Hamard P, Liang H. *et al* Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology* 2004. 2186–2192.
11. Uchino E, Sonoda S, Kinukawa N. *et al* Alteration pattern of tear cytokines during the course of a day: diurnal rhythm analyzed by multicytokine assay. *Cytokine* 2006. 36–40.

12. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res* 1998. 673–676.
13. Baudouin C, Liang H, Bremond-Gignac D. *et al*/CCR 4 and CCR 5 expression in conjunctival specimens as differential markers of T(H)1/T(H)2 in ocular surface disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2005. 614–619.
14. Pisella P J, Debbasch C, Hamard P. *et al* Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004. 1360–1368.
15. Camras CB. Comparison of latanoprost and timolol in patients with ocular hypertension and glaucoma: a six-month masked, multicenter trial in the United States: The United States Latanoprost Study Group. *Ophthalmology*. 1996;103(1):138–47.
16. Chew PT, Aung T, Aquino MV, *et al*. Intraocular pressure-reducing effects and safety of latanoprost versus timolol in patients with chronic angle-closure glaucoma. *Ophthalmology*. 2004; 111(3):427–34.
17. Toris CB, Gabelt BT, Kaufman PL. Update on the mechanism of action of topical prostaglandins for intraocular pressure reduction. *Surv Ophthalmol*. 2008;53:S107–20.

18. Pisella PJ, Debbasch C, Hamard P, et al. Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol: an ex vivo and *in vitro* study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(5):1360–8.
19. Sharif NA, Kelly CR, Crider JY, et al. Ocular hypotensive FP prostaglandin (PG) analogs: PG receptor subtype binding affinities and selectivities, and agonist potencies at FP and other PG receptors in cultured cells. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2003;19(6):501–15.
20. Alm A, Grierson I, Shields MB. Side effects associated with prostaglandin analog therapy. *Surv Ophthalmol.* 2008;53(Suppl1): S93–105.
21. Uusitalo H, Pillunat LE, Ropo A. A. Efficacy and safety of tafluprost 0.0015% versus latanoprost 0.005% eye drops in open-angle glaucoma and ocular hypertension: 24-month results of a randomized, double-masked phase III study. *Acta Ophthalmol .* 2010;88(1):12–9
22. Wilson FM., 2nd Adverse external ocular effects of topical ophthalmic medications. *Surv Ophthalmol.* 1979 Sep-Oct;24(2):57–88.
23. Wilson FM., 2nd Adverse external ocular effects of topical ophthalmic therapy: an epidemiologic, laboratory, and clinical study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1983; 81:854–965.
24. Novack GD. Ophthalmic beta-blockers since timolol. *Surv Ophthalmol.* 1987 Mar-Apr;31(5):307–327.

25. Wright P. Squamous metaplasia or epidermalization of the conjunctiva as an adverse reaction to topical medication. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1979 Jul;99(2):244–246.
26. Derous D, de Keizer RJ, de Wolff-Rouendaal D, Soudijn W. Conjunctival keratinisation, an abnormal reaction to an ocular beta-blocker. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1989 Jun;67(3):333–338.
27. Sherwood MB, Grierson I, Millar L, Hitchings RA. Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology*. 1989 Mar;96(3):327–335.
28. Nielsen NV, Eriksen JS. Timolol and metoprolol in glaucoma. A comparison of the ocular hypotensive effect, local and systemic tolerance. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1981 Jun;59(3):336–346.
29. Herreras JM, Pastor JC, Calonge M, Asensio VM. Ocular surface alteration after long-term treatment with an antiglaucomatous drug. *Ophthalmology*. 1992 Jul;99(7):1082–1088.
30. Brandt JD, Wittpenn JR, Katz LJ, Steinmann WN, Spaeth GL. Conjunctival impression cytology in patients with glaucoma using long-term topical medication. *Am J Ophthalmol*. 1991 Sep 15;112(3):297–301.

