

Impacto de las formulaciones antiglaucomatosas en la viabilidad celular: estudio in vitro en células epiteliales corneales humanas

Jeremías Galletti^a, Giselle M. Rodríguez^b, Ailin R. Fantacone^b, María Silvia Passerini^b

^a *Laboratorio de Inmunidad Innata, Instituto de Medicina Experimental/CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.*

^b *Departamento Médico, Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina.*

Recibido: 29 de septiembre de 2025.

Aprobado: 16 de noviembre de 2025.

Autor correspondal

Lic. Giselle M. Rodríguez

Laboratorios Poen

Gómez de Fonseca 652

(C1407BDR) Buenos Aires, Argentina

+54 11 4670-0100

investigación@poen.net.ar

Oftalmol Clin Exp (ISSNe 1851-2658)

2025; 18(4): e459-e466.

<https://doi.org/10.70313/2718.7446.v18.n4.463>

Conflicto de intereses

Este estudio fue desarrollado con el auspicio del Laboratorio POEN S.A.U.

Giselle Marisa Rodríguez, Ailin Rocio Fantacone y María Silvia Passerini son empleados del Laboratorio POEN S.A.U.

Resumen

Objetivo: Evaluar la citotoxicidad de formulaciones antiglaucomatosas comerciales en células epiteliales corneales humanas (HCEC).

Materiales y métodos: Se desarrolló un estudio exploratorio de diseño experimental. Las HCEC se expusieron durante 30 minutos a PBS, BAK 0,01% y formulaciones antiglaucomatosas comerciales que contienen: análogos de prostaglandinas, inhibidores de la anhidrasa carbónica, un agonista $\alpha 2$ -adrenérgico y un β -bloqueante. Todas las formulaciones contenían cloruro de benzalconio (BAK), excepto la nanoemulsión de latanoprost, conservada con sorbato de potasio. La viabilidad celular se evaluó mediante la reducción de resazurina. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía, seguido de la prueba post-hoc de Dunnett ($p < 0,05$).

Resultados: Todas las formulaciones que contenían BAK mostraron una toxicidad mayor al PBS ($p < 0,0001$). Las formulaciones de latanoprost 0,005% (BAK 0,02%), bimatoprost 0,01% (BAK 0,02%), brinzolamida 1% (BAK 0,01%) y timolol 0,5% (BAK 0,01%), mostraron una toxicidad significativamente mayor que el BAK 0,01% ($p < 0,05$). En contraste, las formulaciones de dorzolamida 2% (BAK 0,0075%), brimonidina 0,2% (BAK 0,005%) y bimatoprost 0,03% (BAK 0,005%) mostraron niveles de toxicidad comparables al conser-

vante ($p > 0,05$), al igual que la formulación de travoprost 0,004% (BAK 0,015%). La nanoemulsión de latanoprost 0,005% (sorbato de potasio 0,18%) fue la única menos citotóxica que el BAK 0,01% ($p < 0,001$).

Conclusiones: Estos resultados subrayan la importancia de considerar la formulación completa al seleccionar un tratamiento crónico. El latanoprost en nanoemulsión sin BAK fue la única formulación que no alteró la viabilidad celular, lo que destaca su perfil de seguridad.

Palabras clave: glaucoma, citotoxicidad, latanoprost, cloruro de benzalconio, córnea.

Impact of antiglaucomatous formulations on cell viability: an in vitro study in human corneal epithelial cells

Abstract

Objective: To evaluate the cytotoxicity of commercially available antiglaucoma formulations in human corneal epithelial cells (HCEC).

Methods: An exploratory experimental design study was developed. HCEC were exposed for 30 minutes to commercially available formulations containing different active ingredients: prostaglandin analogues, carbonic anhydrase inhibitors, an α_2 -adrenergic agonist, and a β -blocker. All formulations contained benzalkonium chloride (BAK), except for the latanoprost nanoemulsion, which is preserved with potassium sorbate. Cell viability was assessed using resazurin reduction. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test ($p < 0,05$).

Results: All formulations containing BAK showed greater toxicity compared to PBS ($p < 0,0001$). Latanoprost 0.005% (BAK 0.02%), bimatoprost 0.01% (BAK 0.02%), brinzolamide 1% (BAK 0.01%) and timolol 0.5% (BAK 0.01%), showed significantly greater toxicity than BAK 0.01% ($p < 0,05$). In contrast, the formulations of dorzolamide 2% (BAK 0.0075%), brimonidine 0.2% (BAK 0.005%), and bimatoprost 0.03% (BAK 0.005%) showed toxicity levels comparable to the preservative ($p > 0,05$), as did the formulation of travoprost 0.004% (BAK 0.015%). The latanoprost 0.005% nanoemulsion (potassium sorbate 0.18%) was the only formu-

lation that was less cytotoxic than BAK 0.01% ($p < 0,001$).

Conclusion: These results underscore the importance of considering the entire formulation when selecting a chronic treatment. BAK-free latanoprost nanoemulsion was the only formulation that did not affect cell viability, highlighting its favourable safety profile.

Keywords: glaucoma, cytotoxicity, latanoprost, benzalkonium chloride, cornea.

Impacto de formulações antiglaucoma na viabilidade celular: um estudo in vitro em células epiteliais da córnea humana

Resumo

Objetivo: Avaliar a citotoxicidade de formulações comerciais antiglaucoma em células epiteliais da córnea humana (HCEC).

Materiais e métodos: Foi realizado um estudo exploratório com delineamento experimental. As HCEC foram expostas por 30 minutos a PBS, BAK a 0,01% e formulações comerciais antiglaucoma contendo análogos de prostaglandinas, inibidores da anidrase carbônica, um agonista α_2 -adrenérgico e um β -bloqueador. Todas as formulações continham cloreto de benzalcônio (BAK), exceto a nanoemulsão de latanoprost, que foi preservada com sorbato de potássio. A viabilidade celular foi avaliada pela redução da resazurina. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Dunnett ($p < 0,05$).

Resultados: Todas as formulações contendo BAK apresentaram maior toxicidade do que a solução salina tamponada com fosfato (PBS) ($p < 0,0001$). As formulações de latanoprost 0,005% (BAK 0,02%), bimatoprost 0,01% (BAK 0,02%), brinzolamida 1% (BAK 0,01%) e timolol 0,5% (BAK 0,01%) apresentaram toxicidade significativamente maior do que a formulação com BAK 0,01% ($p < 0,05$). Em contrapartida, as formulações de dorzolamida 2% (BAK 0,0075%), brimonidina 0,2% (BAK 0,005%) e bimatoprost 0,03% (BAK 0,005%) apresentaram níveis de toxicidade comparáveis aos do conservante ($p > 0,05$), assim como a formulação de travoprost 0,004% (BAK 0,015%). A nanoemulsão de latanoprost 0,005% (sorbato de potássio 0,18%)

foi a única menos citotóxica que o BAK 0,01% ($p < 0,001$).

Conclusões: Estes resultados reforçam a importância de se considerar a formulação completa na seleção de um tratamento crônico. A nanoemulsão de latanoprost sem BAK foi a única formulação que não comprometeu a viabilidade celular, destacando seu perfil de segurança.

Palavras-chave: glaucoma, citotoxicidade, latanoprost, cloreto de benzalcônio, córnea.

Introducción

El glaucoma de ángulo abierto es una enfermedad crónica caracterizada por el daño progresivo del nervio óptico y la pérdida del campo visual que, en última instancia, puede conducir a la ceguera debido a una elevación asintomática de la presión intraocular (PIO). Actualmente, el enfoque médico se basa en la reducción de la PIO, lo que aumenta la probabilidad de retrasar o detener la progresión del deterioro del campo visual¹⁻³.

Aunque resultan eficaces para controlar la progresión de la enfermedad, la exposición crónica a fármacos antiglaucomatosos tópicos puede comprometer la integridad de la superficie ocular, fundamentalmente debido a la presencia de agentes conservantes⁴⁻⁵. El cloruro de benzalconio (BAK) es uno de los conservantes más empleados por sus propiedades antimicrobianas; sin embargo, se ha demostrado que ejerce efectos citotóxicos sobre la superficie ocular a través de varios mecanismos, entre ellos la generación de especies reactivas del oxígeno, la activación de cascadas inflamatorias y la inducción de muerte celular, lo que en conjunto contribuye al desarrollo de inflamación y discomfort ocular^{1, 6-8}.

Dado que el tratamiento del glaucoma suele requerir de la administración tópica de medicación durante toda la vida, la exposición repetida a los conservantes y a los principios activos puede provocar un daño acumulativo en la superficie ocular desencadenando síntomas como sequedad e irritación, que en última instancia pueden afectar la adhesión al tratamiento y la calidad de vida de los pacientes¹.

La evaluación de la citotoxicidad epitelial de formulaciones antiglaucomatosas comercialmente disponibles —en lugar de sus drogas aisladas— ofrece información clínicamente relevante que puede orientar la decisión terapéutica y favorecer prácticas de prescripción más seguras.

El presente estudio exploratorio tuvo como objetivo analizar el efecto citotóxico de diversas soluciones oftálmicas antiglaucomatosas comercialmente disponibles sobre células epiteliales corneales humanas. Mediante la comparación de formulaciones que contienen distintos principios activos y distintas concentraciones de conservantes, incluida una formulación con un conservante suave, este estudio busca aportar información preliminar sobre la citotoxicidad relativa de los diferentes tratamientos y destacar sus posibles implicancias en la toma de decisiones clínicas.

Materiales y métodos

Se desarrolló un estudio exploratorio de diseño experimental. Las formulaciones analizadas incluyeron análogos de prostaglandinas, inhibidores de la anhidrasa carbónica, agonistas alfa-2 y un bloqueante beta, todas como monodrogas. El estudio se desarrolló utilizando productos comerciales disponibles y aprobados por la entidad regulatoria de Argentina. Todas las formulaciones contenían cloruro de benzalconio (BAK) como conservante, excepto la nanoemulsión de latanoprost (Louten®, Laboratorios Poen), conservada con sorbato de potasio (0,18%), con concentraciones de BAK varían entre 0,005% y 0,02%. Específicamente, bimatoprost 0,03% (Lumigan®, AbbVie) y tartrato de brimonidina 0,2% (Alphagan®, AbbVie) con BAK al 0,005%; dorzolamida 2% (Glaucotensil® D, Laboratorios Poen) con BAK al 0,0075%; brinzolamida 1% (Azopt®, Alcon) y timolol 0,5% (Plostim®, Novartis) con BAK al 0,01%; travoprost 0,004% (Arvo®, Elea) con BAK al 0,015%; y latanoprost solución 0,005% (Xalatan®, Pfizer) junto con bimatoprost 0,01% (Lumigan® RC, AbbVie) con BAK al 0,02%.

La viabilidad celular se evaluó mediante la reducción de resazurina. Las células epitelia-

les corneales humanas (HCEC) se cultivaron en condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂) en medio de cultivo. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante 24 horas. Posteriormente, se incubaron con 100 µL de cada formulación oftálmica o con solución salina tamponada con fosfato (se utilizarán las siglas PBS, del término en inglés “phosphate buffered saline”), más 20 µL de medio de cultivo, durante 30 minutos. Tras la incubación, las células se lavaron y se incubaron durante 3 horas con medio fresco que contenía resazurina. Cada condición experimental se evaluó en tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La fluorescencia se registró a 590 nm (excitación a 560 nm) utilizando un lector de placas. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en relación con el control con PBS. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar.

Resultados

Todas las formulaciones que contenían BAK mostraron una mayor toxicidad en comparación con el control con PBS ($p < 0,0001$) (fig. 1). Interesantemente, la nanoemulsión de latanoprost al 0,005%, que contiene sorbato de potasio en lugar de BAK, mantuvo una actividad metabólica comparable a la observada con el control de PBS ($p > 0,05$), lo que sugiere una alta viabilidad celular bajo las condiciones evaluadas (fig. 1).

Las formulaciones de latanoprost solución 0,005% (BAK 0,02%), bimatoprost 0,01% (BAK 0,02%), brinzolamida 1% (BAK 0,01%) y timolol 0,5% (BAK 0,01%) mostraron una toxicidad significativamente mayor que el BAK 0,01% ($p < 0,05$). En contraste, las formulaciones de dorzolamida 2% (BAK 0,0075%), brimonidina 0,2% (BAK 0,005%) y bimatoprost 0,03% (BAK 0,005%) presentaron niveles de toxicidad comparables al conservante ($p > 0,05$), al igual que la formulación de travoprost 0,004% (BAK 0,015%).

La nanoemulsión de latanoprost 0,005% (sorbato de potasio 0,18%) fue la única formulación que mostró una citotoxicidad significativamente menor que BAK 0,01% ($p < 0,001$) (fig. 2).

Discusión

En el presente estudio se evaluaron los efectos citotóxicos de formulaciones antiglaucomatosas disponibles comercialmente sobre células epiteliales corneales humanas mediante un ensayo de viabilidad basado en resazurina. Los resultados demostraron una reducción significativa de la actividad metabólica con todas las formulaciones que contenían BAK, lo que evidencia citotoxicidad a nivel del epitelio corneal. En contraste, y en concordancia con estudios previos, la nanoemulsión de latanoprost preservó la viabilidad celular, lo que sugiere un perfil de seguridad más favorable bajo las condiciones experimentales evaluadas⁹. Estos hallazgos coinciden con reportes previos sobre la toxicidad asociada al BAK y subrayan la importancia del tipo de conservante en la terapia antiglaucomatosa¹⁰⁻¹¹.

La principal fortaleza de este estudio radica en el uso exclusivo de formulaciones oftálmicas comerciales, idénticas a las que se administran a los pacientes en la práctica clínica habitual. Esta elección metodológica aumenta la relevancia traslacional de los hallazgos, ya que refleja de manera precisa el posible impacto citotóxico de los tratamientos antiglaucomatosos tal como se aplican en la realidad. A diferencia de otros estudios que evalúan principios activos aislados o vehículos modificados, nuestro enfoque aporta evidencia directa sobre la seguridad de los productos disponibles en el mercado, lo que resulta especialmente valioso al considerar los riesgos asociados con la terapia antiglaucomatosa a largo plazo.

Dado que se trata de un estudio experimental preliminar, se priorizaron la robustez metodológica y la sensibilidad del ensayo. El uso exclusivo del ensayo con resazurina se justificó por su capacidad para detectar alteraciones metabólicas tempranas, proporcionando una evaluación inicial sólida del posible efecto citotóxico de las formulaciones analizadas. Considerando el carácter

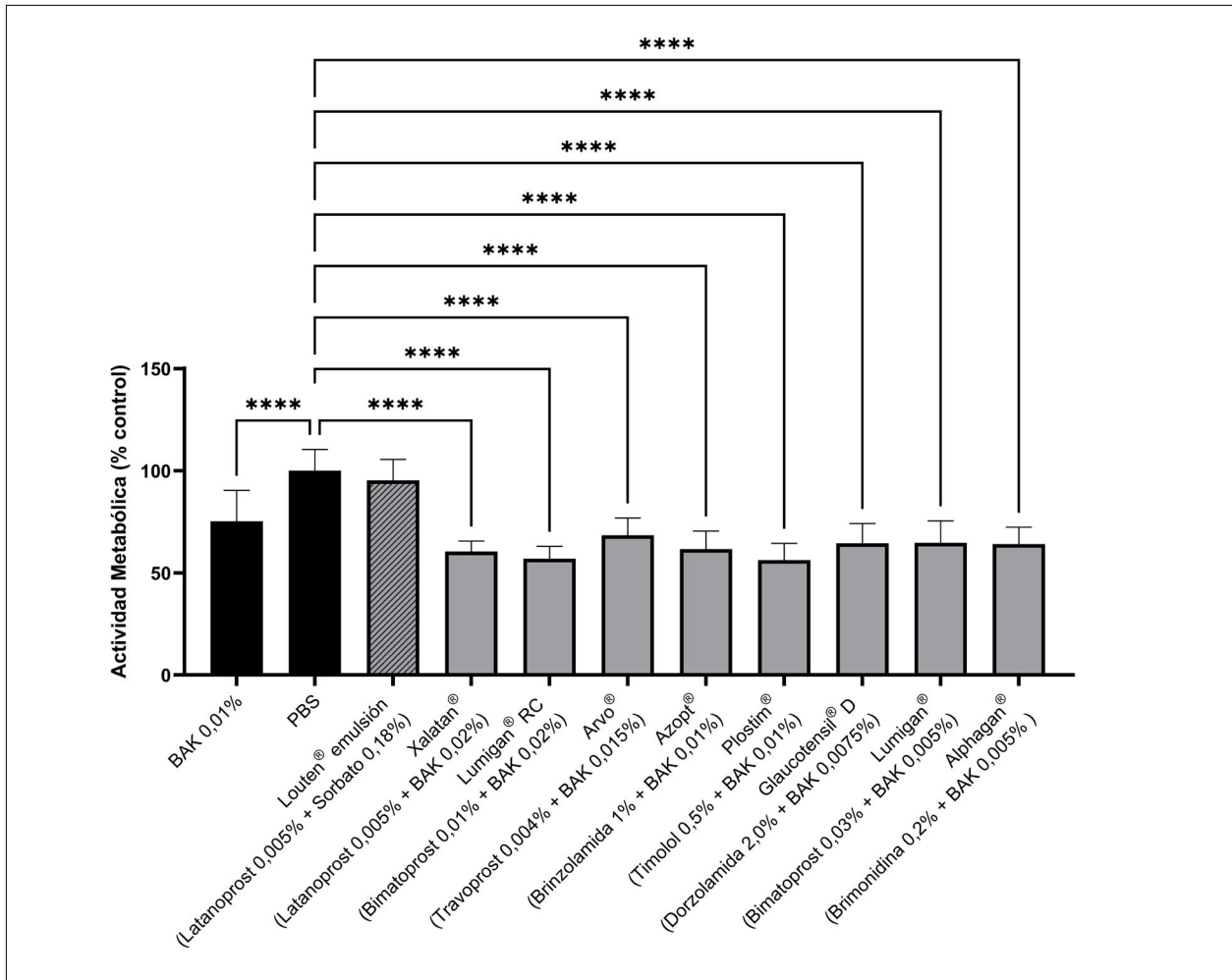


Figura 1. Efecto de las formulaciones antiglaucomatosas comerciales sobre la actividad metabólica de células epiteliales corneales humanas (HCEC). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett frente al control con PBS. **** indica $p < 0,0001$.

exploratorio del trabajo, se optó por una única técnica de determinación de viabilidad celular.

La utilización de células epiteliales corneales humanas como modelo *in vitro* aporta relevancia fisiológica al estudio, dado que estas células constituyen la primera línea de contacto con las formulaciones oftálmicas tópicas. Este modelo permite evaluar los efectos citotóxicos directos sobre la superficie ocular.

Las formulaciones que contenían concentraciones de BAK $\geq 0,01\%$, como latanoprost solución 0,005%, brinzolamida 1%, bimatoprost 0,01% y timolol 0,5%, mostraron una toxicidad significativamente mayor que el BAK 0,01% solo. Por otro lado, las formulaciones de dorzolamida 2,0% con

BAK al 0,0075%, tartrato de brimonidina 0,2% y bimatoprost 0,03%, con BAK al 0,005%, presentaron una citotoxicidad comparable a la observada con BAK 0,01%. Estos hallazgos sugieren que la citotoxicidad observada podría deberse a un efecto combinado entre el BAK y cada principio activo^{7,9,12-15}. Sin embargo, a diferencia de las anteriores, la formulación de travoprost 0,004% con BAK 0,015% no mostró mayor toxicidad que el BAK 0,01%. De manera similar, Kahook y colaboradores demostraron que el travoprost con BAK 0,015% presentaba una citotoxicidad menor que el tafluprost con BAK 0,01%¹⁶.

Nuestras observaciones respaldan la idea de que reducir o eliminar la concentración de BAK

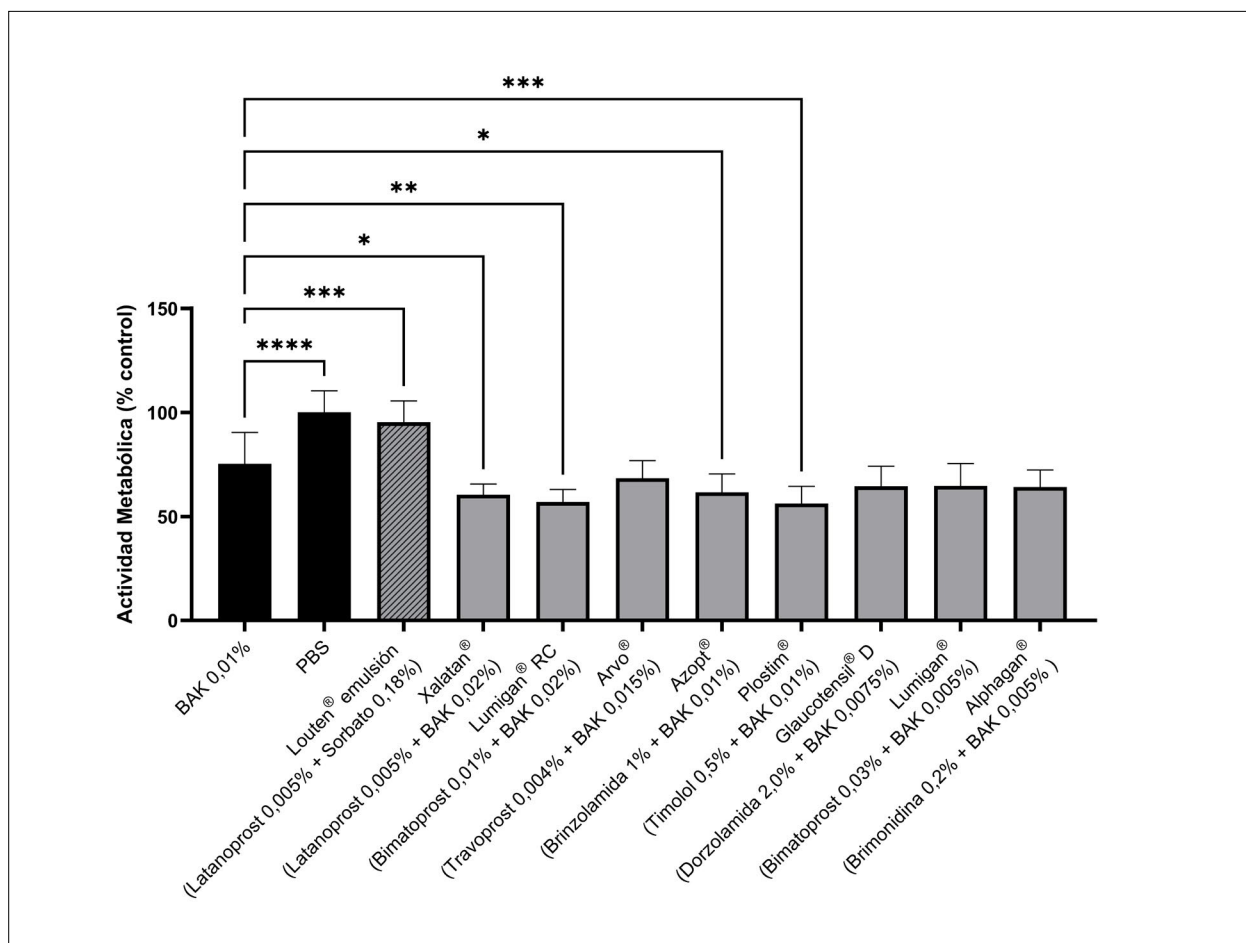


Figura 2. Efecto de las formulaciones antiglaucomatosas comerciales sobre la actividad metabólica de células epiteliales corneales humanas (HCEC). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett frente al control con BAK 0,01%. * indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$.

podría mitigar, en la mayoría de los casos, la toxicidad asociada al tratamiento.

Estudios previos demostraron que la nanoe-mulsión de latanoprost previene la citotoxicidad asociada al BAK y mejora los signos y síntomas de la enfermedad de la superficie ocular en comparación con la solución de latanoprost 0,005% preservada con BAK¹⁰⁻¹¹. Adicionalmente, la nanoe-mulsión podría reducir la toxicidad intrínseca del propio latanoprost, posiblemente debido a la incorporación del principio activo dentro de los *nanocarriers*.

Aunque el efecto citotóxico de las formulaciones está determinado principalmente por los conservantes y los principios activos, es importante

considerar otros factores como el pH, la osmolaridad y los excipientes, que dependen de la formulación completa. Estos parámetros no fueron evaluados en el presente estudio, pero deberían tenerse en cuenta al analizar la citotoxicidad de las formulaciones oftálmicas^{10, 17}.

El presente estudio presenta ciertas limitaciones. El uso de una única línea celular y de un solo ensayo de viabilidad limita la posibilidad de explorar en detalle los mecanismos subyacentes. Además, las condiciones *in vitro* no reproducen con precisión factores fisiológicos relevantes, como la dilución por la película lagrimal, el parpadeo o el tiempo de permanencia de cada formulación sobre la superficie ocular, los que

pueden influir en la citotoxicidad epitelial *in vivo*. No obstante, estos hallazgos constituyen un punto de partida valioso y respaldan el desarrollo de futuras investigaciones que incorporen técnicas complementarias capaces de simular con mayor fidelidad la fisiología ocular humana y validar los resultados observados.

Conclusiones

Estos resultados subrayan la importancia de considerar la formulación completa al seleccionar un tratamiento crónico. El latanoprost en nanoemulsión sin BAK fue la única formulación que no alteró la viabilidad celular, lo que destaca su perfil de seguridad. El significado clínico de estos resultados deberá evaluarse mediante futuros estudios.

Referencias

1. Erb C, Gast U, Schremmer D. German register for glaucoma patients with dry eye. I. Basic outcome with respect to dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246(11): 1593-1601. doi: 10.1007/s00417-008-0881-9.
2. Barria von Bischchoffshause F, Jiménez Roman J. *Guía latinoamericana de glaucoma primario de ángulo abierto*. Pantego, TX: Pan-American Association of Ophthalmology (PAAO), 2019, p. 1-93.
3. European Glaucoma Society. Terminology and guidelines for glaucoma, 5th edition. *Br J Ophthalmol* 2021; 105(Suppl 1): 1-169. doi: 10.1136/bjophthalmol-2021-egsguidelines.
4. Kolko M, Gazzard G, Baudouin C, Beier S, Brignole-Baudouin F, Cvenkel B, Fineide F, Hendengran A, Hommer A, Jespersen E, Messmer EM, Murthy R, Sullivan AG, Tatham AJ, Utheim TP, Vittrup M, Sullivan DA. Impact of glaucoma medications on the ocular surface and how ocular surface disease can influence glaucoma treatment. *Ocul Surf* 2023; 29: 456-468. doi: 10.1016/j.jtos.2023.05.012.
5. Gomes JAP, Azar DT, Baudouin C, Efron N, Hirayama M, Horwath-Winter J, Kim T, Mehta JS, Messmer EM, Pepose JS, Sangwan VS, Weiner AL, Wilson SE, Wolffsohn JS. TFOS DEWS II iatrogenic report. *Ocul Surf* 2017; 15(3): 511-538. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.004.
6. Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther* 2001; 18(5): 205-215. doi: 10.1007/BF02853166.
7. Zhou X, Zhang X, Zhou D, Zhao Y, Duan X. A narrative review of ocular surface disease related to anti-glaucomatous medications. *Ophthalmol Ther* 2022; 11(5): 1681-1704. doi: 10.1007/s40123-022-00557-0.
8. Baudouin C, Kolko M, Melik-Parsadaniantz S, Messmer EM. Inflammation in glaucoma: from the back to the front of the eye, and beyond. *Prog Retin Eye Res* 2021; 83: 100916. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100916.
9. Yanochko GM, Khoh-Reiter S, Evans MG, Jessen BA. Comparison of preservative-induced toxicity on monolayer and stratified Chang conjunctival cells. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(4): 1324-1331. doi: 10.1016/j.tiv.2010.02.001.
10. Tau J, Passerini MS, Del Papa M, Aguilar A, Berra A. A novel ophthalmic latanoprost 0.005% nanoemulsion: a cytotoxicity study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2022; 260(6): 1941-1946. doi: 10.1007/s00417-021-05536-y.
11. Casiraghi JF, Grigera D, Alejo Peyret J, Papa M del, Passerini MS. Efficacy and tolerability of a new latanoprost 0.005% BAK-free nanoemulsion: a nonrandomized open-label trial. *ReGEN Open* 2021; 1(1): 110-116.
12. Paimela T, Ryhänen T, Kauppinen A, Marttila L, Salminen A, Kaarniranta K. The preservative polyquaternium-1 increases cytotoxicity and NF-kappaB linked inflammation in human corneal epithelial cells. *Mol Vis* 2012; 18: 1189-1196.
13. Noecker RJ, Herrygers LA. Effect of preservatives in chronic ocular therapy. *Clin Surg Ophthalmol* 2003; 21(3): 88-94.
14. Walsh K, Jones L. The use of preservatives in dry eye drops. *Clin Ophthalmol* 2019; 13: 1409-1425. doi: 10.2147/OPTH.S211611.
15. Robciuc A, Witos J, Ruokonen SK, Rantamäki AH, Pisella PJ, Wiedmer SK, Holopainen JM. Pure glaucoma drugs are toxic to immortalized human corneal epithelial cells, but they do not destabilize lipid membranes.

Cornea 2017; 36(10): 1249-1255. doi: 10.1097/ICO.0000000000001322.

16. Kahook MY, Ammar DA. In vitro toxicity of topical ocular prostaglandin analogs and preservatives on corneal epithelial cells. *J Ocul*

Pharmacol Ther 2010; 26(3): 259-263. doi: 10.1089/jop.2010.0003.

17. European Glaucoma Society. *Terminología y pautas para el glaucoma*. 5a. ed. Savona: European Glaucoma Society, 2025.