

ORIGINALES

Artículo bilingüe inglés/castellano

Evaluation of the *in vitro* ocular toxicity of the fortified antibiotic eye drops prepared at the Hospital Pharmacy Departments

Evaluación de la toxicidad ocular *in vitro* de los colirios fortificados antibióticos elaborados en los Servicios de Farmacia Hospitalaria

Anxo Fernández-Ferreiro^{1,2,3}, Miguel González-Barcia^{1,2}, María Gil-Martínez^{5,6},
María Santiago-Varela⁵, María Pardo⁷, José Blanco-Méndez^{3,4}, Antonio Piñeiro-Ces⁵,
María Jesús Lamas^{1,2} and Francisco J. Otero-Espinar^{3,4}

¹Pharmacy Unit, Xerencia de Xestión Integrada of Santiago de Compostela, SERGAS, Santiago de Compostela. ²Clinical Pharmacology Group, Health Research Institute (IDIS-ISCI), Santiago de Compostela. ³Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. ⁴Industrial Pharmacy Institute, Universidad de Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela. ⁵Ophthalmology Unit, Xerencia de Xestión Integrada of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. ⁶Ophthalmological Institute Gómez-Ulla, Santiago de Compostela. ⁷Obesidomics Group, Health Research Institute (IDIS-ISCI), SERGAS, Santiago de Compostela. Spain.

Abstract

The use of parenteral antibiotic eye drop formulations with non-marketed compositions or concentrations, commonly called fortified antibiotic eye drops, is a common practice in Ophthalmology in the hospital setting. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* ocular toxicity of the main fortified antibiotic eye drops prepared in the Hospital Pharmacy Departments. We have conducted an *in vitro* experimental study in order to test the toxicity of gentamicin, amikacin, cefazolin, ceftazidime, vancomycin, colistimethate sodium and imipenem-cilastatin eye drops; their cytotoxicity and acute tissue irritation have been evaluated. Cell-based assays were performed on human stromal keratocytes, using a cell-based impedance biosensor system [xCELLigence Real-Time System Cell Analyzer (RTCA)], and the Hen's Egg Test for the ocular irritation tests.

All the eye drops, except for vancomycin and imipenem, have shown a cytotoxic effect dependent on concentration and time; higher concentrations and longer exposure times will cause a steeper decline in the population of stromal keratocytes. Vancomycin showed a major initial cytotoxic effect,

Resumen

El uso de reformulaciones de antibióticos parenterales en forma de colirios de composición o concentraciones no comercializadas, comúnmente denominados colirios antibióticos reforzados, es una práctica habitual en oftalmología a nivel hospitalario. El objetivo del presente trabajo ha consistido en evaluar la toxicidad ocular *in vitro* de los principales colirios antibióticos reforzados elaborados en los Servicios de Farmacia Hospitalaria. Hemos realizado un estudio experimental *in vitro* para evaluar la toxicidad de los colirios de gentamicina, amikacina, cefazolina, ceftazidima, vancomicina, colistimetato de sodio e imipenem-cilastatina en el que se ha evaluado su citotoxicidad y la irritación tisular aguda. Los ensayos celulares se realizan sobre queratocitos estromales humanos, mediante la utilización de un sistema biosensor de impedancia celular [xCELLigence Real-Time System Cell Analyzer (RTCA)] y los ensayos de irritación ocular mediante el ensayo Hen's Egg Test.

Todos los colirios, excepto vancomicina e imipenem, han mostrado un efecto citotóxico de concentración y tiempo dependiente, siendo las concentraciones más altas y los tiempos más prolongados los que provocan un descenso más pronunciado en la población de queratocitos estromales. La vancomicina muestra un importante efecto citotóxico inicial que revierte

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: anxordes@gmail.com (Anxo Fernández-Ferreiro).

Correo electrónico: maria.jesus.lamas.diaz@sergas.es (María Jesús Lamas Díaz).

Correo electrónico: francisco.otero@usc.es (Francisco J. Otero Espinar).

Recibido el 30 de noviembre de 2015; aceptado el 30 de mayo de 2016.

DOI: 10.7399/fh.2016.40.5.10416



Los artículos publicados en esta revista se distribuyen con la licencia:
Articles published in this journal are licensed with a:
Creative Commons Attribution 4.0.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

La revista Farmacia Hospitalaria no cobra tasas por el envío de trabajos, ni tampoco cuotas por la publicación de sus artículos.

which was reverted over time; and imipenem appeared as a non-toxic compound for stromal cells. The eye drops with the highest irritating effect on the ocular surface were gentamicin and vancomycin.

Those antibiotic eye drops prepared at the Hospital Pharmacy Departments included in this study were considered as compounds potentially cytotoxic for the ocular surface; this toxicity was dependent on the concentration used.

KEYWORDS

Ocular cytotoxicity; Bacterial keratitis; Fortified antibiotic eye drops; Colistin eye drops; Vancomycin eye drops; Gentamicin eye drops; Amikacin eye drops; Cefazolin eye drops; Ceftazidime eye drops; Imipenem eye drops

Farm Hosp. 2016;40(5):352-370

Contribution to scientific literature

The present article represents the first published paper on the *in vitro* ocular toxicity of fortified antibiotic eye drops prepared by the Hospital Pharmacy Departments, using for this aim innovative techniques of bioimpedance and real-time follow-up of the performance of stromal kerocytes when these are in contact with different antibiotic concentrations, as well as an evaluation of acute ocular irritation through the Het-Cam assay.

The outcomes obtained can be useful for making clinical decisions and pharmaceutical recommendations, at the time of selecting the formulation and subsequent use of the eye drops which are less toxic for the ocular surface. On the other hand, these outcomes show the need for conducting future research to allow the determination of optimal concentrations of effective and non-toxic antibiotics for the treatment of infectious keratitis.

Introduction

Currently there are several ophthalmic medications with proven efficacy, that have not been marketed due to economic reasons or stability problems, leaving a significant number of patients on a delicate situation, and forcing ophthalmologists to resort to alternative treatments^{1,2}. In order to cover this therapeutic gap, there has been an increase in the use of pharmaceutical compounds or medications obtained through handling, "reformulation", or adaptation for ocular administration of formulations prepared for other ways of administration³. In tertiary hospitals, such as the *Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela*, the most frequent are sterile formulations, with approximately 10,000 units per year.

Healthy corneal epithelium will almost always represent a barrier impossible to cross by any microorganism⁴. However, an epithelial defect can be the substrate for developing an infected corneal ulcer. Bacterial keratitis is a potentially severe condition, which can lead to loss of vision by scarring or perforation⁵. There is no consensus regarding the initial management for treating severe

con el transcurso del tiempo y el imipenem se muestra como un compuesto no tóxico para las células estromales. Los compuestos con mayor efecto irritante para la superficie ocular son la gentamicina y la vancomicina.

Los colirios antiinfecciosos elaborados en los Servicios de Farmacia Hospitalaria estudiados se muestran como compuestos potencialmente citotóxicos para la superficie ocular, siendo esta toxicidad dependiente de la concentración utilizada.

PALABRAS CLAVE

Citotoxicidad ocular; Queratitis bacterianas; Colirios antibióticos reforzados; Colirio colistina; Colirio vancomicina; Colirio gentamicina; Colirio amikacina; Colirio cefazolina; Colirio ceftazidima; Colirio imipenem

Farm Hosp. 2016;40(5):352-370

bacterial keratitis, and different therapeutic regimens are currently used, ranging from fluoroquinolones as monotherapy to the combination of fortified antibiotic eye drops such as vancomycin and ceftazidime^{6,7}. The use of reformulations of parenteral antibiotics as eye drops with non-marketed composition or concentrations, commonly referred to as Fortified Antibiotic Eye Drops (FAEDs), is a common practice in Ophthalmology within the hospital setting since the 70s⁸. These products are typically used when the agent causing the condition is suspected to be resistant to Marketed Antibiotic Eye Drops (MAEDs), particularly for the treatment of severe bacterial keratitis. The treatment objectives include: the eradication of the bacteria causing the keratitis, and the fast suppression of the inflammatory response induced by these microorganisms, thus avoiding structural damage to the cornea⁹. However, the use of these products has also caused major complications in the ocular tissue, due to their toxicity¹⁰.

In order to improve the safety of those patients receiving topical ocular treatment, it is essential to estimate, as accurately as possible, the potential of causing irritation by any compound that can come in contact with the eye and its adjacent structures^{11,12}. The objective of this paper has been to evaluate the *in vitro* ocular toxicity of the main FAEDs prepared at the Hospital Pharmacy Departments.

Material and methods

An experimental *in vitro* study to evaluate the safety of the antibiotics eye drops preparations used for treatment of bacterial keratitis. Table 1 shows the composition and main characteristics of the eye drops studied.

Collection of the primary culture of stromal keratocytes

Corneal fragments were incubated during 10 minutes in trypsin at 37° C according to the Modified Method by Ramke¹³, followed by the mechanical elimination of endothelium and epithelium. The corneal stroma was cut into 2 mm sections, that were immersed in Dulbecco's

Table 1. Description of the characteristics of the fortified antibiotic eye drops prepared at the pharmacy unit.

Eye drops	Baseline marketed presentation	Excipients of the marketed presentation	Diluent	pH	Osmolality (mOsmol/kg)	pH (1:1) with DMEN-FBS)
Amikacin 33 mg/ml (56 mM)	Amikacin 500 mg/ml Normon EFG (generic).	Sodium chloride, sodium hydroxide (for pH adjustment) and water for injection.	BSS	5.0	395	5.5
Gentamicin 15 mg/ml (26 mM)	Gentamicin Braun 1 mg/ml solution for intravenous infusion. EFG (generic).	9 mg/ml Sodium chloride and water for injectables.	PSS 0.9%	4	244	5.5
Cefazolin 50 mg/ml (104.6 mM)	Cefazolin Normon 1 g IV powder and diluent for injectable solution. EFG (generic).	Water for injection.	PSS 0.9%	5.5	495	7
Ceftazidime 50 mg/ml (78 mM)	Ceftazidime Normon 1 g powder and diluent for injectable solution. EFG (generic).	Sodium carbonate and water for injection.	API+BSS	6.5	352	7.5
Vancomycin 50 mg/ml (33 mM)	Vancomycin Normon 500 mg EFG (generic).	None.	BSS	5.2	323	6
Imipenem Cilastatin 5 mg/ml (15.75 mM)	Tienam IV 500/500 mg/powder for injectable solution.	Sodium bicarbonate.	PSS 0.9%	6.7	290	7.5
Colistin 10 mg/ml (5.71 mM)	Colistimethate sodium GES 1 mUl.	None.	API	8	55	7.9

*The measures of osmolality (mOsmol/kg) and pH of eye drops prepared at the Hospital Pharmacy have been determined with a Vapor Pressure Osmometer (VAPRO 5520) and a pHmeter (WTW inoLab®).
Abbreviations: BSS (Alcon®Balanced Saline Solution); PSS (Fresenius®Physiological Saline Solution 0.9%).

Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham F-12 supplemented with bovine foetal serum at 10%, with 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 IU of penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 50 mg/ml gentamicin). Once the human keratocytes (HKCs) have proliferated at 37°C and 5% CO₂, the tissue pieces are removed. All experiments were conducted between the steps 4 and 10. Cells were collected from the rests of human corneas used for corneal transplant, according to the ethical rules established by the centre. The study has been authorized by the Research Ethics Committee, within the project "Development of safe and effective therapeutic alternatives to be used in the treatment of ocular surface conditions".

Basis of the Cell Cytotoxicity Assay

Cell-based assays were performed using a cell-based impedance biosensor system (xCELLigence Real-Time System Cell Analyzer (RTCA)¹⁴. This system uses electronic microchips that measure changes in the impedance between the electrodes and the solution. When the cell adheres to the plate (E-plate 16 by Acea Bioscience), there is an increase in resistance, and as a result, an increase in impedance. Impedance values are transformed by using a mathematical algorithm in a parameter called Cell Index (CI)¹⁵. A low CI represents a lower number of cells

that bind to the microelectrode, and an increase in CI can be caused by an increase in the number of cells¹⁶, thus all changes are detected continuously and in real time. For the cytotoxicity study, CI values are expressed as normalized CI (NCI), where $CI_{(t)}$ is CI at any time, and $CI_{(t \text{ of the dose})}$ is the CI at the time of adding the medications studied to the culture media. The FAED concentrations tested are based initially on the concentration of the eye drops used for treatment, in order to conduct subsequent dilutions. The outcomes achieved appear on the graphs that show the dynamic changes, representing NCI since the addition of the compounds and over time for each of the concentrations tested. The compound concentrations that caused a 50% reduction in the Cell Index were calculated (Software RTCA System®) by interpolation in the graphs, through which the normalized response activity is represented (%); this parameter is called CI50, and it is expressed in Molar Concentration Units¹⁷.

Methodology of the Cytotoxicity Assays

Cell cytotoxicity has been evaluated using the RTCA. There is an initial determination of the optimal number of cells required to achieve a CI around 1.0 in logarithmic growth stage¹⁸, the optimal moment to incorporate the medications and watch cell behaviour. A 150 microlitre

volume of a 3000 cells per plate suspension (the optimal number of cells determined in previous studies¹⁹), was incubated during 24 hours until a CI value close to one was reached. At that moment, the culture media was renewed, now containing the medications in different concentrations. After the addition of the medications, cell behaviour, measured as NCI, was recorded without interruptions and automatically every 15 minutes during 24 hours.

Cytotoxicity results determined with the RTCA were confirmed by conducting the Mitochondrial Activity Assay WST-1® (Cell Proliferation Reagent WST-1 by Roche Applied Science). This cytotoxicity technique through the WST-1 reagent (tetrazolium / formazan salts) consists in a colorimetric assay, with spectrophotometric quantification (220 nm wave length) based on the degradation of tetrazolium salts [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] to formazan salts, through the action of mitochondrial dehydrogenase which appears naturally when cells are viable. Measurements were con-

ducted at short contact times (30 minutes) with a concentration of antibiotics 1:10 compared with the original.

Ocular irritation assay "The Hen's Egg Test" (Het-Cam)

Fecundated broiler chicken eggs are required for the development of the HET-CAM assay. These are introduced in a climatic chamber until the chorioallantoic membrane (CAM) is fully developed; the FAEDs will be placed in contact with this membrane, in order to determine subsequently the Irritation Index (II) following the methodology described in detail in previous articles. If scores between 0 and 0.9 are reached in the II, the substance is considered as non-irritating; between 1 and 4.9, as slightly irritating, between 5 and 9.9, moderately irritating, and from 10 to 21, as severely irritating²⁰. For each one of the substances, the original FAED concentration has been tested, using a different egg for each, and conducting each of the assays independently and in triplicate. The calculation was conducted as the mean of

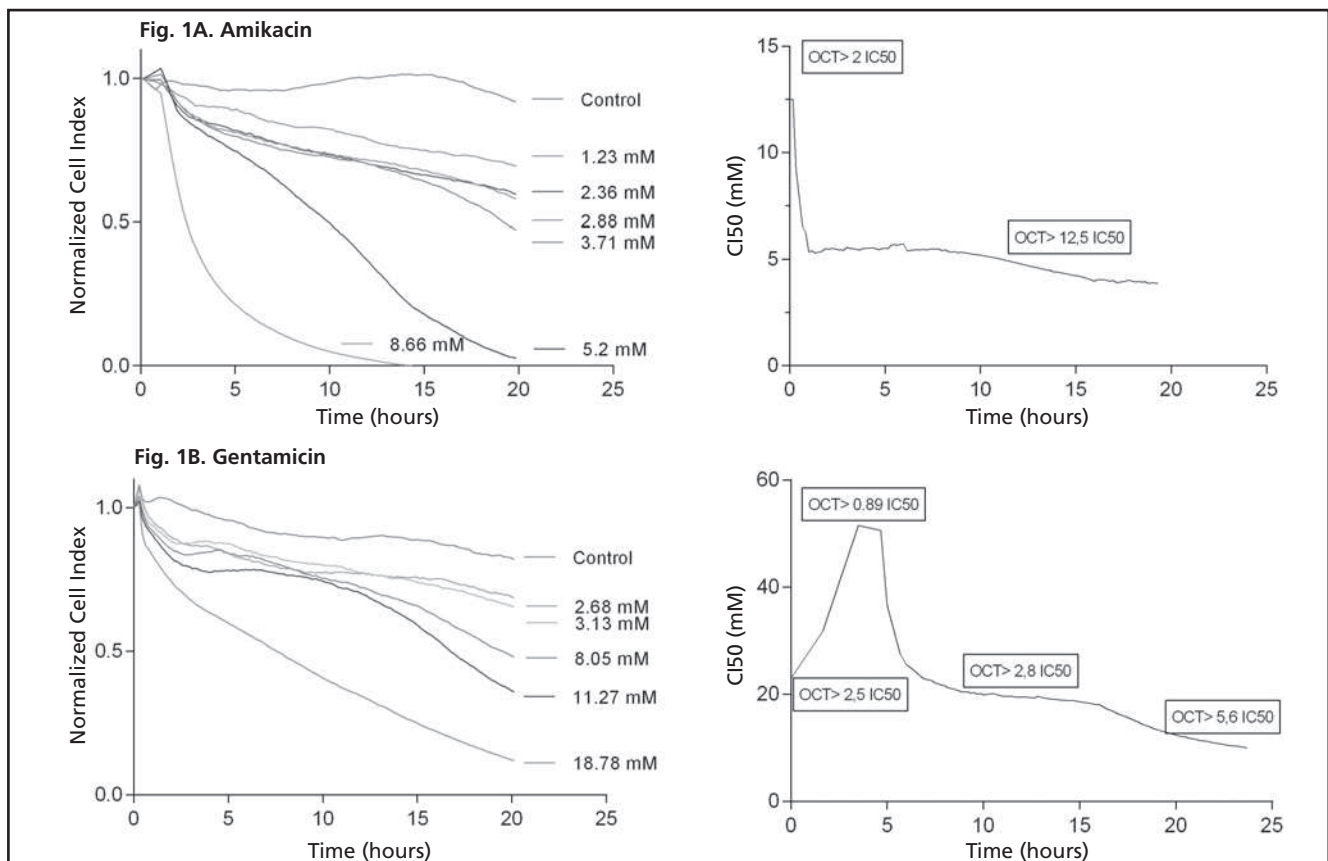


Figure 1. Cytotoxicity kinetics (left) and evolution of the CI50 over time (right) of fortified aminoglycoside eye drops.

Fig. 1A. The keratocyte population is reduced progressively with the increase in amikacin concentration. It causes a major cellular death almost instantly, obtaining CI50 values of 22 mM [the original concentration used in treatment (OCT) is 2.5 times superior to this value]; however, there seems to be a recovery period during 4 hours, where it reaches CI50 values similar to OCT, but from then on cells will relapse, causing a major reduction in their number, and at 10 hours the CI50 is 20 mM (OCT is 2.8 times superior to the CI50); therefore, it becomes more intense over time.

Fig. 1B. Gentamicin, just as amikacin, causes a great destruction of keratocytes almost instantly, presenting CI50 of 12.5 mM (OCT is twice superior to CI50), and presenting a sharp reduction until CI50 values of 5 mM are reached, that can even become 4 mM at 20 hours (OCT is 12.5 superior to CI50).

the sum of the individual scores of all final points in each one of the replicates.

RESULTS

Aminoglycosides

Amikacin and gentamicin present similar toxicity kinetics (Fig. 1), causing gradual cell death over time; they can even eliminate the complete population of keratocytes with the highest concentrations tested at prolonged times. At the initial time of contact, keratocytes present similar toxic sensitivity for both aminoglycosides (the OCT is twice superior to CI50 in both cases); however, it is confirmed that, at prolonged times, gentamicin appears much more toxic than amikacin. This can be because the gentamicin dilution presents a hypoosmolality that can even be toxic for stromal keratocytes²¹. On the

other hand, regarding the II determined by HET-CAM, it has been observed that amikacin acts like a non-irritating compound ($II=4.61 \pm 2$) while gentamicin acts like a severely irritating compound ($II=10.35 \pm 1$).

Betalactams

Betalactam eye drops (Cefazolin and Ceftazidime) show a similar evolution in cellular kinetics. Initially, and almost immediately after adding the diluted medication in the culture media, a CI reduction is observed, with subsequent recovery; this is temporary and declines abruptly at longer times (Fig. 2). In some occasions, those cells exposed to cytotoxics can induce a higher temporary cell index, which will usually appear in early or late stages of exposure to the toxic substance. This can be due to the occasional effect of toxicity causing cellular groups ("clusters") that lead to higher contact with the electrode, and therefore an additio-

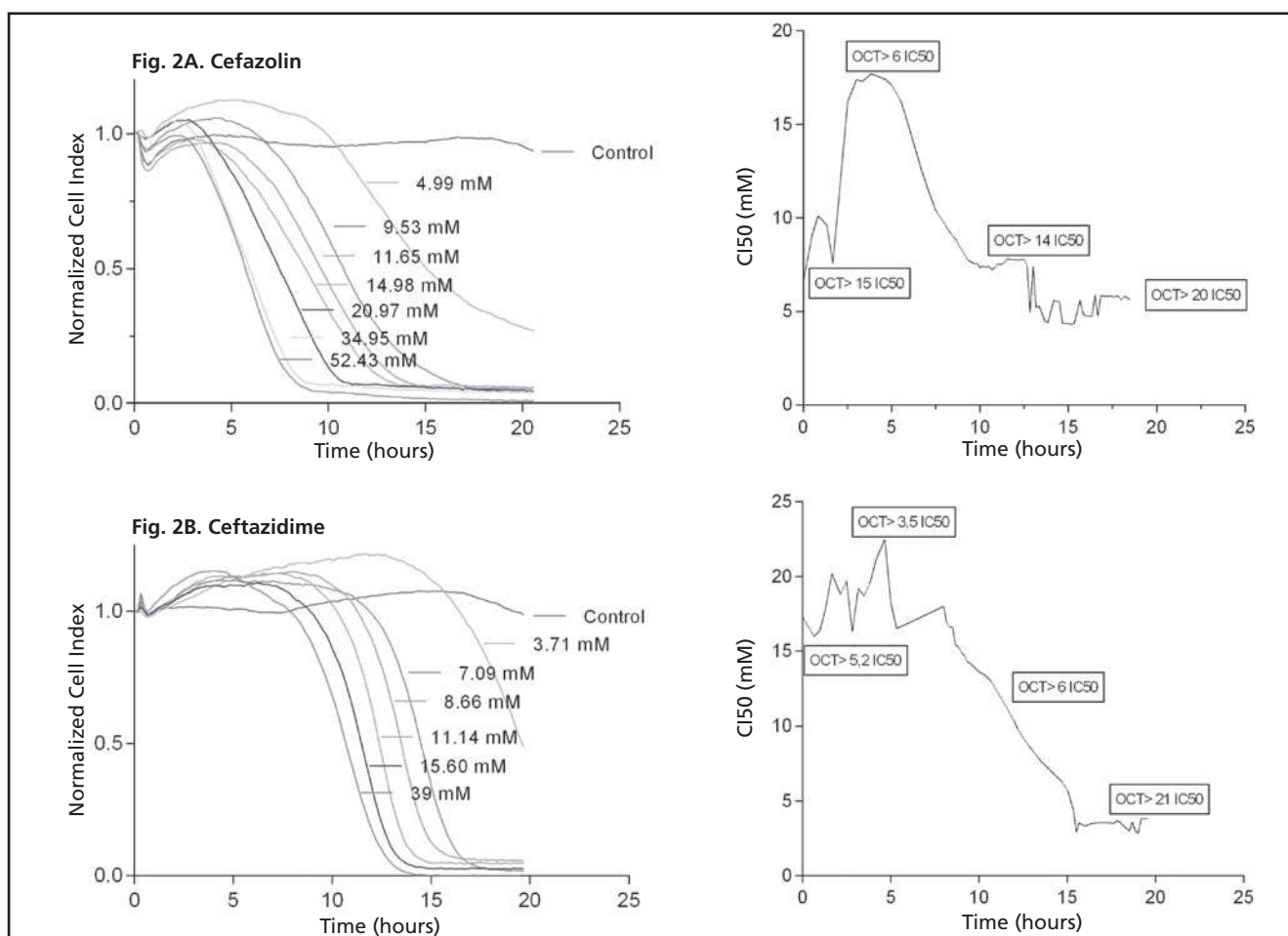


Figure 2. Cytotoxicity kinetics (left) and evolution of the CI50 over time (right) of fortified cephalosporin eye drops.

Fig. 2A. Cefazolin shows very high toxicity values during the initial contact, and CI50 values of 6.64 mM can be detected (OCT is 15 times superior to the value of CI50). Subsequently, it shows a slight recovery, which can be quantified with CI50 values of 17.7 mM at 5 hours (OCT is 6 times superior to CI50); from then on, there is a significant decline, presenting CI50 of 7.23 mM at 10 hours and 5.8 mM at 20 hours (OCT is 14 and 20 times superior to CI50, respectively).

Fig. 2B. Ceftazidime shows a similar profile to cefazolin. Initially, the OCT is 5 times superior to CI50 (15 mM), showing a certain subsequent recovery up to 22 mM values (OCT is 3.5 times superior to CI50), and there is an abrupt descent from 8 hours on. At 10 hours, CI50 values are 13 mM, and at 20 hours, 3.7 mM (OCT is 6 and 21 times superior to these CI50 values, respectively).

nal increase in the NCI¹⁸. These types of cellular kinetics in the presence of exposure to toxics have also been shown by compounds such as arsenic^{22,18}. Regarding the irritation index of these eye drops, it must be said that both of them present an II classified as slightly irritating, with values of 4.65 ± 1 for cefazolin and 4.56 ± 1 for ceftazidime.

Glycopeptides

Figure 3 shows the effect of vancomycin on stromal keratocytes. This drug presents gradual toxicity over time, reaching very low CIs over short contact times at the highest concentrations; lower concentrations are not toxic. On the other hand, it has presented irritation indexes of 9.6 ± 2 , and is therefore classified as a substance moderately irritating for the eye.

Colistimethate sodium eye drops

Colistin eye drops present major toxicity at cellular level, at all concentrations tested. Said toxicity might be

probably due to its tensioactive effect, which is also the cause of its therapeutic mechanism of action: this is an antibiotic of the polymyxin group, which acts by binding and altering the permeability of the bacterial cellular membrane, thus causing cellular death²³. Figure 4 shows that, after contact with colistin diluted in the culture media, the compound presents a CI50 of 2.43 mg/ml (the OCT is 4.23 times superior to CI50), and becomes even more toxic over time, reaching a CI50 of 0.48 mg/ml at 10 hours after contact (the OCT is 20 times superior to CI50). The compound appears as extremely toxic at all concentrations tested; however, the irritation test for these eye drops has been negative in the HET-CAM assay.

Imipenem-cilastatin eye drops

Figure 5 shows that no reduction in NCI is observed with any of the imipenem concentrations tested, leading to its increase vs. the control. Imipenem eye drops pre-

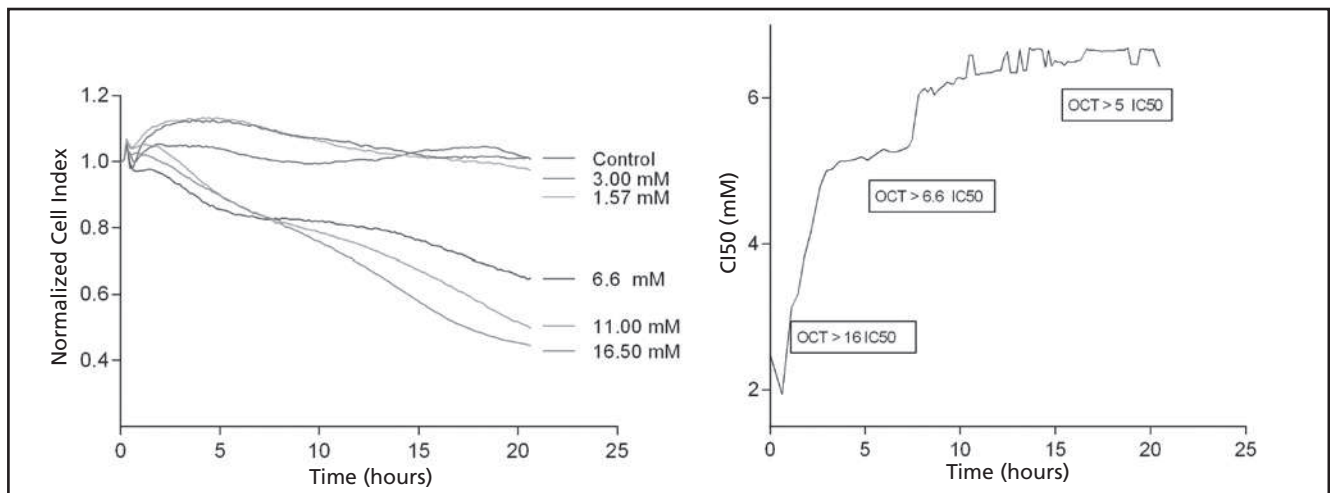


Figure 3. Cytotoxicity kinetics (left) and CI50 evolution over time (right) of the fortified vancomycin eye drops. Vancomycin causes almost instantly a major cellular death during the first three hours of contact, reaching CI50 values of 1.94 mM (OCT is 16 times superior to this value); however, the toxic potential seems to diminish slightly, increasing the CI50 up to 6.45 mM at 15 hours (OCT is 5 times superior to the CI50 values).

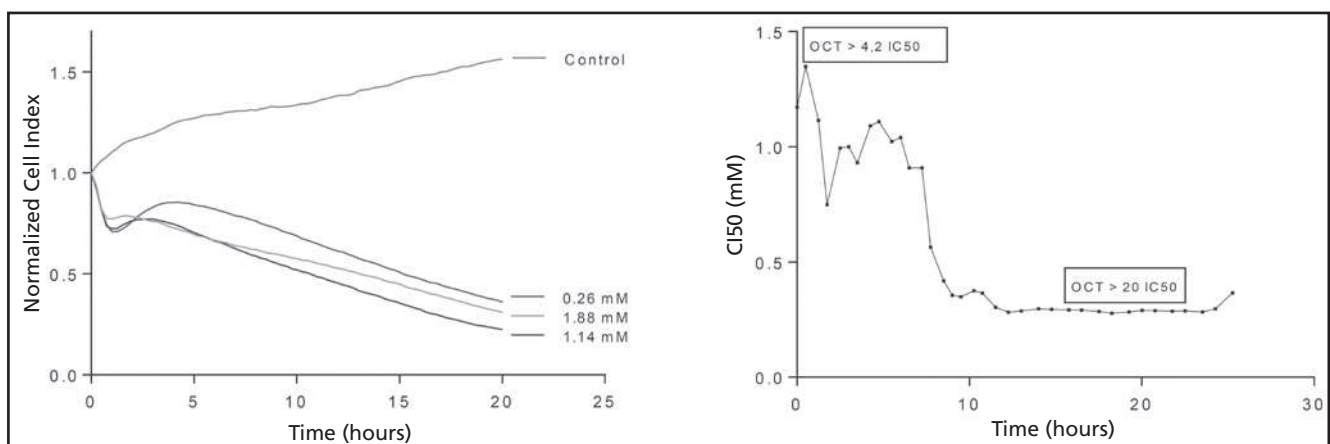


Figure 4. Cytotoxicity kinetics (left) and CI50 evolution over time (right) of the fortified colistin eye drops.

sent a broad spectrum of antibacterial action, and based on the results observed, it can be stated that their use would not be toxic for stromal cells, and could even act as a proliferative factor for these, therefore representing a safe treatment option. Moreover, these eye drops have presented negative values for irritation levels through HET-CAM.

Mitochondrial activity WST-1 assay

The WST-1 assay was conducted in order to confirm that changes in NCI were due to a reduction in the keratocyte population. As can be observed in figure 6, compared with the result obtained with the culture media (where cells are not in contact with antibiotics), there are similar changes to those observed in the dynamic graphs of toxicity. Thus, it can be observed that aminoglycosides, and particularly vancomycin, present an important

toxicity. On the contrary, those cells in contact with betalactams present similar viability to control cells; this is probably due to the fact that, at short times of contact, cells are reorganized in clusters in order to protect themselves against toxic agents, and therefore there is an increase in NCI but not in cell number. On the contrary, imipenem seems to show a positive effect on keratocyte proliferation; these effects have already been observed in the RTCA assay.

Discussion and conclusion

Different authors have focused their research on the improvement of corneal regeneration after an aggression on this surface^{24,25} and the replacement of the damaged cornea by an artificial one²⁶. However, there has not been enough research in this field yet for translating

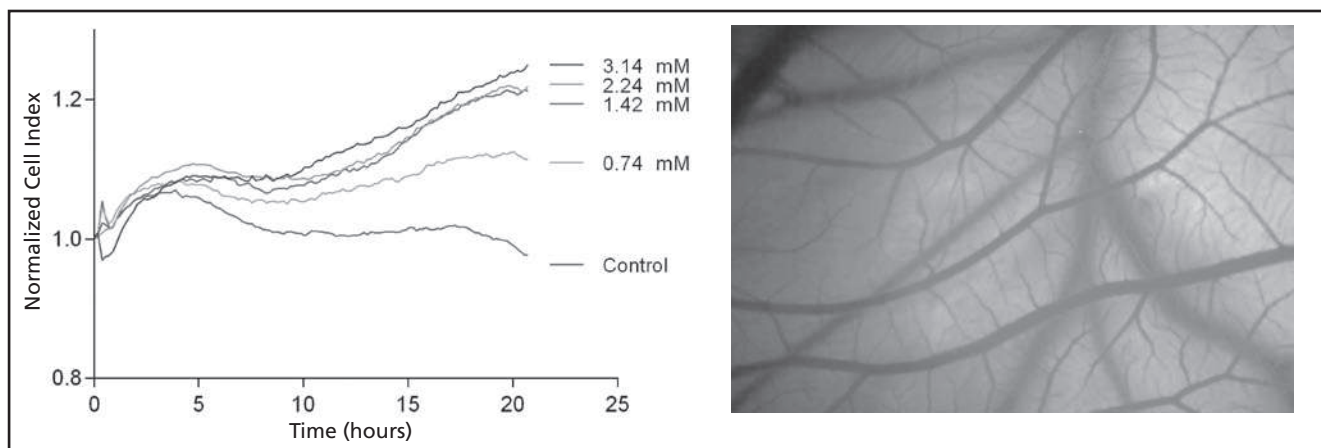


Figure 5. Cytotoxicity kinetics (left) and CAM appearance after a 5 minute contact with imipenem eye drops. **Left:** The use of imipenem eye drops would not be toxic for stromal cells, and could even act like a proliferative cellular factor, and therefore it could represent a safe treatment alternative against pathogens sensitive to this antibiotic agent. None of the concentrations tested showed NCI reduction, but caused an increase compared with the control. **Right:** Image of the chorioallantoic membrane after five minutes of contact with the imipenem eye drops, where no visible damage can be observed in blood vessels, indicating the lack of irritating effect at ocular level.

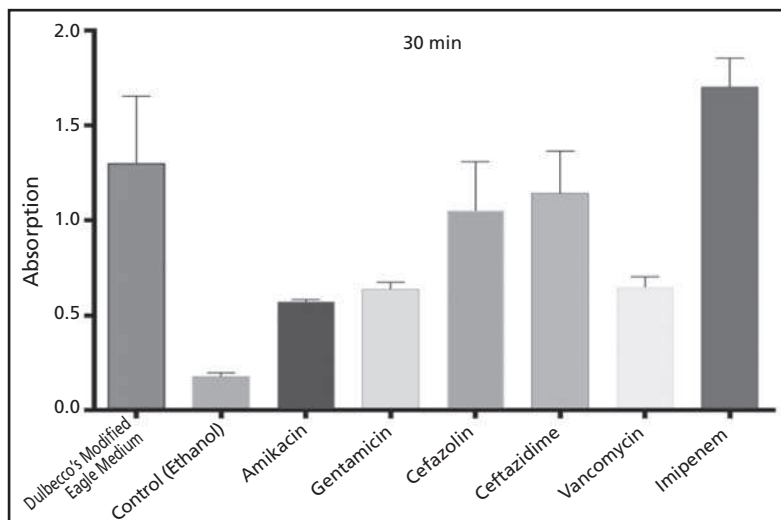


Figure 6. WST-1 results of fortified antibiotic eye drops after 30 minutes of contact with stromal keratocytes.

outcomes to clinical practice. On the other hand, lack of adherence is known to be one the most important causes for the therapeutic failure of pharmacological topical ocular treatments; the main factors involved are ocular discomfort (irritation) and toxicity causing corneal lesions^{19,27,28}. For all this, it is necessary to identify the most toxic ocular compounds, and adapt as much as possible the concentration which is effective and not harmful for the ocular surface.²⁹

The most frequent agents causing bacterial keratitis are usually those found in normal flora, such as Gram positive cocci (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) and Gram negative bacteria (*Pseudomonas* and *Enterobacter*), which

are less frequent, but very aggressive, and are mostly present in contact lens users and immunodepressed patients⁴. The values of the minimum inhibitory concentration (MIC) that will determine the breakpoint for each microorganism and antibiotic agent have been established by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST MIC breakpoints)³⁰. These *in vitro* breakpoints have been useful as predictors of the clinical efficacy of antibiotics when administered systemically, and therefore cannot be applied to ophthalmic administration, because the concentrations achieved in the eyes are very superior to these. FAED concentrations have been arbitrarily determined since they started being used, without reconsidering if they were the most adequate.

Table 2. Spectrum of activity of the main fortified antibiotic eye drops used in clinical practice

	Vancomycin	Cefazolin	Ceftazidime	Gentamicin	Amikacin	Imipenem	Colistin
GRAM POSITIVE	Streptococcosp. (Groups A,B,C,G)	+	+	+		+	
	Strept. pneumoniae	+	+	±		+	
	Streptococcus viridans	+	+	±		+	
	Enterococcus faecalis	±				+	
	Enterococcus faecium	±				±	
	S. aureus MSSA	+	+	±	+	+	+
	S.aureus MRSA	+					
	C. epidermidis	+	±	±	±	+	+
	Corynebacterium jeikeium	+					
	Listeria monocytogenes	+					
GRAM NEGATIVE	Neisseria gonorrhoeae		+	±		+	
	Neisseria meningitidis			±		+	
	Moraxella catarrhalis		±	+	+	+	+
	Haemophilus influenzae		+	+	+	+	+
	E.Coli		+	+	+	+	+
	Klebsiella		+	+	+	+	+
	Enterobacter spp			+	+	+	+
	Serratia spp			+	+	+	+
	Salmonell spp			+			+
	Shigella spp			+	+	+	+
	Proteus mirabilis		+	+			+
	Proteus vulgaris			+	+	+	+
	Providencia spp			+			+
	Morganella spp			+			+
	Pseudomona aeruginosa			+	+	+	+
Legionella spp						+	
ANAEROBIC	Actinomyces	+				+	
	Bacteroides fragilis					+	
	Clostridium difficile	+				+	
	Clostridium no difficile	+		+		+	
	Peptostreptococcus			+		+	

(+): Active (±): Variable (): Not active

Ceftazidime eye drops are mostly used for infections by *Pseudomonas aeruginosa*, and their breakpoint has been placed at 8 µg/ml³¹. In the case of imipenem, the breakpoint for this pathogen is 4 µg/ml and the molecule concentration used for treatment is ten times lower to that of the ceftazidime eye drops; therefore, in both cases, the inhibitory rate required to achieve antimicrobial efficacy has been exceeded in thousands of times. In the outcomes achieved in this study, it has been demonstrated that imipenem eye drops are the ones showing lower toxicity for stromal cells, probably because it is the FAED with the lowest concentration of the molecule. Thus, and from the point of view of safety, it is positioned as one of the most appealing FAEDs for its formulation and use in keratitis requiring FAEDs and involving microorganisms within its spectrum of activity (Table 2). Other eye drops that could be potentially used for the treatment of keratitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* are the aminoglycosides and colistin; however, these show an important *in vitro* toxicity that could even limit their use. On the other hand, the use of vancomycin for the treatment of keratitis due to suspected Gram positive bacteria could be replaced by the use of eye drops such as ceftazolin 50 mg/ml, a less toxic option at short times of contact^{32,33,34}.

It must be considered that knowing the efficacy of the different FAEDs and their administration regimens is currently a complicated task, and unsolved for the time being, because there are few controlled studies with them. Currently, no conclusive data have been found that would allow us to consider that one FAED is more effective than another^{35,36}, and therefore the present study could direct towards the use of those that are less toxic. One of the lines of research to be explored is to obtain those administration platforms that contain the minimum concentrations of antibiotics that are effective during the longest time possible on the ocular surface³⁷, or including excipients such as cyclodextrins that can reduce the toxicity of certain molecules^{38,39}, and therefore optimize the treatment in the field of ocular infectious conditions.

On the other hand, it must be taken into account that each one of the compounds studied presents kinetic toxicity characteristics which depend on their concentration, time of exposure, and probably their own toxic mechanism of action: this last point is open for future research. It would also be necessary to consider other types of galenic factors, such as the molecule passing through the cornea, the influence of preservatives on ocular toxicity, the level of drug ionization, or the binding of the drug to tear proteins^{12,40}. Therefore, a new multidisciplinary scenario appears, that must be explored at galenic level, with the contribution by universities and health research institutes, in order to study in depth the formulation of antibiotic eye drops with high permanence in the cornea, that can include non-toxic concentrations of medications, and also research at pre-clinical

and clinical level, in order to study their efficacy through future multicenter studies.

Unless there are more advances in the determination of the effective dosing of antibiotics at topical corneal level, that will allow to reduce the concentrations of those FAEDs prepared at the Pharmacy Departments, we must prioritize the use of those with higher safety, taking into account that all FAEDs tested, except for vancomycin and imipenem, have shown cytotoxicity with an effect dependent on concentration and time. Thus, the highest concentrations and the longest periods of time will cause the highest reduction in the keratocyte population. Vancomycin shows an important cytotoxic effect initially, which is reverted over time; and imipenem appears as a non-toxic compound for stromal cells.

Conflict of Interests

There are no conflicts of interests by the authors of the present article.

Acknowledgements

Fundación Española de Farmacia Hospitalaria y Fundación Mutua Madrileña.

Bibliography

1. Menéndez de Lucas JA, Morcillo Laiz R. Medical and legal issues related to the drugs currently used in the treatment of Age-Related Macular Degeneration (ARMD). Arch Soc Esp Ophthalmol. julio de 2006;81(7):359-62.
2. García Salom P, Alonso Herreros JM. El real decreto de medicamentos en situaciones especiales y la farmacotecnia hospitalaria. Farm Hosp. mayo de 2010;34(3):103-5.
3. Herreros JMA. Preparación de medicamentos y formulación magistral para oftalmología. 1ª ed. Ediciones Díaz de Santos; 2003.
4. Garg A, Sheppard JD, Donnenfeld ED, Friedlaender MH. Clinical Applications of Antibiotics and Anti-Inflammatory Drugs in Ophthalmology. 1st ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
5. José A. Zumieta Santamaría, Miren Gotzone Barbarías Salinas, Juan San Cristóbal Epalza. Manual de urgencias de oftalmología. 1ª ed. Alcon. 2012
6. Fernández-Ferreiro A, Gonzalez Barcia M. Farmacoterapia ocular. En: Jose Luis Poveda. Manual para el residente de primer año de farmacia hospitalaria. 1ª ed. Madrid:Edimsa. 2014. p. 229-249
7. Bremond-Gignac, Bremond-Gignac, F. Chiambaretta, S. Milazzo. A European Perspective on Topical Ophthalmic Antibiotics: Current and Evolving Options. Ophthalmol Eye Dis. 2011; 3:29-43.
8. Chiquet C, Romanet J-P. Prescrire les collyres fortifiés. J Fr Ophtalmol. 2007;30(4):423-30.
9. Hsu HY, Nacke R, Song JC, Yoo SH, Alfonso EC, Israel HA. Community opinions in the management of corneal ulcers and ophthalmic antibiotics: a survey of 4 states. Eye Contact Lens. 2010;36(4):195-200.
10. Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. *In vitro* assessment of the cytotoxicity of six topical antibiotics to four cultured ocular surface cell lines. Biocontrol Sci. 2012;17(2):93-9.
11. EURL ECVAM progress report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods (2010-2013) [Internet]. [citado 6 de octubre de 2013]. Recuperado a partir de: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-re

- leases-2013-progress-report-development-validation-regulatory-acceptance-alternative-methods/at_multi_download/file?name=EURL_ECVAM_progress_report_cosmetics_2013.pdf
12. Bartlett JD. Clinical Ocular Pharmacology. 5ª ed. Elsevier; 2013.
 13. Ramke M, Lam E, Meyer M, Knipper A, Heim A. Porcine corneal cell culture models for studying epidemic keratoconjunctivitis. *Mol Vis.* 2013;19:614-22.
 14. Boyd JM, Huang L, Xie L, Moe B, Gabos S, Li X-F. A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals. *Anal Chim Acta.* 2008;615(1):80-7.
 15. Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y. Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays. *J Biomol Screen.* 2005;10(8):795-805.
 16. Halle W. The Registry of Cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals. *Altern Lab Anim ATLA.* 2003;31(2):89-198.
 17. Otero-González L, Sierra-Alvarez R, Boitano S, Field JA. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol.* 2012;46(18):10271-8.
 18. Xing JZ, Zhu L, Jackson JA, Gabos S, Sun X-J, Wang X-B, et al. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. *Chem Res Toxicol.* 2005;18(2):154-61.
 19. Fernández-Ferreiro A, Santiago-Varela M, Gil-Martínez M, Parada TG-C, Pardo M, González-Barcia M, et al. Ocular safety comparison of non-steroidal anti-inflammatory eye drops used in pseudophakic cystoid macular edema prevention. *Int J Pharm.* 2015;495(2):680-91.
 20. Fernández-Ferreiro A, González Barcia M, Gil Martínez M, Blanco Mendez J, Lamas Díaz MJ, Otero Espinar FJ. Analysis of ocular toxicity of fluconazole and voriconazole eyedrops using HET-CAM. *Farm Hosp.* 2014;38(4):300-4.
 21. Campos M, Szerenyi K, Lee M, McDonnell JM, Lopez PF, McDonnell PJ. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol.* 1994;112(2):254-60.
 22. Ke N, Xi B, Ye P, Xu W, Zheng M, Mao L, et al. Screening and identification of small molecule compounds perturbing mitosis using time-dependent cellular response profiles. *Anal Chem.* 2010;82(15):6495-503.
 23. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care.* 2006;10(1):R27.
 24. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiro N, Treviño M, Gonzalez F, Yebra-Pimentel E, et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 22;56(2):983-92
 25. Ksander BR, Kolovou PE, Wilson BJ, Saab KR, Guo Q, Ma J, et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature.* 2014. 17;511(7509):353-7
 26. Kilic C, Girotti A, Rodriguez-Cabello JC, Hasirci V. A collagen-based corneal stroma substitute with micro-designed architecture. *Biomater Sci.* 2014;2(3):318-29.
 27. Sleath B, Blalock S, Covert D, Stone JL, Skinner AC, Muir K, et al. The relationship between glaucoma medication adherence, eye drop technique, and visual field defect severity. *Ophthalmology.* 2011;118(12):2398-402.
 28. Castel OC, Keinan-Boker L, Geyer O, Milman U, Karkabi K. Factors associated with adherence to glaucoma pharmacotherapy in the primary care setting. *Fam Pract.* 2014; 31(4):453-61.
 29. Fernández-Ferreiro A, González Barcia M. Optimization Ophthalmic Topical Antifungal Treatment. *Fungal Genomics Biol.* 2015; 5 (2)
 30. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 19(2):141-60.
 31. Haas W, Pillar CM, Torres M, Morris TW, Sahm DF. Monitoring antibiotic resistance in ocular microorganisms: results from the Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular microorganisms (ARMOR) 2009 surveillance study. *Am J Ophthalmol.* 2011;152(4):567-74.
 32. Lin CP, Boehnke M. Effect of fortified antibiotic solutions on corneal epithelial wound healing. *Cornea.* 2000;19(2):204-6.
 33. Sandboe FD, Medin W, Bjerknes R. Toxicity of vancomycin on corneal endothelium in rabbits. *Acta Ophthalmol Scand.* 1998;76(6):675-8.
 34. Garcia-Ferrer FJ, Pepose JS, Murray PR, Glaser SR, Lass JH, Green WR. Antimicrobial efficacy and corneal endothelial toxicity of Dex-Sol corneal storage medium supplemented with vancomycin. *Ophthalmology.* 1991;98(6):863-9.
 35. Fernández-Ferreiro A, Gonzalez-Barcia M, Gil-Martinez M, Alba Dominguez J, Otero Espinar FJ. Use of fortified eye drops on eye infections. *Eur J Clin Pharm.* 2014;16(4).
 36. Chiang C-C, Lin J-M, Chen W-L, Chiu Y-T, Tsai Y-Y. Comparison of topical fixed-combination fortified vancomycin-amikacin (VA solution) to conventional separate therapy in the treatment of bacterial corneal ulcer. *Eye Lond Engl.* 2009;23(2):294-8.
 37. Fernández-Ferreiro A, González Barcia M, Gil-Martínez M, Vieites-Prado A, Lema I, Argibay B, et al. *In vitro* and *in vivo* ocular safety and eye surface permanence determination by direct and Magnetic Resonance Imaging of ion-sensitive hydrogels based on gellan gum and kappa-carrageenan. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015; 94:342-51.
 38. Fernández-Ferreiro A, Fernández Bargiela N, Varela MS, Martínez MG, Pardo M, Piñeiro Ces A, et al. Cyclodextrin-polysaccharide-based, *in situ*-gelled system for ocular antifungal delivery. *Beilstein J Org Chem.* 2014;10:2903-11.
 39. Fernández-Ferreiro A. Manejo, seguridad y optimización de las formulaciones tópicas oftálmicas en Servicios de Farmacia Hospitalaria. Santiago de Compostela: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidade de Santiago de Compostela; 2015.
 40. Khoh-Reiter S, Jessen BA. Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal epithelium using an organotypic 3-D model. *BMC Ophthalmol.* 2009;9(1):5.

Aportación a la literatura científica

El actual trabajo supone el primer artículo publicado sobre la toxicidad ocular *in vitro* de los colirios antibióticos reforzados elaborados en Servicios de Farmacia Hospitalaria, utilizándose para ello novedosas técnicas de bioimpedancia y seguimiento en tiempo real del comportamiento de queratocitos estromales cuando estos se ponen en contacto con diferentes concentraciones de

antibióticos, a la vez que una evaluación de la irritación ocular aguda mediante la realización del ensayo Het-Cam.

Los resultados obtenidos podrán servir como ayuda en la toma de decisiones clínicas y recomendaciones farmacéuticas en el momento de optar por la formulación y posterior utilización del colirio menos tóxico para la superficie ocular. Por otro lado, estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de realizar futuras investiga-

ciones que permitan establecer concentraciones óptimas de antibióticos eficaces y no tóxicos para el tratamiento de queratitis infecciosas.

Introducción

Actualmente, existe un número importante de medicamentos oftálmicos de eficacia contrastada que no han sido comercializados por motivos económicos o por problemas de estabilidad, dejando a un número significativo de pacientes en situación delicada y obligando a los oftalmólogos a acudir a tratamientos alternativos^{1,2}. Con el fin de cubrir este vacío terapéutico se ha incrementado el uso de fórmulas magistrales o de medicamentos obtenidos mediante la manipulación, "reformulación" o adaptación a la vía ocular de formulaciones fabricadas para su administración por otras vías³. En hospitales terciarios, como el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, son las formulaciones estériles más frecuentes, rondando las 10.000 unidades anuales.

El epitelio corneal sano supone casi siempre una barrera infranqueable para cualquier microorganismo⁴. Sin embargo, un defecto epitelial puede ser sustrato para el desarrollo de una úlcera corneal infectada. Potencialmente las queratitis bacterianas son un proceso muy grave, que puede conducir a la pérdida de visión por cicatrización o perforación⁵. Para el tratamiento de las queratitis bacterianas graves no hay consenso en el manejo inicial, usándose en la actualidad diferentes esquemas terapéuticos que van desde la utilización de fluorquinolonas en monoterapia, a la combinación de colirios antibióticos reforzados como la vancomicina y ceftazidima^{6,7}. El uso de reformulaciones de antibióticos parenterales en forma de colirios de composición o concentraciones no comercializadas, comúnmente denominados colirios antibióticos reforzados (CAR), es una práctica habitual en oftalmología a nivel hospitalario desde los años 70⁸. Se suele recurrir a estos productos cuando se sospecha un agente causal resistente a los colirios antibióticos comerciales (CAC), especialmente en el tratamiento de las queratitis bacterianas severas. Los objetivos de la terapia incluyen la erradicación de las bacterias causantes de la queratitis y la supresión rápida de la respuesta inflamatoria inducida por estos microorganismos, evitándose de este modo un daño estructural de la córnea⁹. Sin embargo, la utilización de los mismos también han causado importantes complicaciones en el tejido ocular, siendo responsable la toxicidad de los mismos¹⁰.

Para mejorar la seguridad de los pacientes que reciben terapia ocular tópica, resulta esencial estimar de la forma más rigurosamente posible, el potencial irritante de cualquier compuesto que pueda tener contacto con el ojo y sus estructuras adyacentes^{11,12}. El objetivo del presente trabajo ha consistido en evaluar la toxicidad ocular *in vitro* de los principales CAR elaborados en los Servicios de Farmacia Hospitalaria.

Material y método

Estudio experimental *in vitro* para evaluar la seguridad de las formulaciones magistrales oftálmicas antibióticas utilizadas para el tratamiento de las queratitis bacterianas. En la tabla 1, se muestran la composición y principales características de los colirios ensayados.

Obtención de cultivo primario de queratocitos estromales

Los fragmentos de córnea se incubaron durante 10 min en tripsina a 37° C de acuerdo con el método modificado Ramke¹³, continuado por la eliminación mecánica de la endotelio y epitelio. El estroma corneal se cortó en secciones de 2 mm que se sumergieron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) / Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, con 2 mM L-glutamina, y antiinfecciosos (100 IU de penicilina, 100 mg / ml de estreptomina, 50 mg / ml de gentamicina). Una vez que los queratocitos humanos (KCH) han proliferado a 37°C y 5% de CO₂, se retiran las piezas de tejido. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre los pases 4 y 10. Las células han sido obtenidas de los remanentes de las córneas humanas utilizadas para el trasplante corneal, de acuerdo con las normas éticas marcadas por la institución. El estudio ha sido autorizado por el Comité de Ética de investigación, dentro del estudio "Desarrollo de alternativas terapéuticas seguras y efectivas para su uso en el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular".

Fundamento del ensayo de citotoxicidad celular

Los ensayos celulares, se llevaron a cabo utilizando un sistema biosensor de impedancia celular (xCELLigence Real-Time System Cell Analyzer (RTCA)¹⁴. Este es un sistema que utiliza microchips electrónicos que miden cambios en la impedancia entre los electrodos y la solución. Cuando la célula se adhiere al pocillo (E-placa de 16 Acea Bioscience), la resistencia aumenta y en consecuencia aumenta la impedancia. Los valores de impedancia se transforman mediante la utilización de un algoritmo matemático en un parámetro denominado índice celular (IC)¹⁵. Un IC bajo representa un menor número de células que se unen al microelectrodo, y un incremento de IC se puede atribuir al aumento del número de células¹⁶, detectándose de esta manera todos los cambios de manera continua y en tiempo real. Para el estudio de la citotoxicidad, los valores del IC se expresan como IC normalizado (ICN), donde $IC_{i(t)}$ es en cualquier momento, e $IC_{i(t \text{ de la dosis})}$ es IC en el momento de añadir los medicamentos a estudio al medio de cultivo. Las concentraciones de CAR ensayadas parten inicialmente de la concentración de colirio utilizada en terapéutica, para realizar posteriormente diluciones del mismo. Los resultados obtenidos se reflejan en las gráficas que muestran los cambios dinámicos, representándose el ICN desde la adición de los compuestos a lo largo del tiempo para

Tabla 1. Descripción de las características de los colirios antibióticos fortificados elaborados en el servicio de farmacia.

Colirio	Presentación comercial de la que se parte	Excipientes propios de la presentación comercial	Diluyente	pH	Osmolalidad (mOsmol/kg)	pH (1:1) con DMEN-FBS)
Amikacina 33 mg/ml (56 mM)	Amikacina 500 mg/ml Normon EFG (generic).	Cloruro de sodio, hidróxido de sodio (ajustador de pH) y agua para inyección	BSS	5.0	395	5.5
Gentamicina 15 mg/ml (26 mM)	Gentamicina Braun 1 mg/ml solución para perfusión intravenosa. EFG	9 mg/ml de cloruro sódico y agua para inyectables	SSF 0,9%	4	244	5.5
Cefazolina 50 mg/ml (104,6 mM)	Cefazolina Normon 1 g iv polvo y disolvente para solución inyectable EFG	Agua para inyección.	SSF 0,9%	5.5	495	7
Ceftazidima 50 mg/ml (78 mM)	Ceftazidima Normon 1 g polvo y disolvente para solución inyectable EFG .	Carbonato de sodio y Agua para inyección.	API+BSS	6.5	352	7.5
Vancomicina 50 mg/ml (33 mM)	Vancomicina Normon 500 mg EFG	No contiene.	BSS	5.2	323	6
Imipenem Cilastatina 5 mg/ml (15.75 mM)	Tienam iv 500/500 mg/ polvo para solución inyectable	Bicarbonato sódico.	SSF 0,9%	6.7	290	7.5
Colistina 10 mg/ml (5.71 mM)	Colistimetato sódico GES 1 mUI.	No contiene.	API	8	55	7.9

*Las medidas de osmolalidad (mOsmol/kg) y pH de los colirios elaborados en el Servicio de Farmacia, se han determinado con un Vapor Pressure Osmometer (VAPRO 5520) and a pHmetro (WTW inoLab®).

Abreviaturas: BSS (Solución salina Balanceada Alcon®); SSF (Suero salino Fisiológico 0.9% Fresenius®)

cada una de las concentraciones ensayadas. Las concentraciones de compuestos que hacen disminuir al 50 % del índice celular se calcularon (Software RTCA System®) por interpolación en los gráficos mediante el que representan la actividad de respuesta normalizada (%), siendo este parámetro el denominado como IC50 y expresándose el mismo en unidades de concentración molar¹⁷.

Metodología ensayos citotoxicidad

La citotoxicidad celular ha sido evaluada utilizando el RTCA. Inicialmente se determina el número de células óptimo para lograr un IC en torno a 1.0 en fase de crecimiento logarítmico¹⁸; momento óptimo para incorporar los medicamentos y ver el comportamiento celular. Un volumen de 150 microlitros de una suspensión de 3000 células por pocillo (número de células óptimo determinado en estudios previos¹⁹), se incubó durante 24 horas hasta alcanzar un valor de IC cercano a uno. En este momento, se renueva el medio de cultivo, que ahora contiene los medicamentos en diferentes concentraciones. Después de la adición de los medicamentos, el comportamiento celular, medido como el ICN, es registrado ininterrumpidamente y automáticamente cada 15 min durante 24 horas.

Los resultados de citotoxicidad determinados con el RTCA se confirman mediante la realización del ensayo de actividad mitocondrial WST-1® (Cell Proliferation Re-

agent WST-1 de Roche Applied Science) .La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica (longitud de onda 220 nm) que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium [2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. Las mediciones se realizan a tiempos de contacto corto (30 min) con una concentración de antibióticos 1:10 con respecto al original.

Ensayo de irritación ocular "The Hen's Egg Test" (Het-Cam)

Para el desarrollo del ensayo HET-CAM se necesitan huevos de pollos broiler fecundados. Estos se introducen en una cámara climática hasta el desarrollo completo de la membrana corioalantoide (CAM) sobre la cual se pondrán en contacto los CAR, para determinar posteriormente el Índice de Irritación (IS) siguiendo la metodología descrita con detalle en trabajos previos. Si en el IS, se alcanzan puntuaciones entre 0 y 0,9 se considera la sustancia como no irritante, ente 1 y 4,9 como ligeramente irritante, entre 5 y 9,9 moderadamente irritante y de 10 a 21 como severamente irritante²⁰. Para cada una de las sustancias se ha ensayado la concentración

original de CAR, utilizando un huevo diferente para cada uno y realizando cada uno de los ensayos de manera independiente y por triplicado. El cálculo se realiza como la media de la suma de las puntuaciones individuales de todos los puntos finales en cada uno de los replicados.

Resultados

Aminoglucósidos

La amikacina y gentamicina presentan cinéticas de toxicidad similares (Fig. 1), provocando una muerte gradual de las células en el tiempo y que puede llegar a eliminar la totalidad de la población de queratocitos con las concentraciones más altas ensayadas a tiempos prolongados. A tiempos iniciales de contacto, los queratocitos presentan una sensibilidad tóxica similar en ambos aminoglucosidos (superando la OCT dos veces la IC50 en ambos casos), sin embargo, se comprueba que a tiempos prolongados, la

gentamicina se muestra mucho más tóxica que la amikacina. Esto puede deberse a que la disolución de gentamicina presenta una hipoosmolalidad que puede llegar a ser tóxica para los queratocitos estromales²¹. Por otro lado, en lo referente a IS determinada por HET-CAM, se ha visto que la amikacina se comporta como un compuesto no irritante ($IS=4,61 \pm 2$) mientras que la gentamicina como un compuesto severamente irritante ($IS=10,35 \pm 1$).

Betalactámicos

Los colirios betalactámicos (Cefazolina y Ceftazidima) muestran una evolución similar de la cinética celular. Inicialmente y casi de manera inmediata al adicionar el medicamento diluido en el medio de cultivo, se observa una bajada del IC con posterior recuperación, la cual es pasajera y decae de manera brusca a tiempos elevados (Fig. 2). En ocasiones, las células expuestas a citotóxicos pueden inducir un mayor índice celular transitorio, que normal-

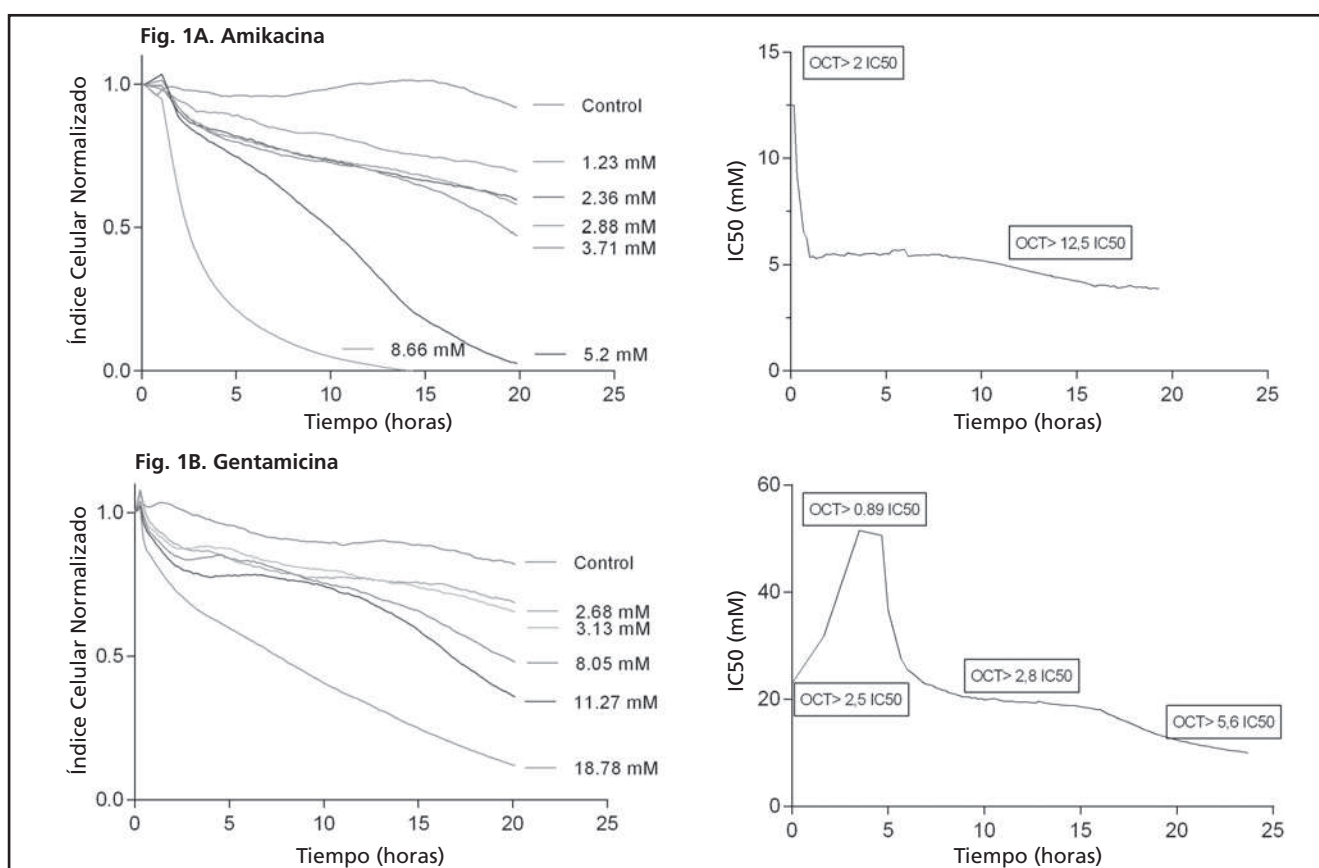


Figura 1. Cinética de citotoxicidad (izquierda) y evolución del IC50 en el tiempo (derecha) de los colirios fortificados aminoglucósidos. **Fig. 1A.** La población de queratocitos disminuye progresivamente con el aumento de concentración de la amikacina. Casi de manera instantánea provoca una gran muerte de celular, obteniendo valores de IC50 de 22 mM [la concentración original utilizada en terapéutica (OCT) supera 2.5 veces este valor], sin embargo parece existir un periodo de recuperación durante 4 horas donde alcanza valores de IC50 similares a la OCT, pero a partir de este momento las células recaen, provocándose una importante disminución de las mismas, siendo a las 10h el IC50 de 20 mM (OCT supera 2.8 veces la IC50), haciéndose por tanto, más intensa con el transcurso del tiempo.

Fig. 1B. La gentamicina provoca al igual que la amikacina gran destrucción de queratocitos casi de manera instantánea, presentando IC50 de 12.5 mM (OCT supera 2 veces la IC50), disminuyendo de manera brusca hasta alcanzar valores de IC50 de 5 mM que llegan a ser de 4 mM a las 20 horas (OCT supera 12.5 veces la IC50).

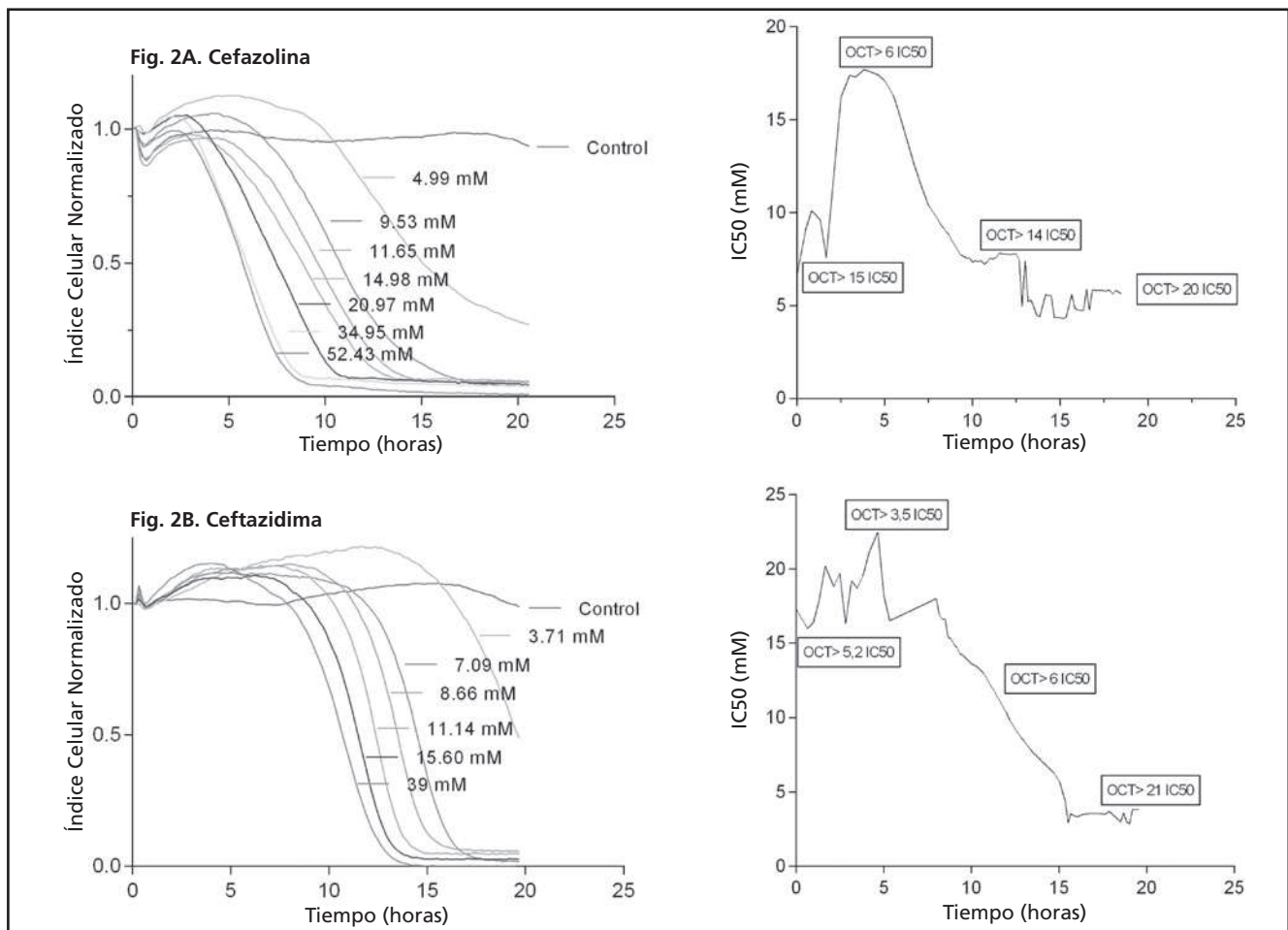


Figura 2. Cinética de citotoxicidad (izquierda) y evolución del IC50 en el tiempo (derecha) de los colirios fortificados de cefalosporinas. **Fig. 2A.** La cefazolina muestra unos valores de toxicidad muy altos durante los primeros momentos de contacto, detectándose valores de IC50 de 6,64 mM (OCT supera 15 veces el valor de la IC50). Posteriormente muestra una ligera recuperación, cuantificándose esta con valores de IC50 de 17,7 mM a las 5 horas (OCT supera 6 veces la IC50), cayendo significativamente partir de este tiempo, mostrando IC50 de 7,23 mM a las 10 horas y de 5,8 mM a las 20 horas (OCT supera la IC50 14 y 20 veces respectivamente). **Fig. 2B.** La ceftazidima muestra un perfil similar al de la cefazolina. Inicialmente la OCT supera 5 veces la IC50 (15 mM), mostrando cierta recuperación posterior hasta valores de 22 mM (OCT supera la IC50 3,5 veces), cayendo de manera brusca a partir de las 8 horas. A las 10 horas los valores de IC50 son de 13 mM y a las 20 horas de 3,7 mM (OCT supera 6 y 21 veces estos valores de IC50, respectivamente).

mente se produce en etapas tempranas o tardías de la exposición a la sustancia tóxica. Este efecto puede deberse a que en ocasiones la toxicidad provoca agrupaciones celulares ("clusters") que inducen a un mayor contacto con el electrodo y por lo tanto a un aumento adicional del ICN¹⁸. Estos tipos de cinética celular ante la exposición de tóxicos, también lo han mostrado compuestos como el arsénico^{22,18}. En lo referente al índice irritante de estos colirios, se debe decir que ambos presentan un IS catalogado como ligeramente irritante, tomando un valor de $4,65 \pm 1$ la cefazolina, y de $4,56 \pm 1$ la ceftazidima.

Glucopéptidos

En el figura 3, se puede observar el efecto de la vancomicina en los queratocitos estromales. Ésta muestra una toxicidad gradual en el tiempo, alcanzándose IC muy ba-

jos a tiempos de contacto cortos con las concentraciones más altas, no resultando tóxicas las concentraciones más bajas. Por otra parte el IS ha mostrado índices de irritación de $9,6 \pm 2$, catalogándose por tanto como una sustancia moderadamente irritante para el ojo.

Colirio de colistimetato de sodio

El colirio de colistina presenta una toxicidad a nivel celular muy importante a todas las concentraciones ensayadas. Dicha toxicidad probablemente sea debida al efecto tensioactivo de la misma, también responsable de su mecanismo de acción terapéutico, pues este es un antibiótico del grupo de las polimixinas que actúa uniéndose y alterando la permeabilidad de la membrana celular bacteriana produciendo con ello la muerte celular²³. En la figura 4, se puede observar cómo tras el contacto con

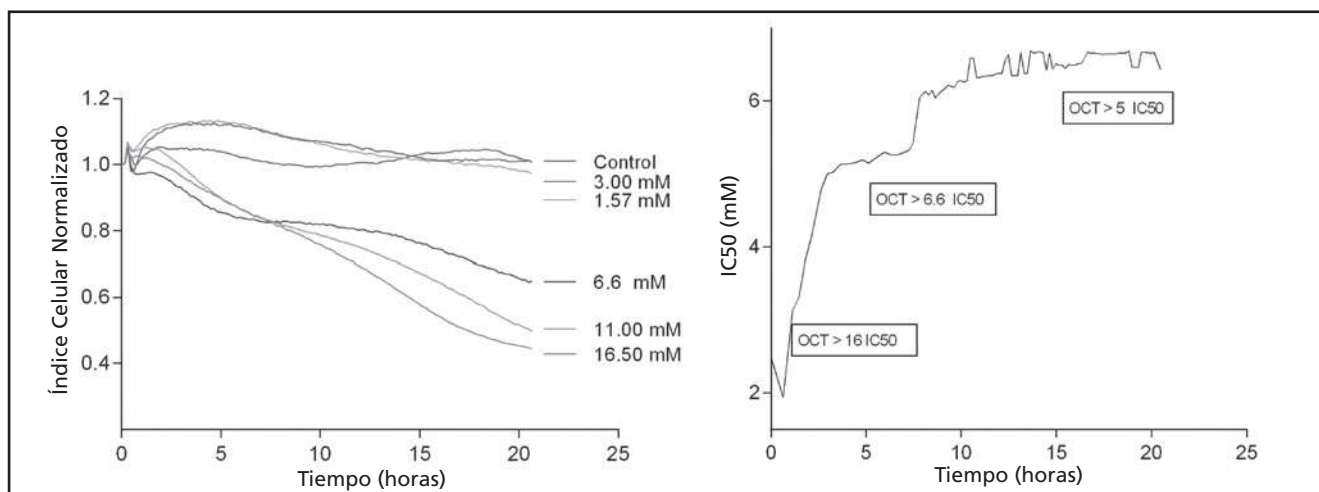


Figura 3. Cinética de citotoxicidad (izquierda) y evolución del IC50 en el tiempo (derecha) del colirio fortificado de vancomicina. La vancomicina, casi de manera instantánea provoca una importante muerte de celular durante las primeras tres horas de contacto, obteniendo valores de IC50 de 1.94 mM (OCT supera 16 veces este valor), sin embargo parece remitir ligeramente el potencial tóxico, incrementándose la IC50 hasta 6.45 mM a las 15 h (OCT supera los valores de IC50 5 veces)

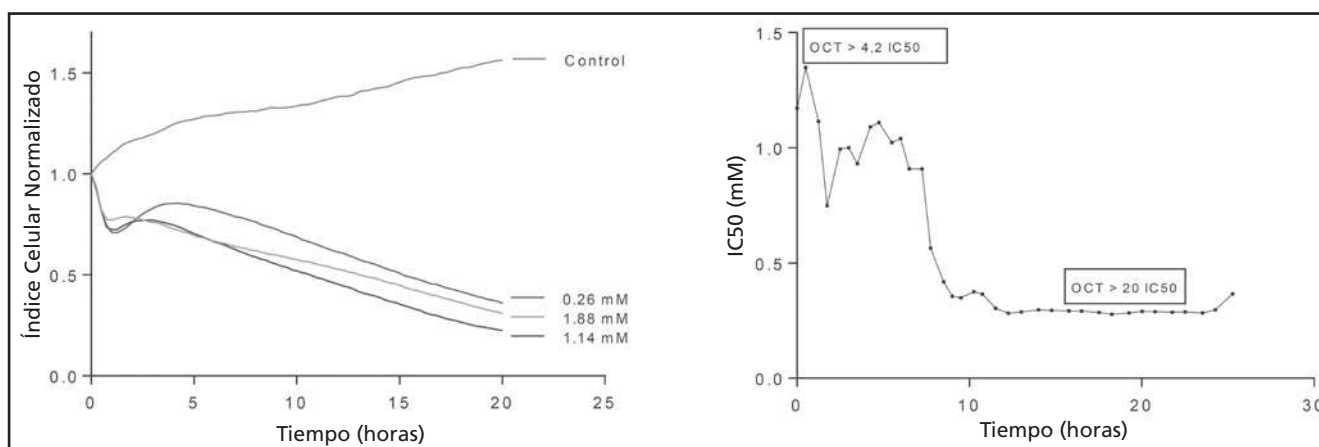


Figura 4. Cinética de citotoxicidad (izquierda) y evolución del IC50 en el tiempo (derecha) del colirio fortificado de colistina.

la colistina disuelta en el medio de cultivo, el compuesto muestra un IC50 de 2.43 mg/ml (OCT supera 4.23 veces la IC50), haciéndose con el tiempo todavía más tóxico, alcanzando IC50 de 0.48 mg/ml a las 10 horas del contacto (OCT supera 20 veces la IC50). En todas las concentraciones ensayadas el compuesto se muestra extremadamente tóxico, sin embargo el índice de irritación de este colirio ha sido nulo en el ensayo HET-CAM.

Colirio de imipenem-cilastatina

En la figura 5 se puede observar como en ninguna de las concentraciones ensayadas con imipenem se observa una disminución del ICN, provocando aumentos en el mismo con respecto al control. El colirio de imipenem presenta un amplio espectro de acción antibacteriana y de los resultados observados se puede señalar que su utilización no resultaría tóxica para las células estromales, llegando incluso a actuar como factor proliferante

de las mismas, por lo que supondría una alternativa segura de tratamiento. Por otra parte, el presente colirio ha mostrado valores nulos a nivel de irritación HET-CAM.

Ensayo de actividad mitocondrial WST-1

Con el fin de confirmar que los cambios en el ICN se deben a una disminución en la población de queratocitos, se ha realizado el ensayo WST-1. Como se puede apreciar en la figura 6, con respecto al resultado obtenido con el medio de cultivo (donde las células no están en contacto con antibióticos), existen cambios similares a los apreciados en las gráficas dinámicas de toxicidad. Así a tiempos iniciales se puede observar que los aminoglucosidos y especialmente la vancomicina, tienen una toxicidad importante. Por el contrario, las células en contacto con los betalactámicos presentan una viabilidad similar a las células control; esto probablemente se debe a que a tiempos de contacto cortos, las células se reor-

ganicen en *clusters* para protegerse frente a los tóxicos, aumentando por tanto el ICN pero no el número celular. El imipenem por el contrario, parece mostrar un efecto positivo sobre la proliferación de queratocitos, efectos ya observados en el ensayo RTCA.

Discusión y conclusión

Diversos autores han centraron sus investigaciones en la mejora de la regeneración corneal tras una agresión a esta superficie^{24,25} y en la sustitución de la córnea dañada por otra artificial²⁶, sin embargo, la investigación en este campo todavía no ha evolucionado lo suficiente como para trasladar resultados a la clínica. Por otro parte, es conocido que la falta de adherencia es una de las causas más importantes del fracaso terapéutico de los tratamien-

tos farmacológicos tópicos oculares, siendo los principales factores involucrados el malestar ocular (irritación) y la toxicidad que provoca lesiones corneales^{19,27,28}. Por todo ello, es necesario identificar a los compuestos oculares más tóxicos, y adecuar en lo posible la concentración que resulte eficaz y no perjudicial para la superficie ocular²⁹.

Los agentes causantes más frecuentes de las queratitis bacterianas, son en general los que se encuentran en la flora normal, cocos Gram positivos (*Estafilococcus epidermidis*, *Estafilococcus aureus*, *Streptococo pneumoniae*) y Gram negativos (*Pseudomonas* y *enterobacterias*), que aunque son menos frecuentes, son muy agresivos y se presentan más en portadores de lentes de contacto e inmunodeprimidos⁴. Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que establecen el punto de corte para cada microorganismo y antibiótico los esta-

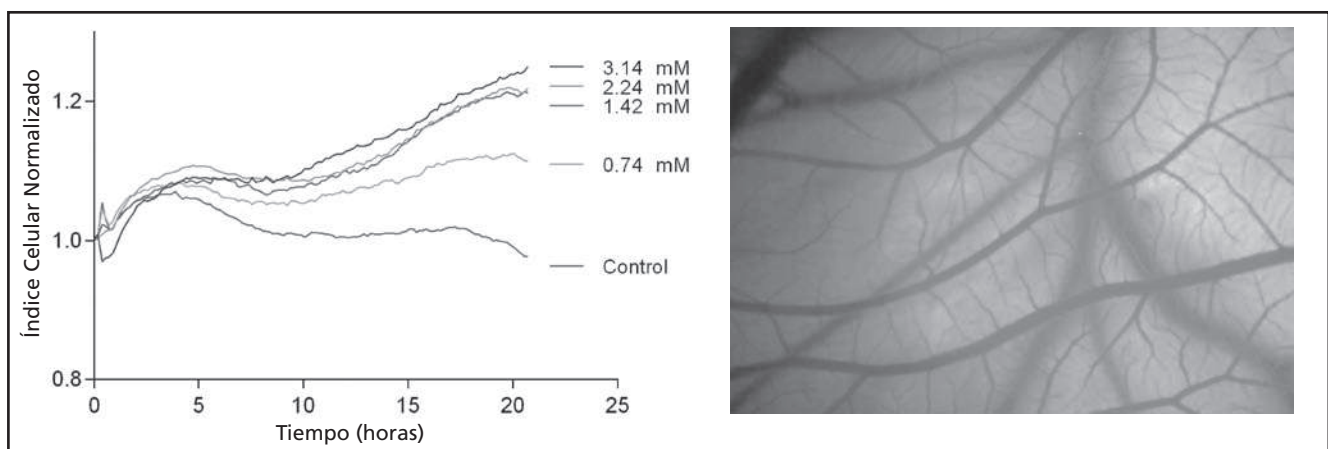


Figura 5. Cinética de citotoxicidad (izquierda) y aspecto de la CAM tras un contacto de 5 min con el colirio de imipenem.

Izquierda: La utilización del colirio de imipenem, no resultaría tóxica para las células estromales, llegando incluso a actuar como factor proliferante de las mismas, por lo que supondría una alternativa segura de tratamiento ante patógenos sensibles a dicho antibiótico. Ninguna de las concentraciones ensayadas se observa una disminución del ICN, provocando aumentos en el mismo con respecto al control.

Derecha: Imagen de la membrana corioalantoidea tras cinco minutos de contacto con el colirio de imipenem, donde no se aprecian daños apreciables en los vasos sanguíneos, lo que indica su nulo poder irritante a nivel ocular.

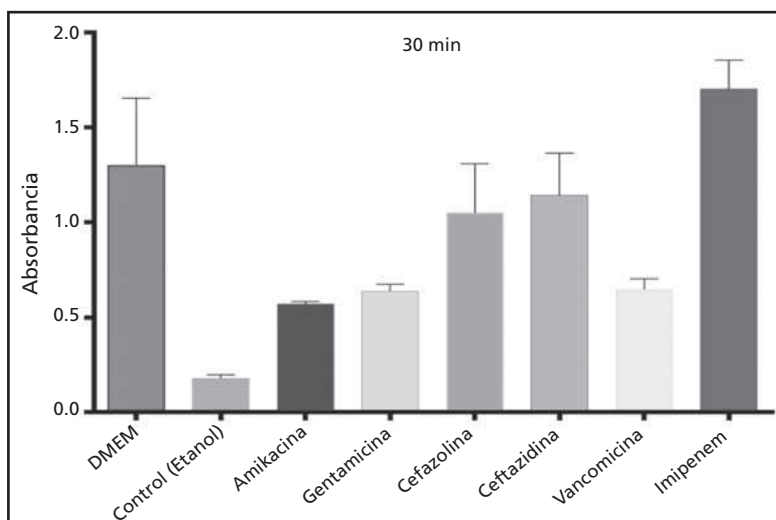


Figura 6. Resultados WST-1 de los colirios fortificados antibióticos tras 30 minutos de contacto con los queratocitos estromales.

blece el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST MIC breakpoints)³⁰. Estos puntos de corte *in vitro* han sido útiles en la predicción de eficacia clínica de los antibióticos cuando se administran sistémicamente, no siendo por tanto aplicables a la administración oftálmica, puesto que las concentraciones que se obtienen en los ojos son muy superiores a estas. Las concentraciones de los CAR se han establecido arbitrariamente desde el inicio de su utilización, sin realizar replanteamientos sobre si la misma, es la más adecuada.

El colirio de ceftazidima se utiliza principalmente para las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, situándose el punto de corte de la misma en 8 µg/ml³¹. En el caso del imipenem, el punto de corte para esta bacteria es de

4 µg/ml y la concentración de principio activo utilizada en terapéutica es diez veces inferior a la del colirio de ceftazidima, superándose aun así en ambos casos, miles de veces el cociente inhibitorio necesario para alcanzar la eficacia antimicrobiana. En los resultados obtenidos en el presente trabajo se ha demostrado que el colirio de imipenem, es el que ha mostrado menor toxicidad para las células estromales, probablemente por ser el CAR que menos concentración de principio activo contiene, situándolo de este modo y desde el punto de vista de la seguridad, como uno de los CAR con mayor atractivo para su formulación y utilización en queratitis que requieran CAR y que engloben microorganismos dentro espectro de acción del mismo (Tabla 2). Otros colirios po-

Tabla 2. Espectro de acción de los principales colirios antibioticos reforzados utilizados en la práctica clínica

	Vancomicina	Cefazolina	Ceftazidima	Gentamicina	Amikacina	Imipenem	Colistina
GRAM POSITIVOS	Streptococcosp. (Grupos A,B,C,G)	+	+	+		+	
	Strept. pneumoniae	+	+	±		+	
	Streptococcus viridans	+	+	±		+	
	Enterococcus faecalis	±				+	
	Enterococcus faecium	±				±	
	S. aureus MSSA	+	+	±	+	+	+
	S.aureus MRSA	+					
	C. epidermidis	+	±	±	±	+	+
	Corynebacterium jeikeium	+					
	Listeria monocytogenes	+					
GRAM NEGATIVOS	Neisseria gonorrhoeae		+	±		+	
	Neisseria meningitidis			±		+	
	Moraxella catarrhalis		±	+	+	+	+
	Haemophilus influenzae		+	+	+	+	+
	E.Coli		+	+	+	+	+
	Klebsiella		+	+	+	+	+
	Enterobacter spp			+	+	+	+
	Serratia spp			+	+	+	+
	Salmonell spp			+			+
	Shigella spp			+	+	+	+
	Proteus mirabilis		+	+			+
	Proteus vulgaris			+	+	+	+
	Providencia spp			+			+
	Morganella spp			+			+
	Pseudomona aeruginosa			+	+	+	+
Legionella spp						+	
ANAEROBIOS	Actinomyces	+				+	
	Bacteroides fragilis					+	
	Clostridium difficile	+				+	
	Clostridium no difficile	+		+		+	
	Peptostreptococcus			+		+	

(+): Activo (±): Variable (): No activo

tencialmente utilizables en el tratamiento de la queratitis por *Pseudomona aureginosa*, son los aminoglucosidos y la colistina, sin embargo, estos muestran una toxicidad *in vitro* importante que podría llegar a limitar su utilización. Por otra parte la utilización de vancomicina en el tratamiento de queratitis por sospecha de Gram positivos, podría remplazarse por la utilización de colirios como la cefazolina 50 mg/ml, una alternativa menos tóxica a tiempos de contacto cortos^{32,33,34}.

Debe tenerse en cuenta que, en la actualidad, conocer la eficacia de los diferentes CAR y pautas de administración de los mismos, es una tarea complicada, y de momento sin resolver debido a que existen pocos estudios controlados con los mismos. En la actualidad, no se encuentran datos concluyentes que nos permitan considerar a un CAR más eficaz que otro^{35,36}, y por tanto el presente estudio podrían orientar hacia la utilización de los menos tóxicos. Una de las líneas de investigación por explorar es poder conseguir plataformas de administración que contengan las mínimas concentraciones de antibiótico eficaces durante el mayor tiempo posible en la superficie ocular³⁷, o incluir excipientes como ciclodextrinas que logren disminuir la toxicidad de ciertos principios activos^{38,39}, y de este modo optimizar la terapéutica en el campo de la patología infecciosa ocular.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que cada uno de los compuestos estudiados presenta unas características cinéticas de toxicidad que dependen de la concentración, tiempo de exposición y probablemente del mecanismo de acción tóxico de cada compuesto, quedando este último punto abierto para futuras investigaciones. También sería necesario contemplar que otros tipos de condicionantes galénicos como el paso del principio activo a través de la córnea, la influencia de conservantes en la toxicidad ocular, el grado de ionización del fármaco o la fijación del fármaco a las proteínas de las lágrimas^{12,40}. Se plantea por tanto, un nuevo escenario multidisciplinar por explorar, tanto a nivel galénico, con la colaboración de universidades e institutos de investigación sanitaria en donde se profundice en la formulación de colirios antiinfecciosos con alta permanencia corneal que puedan incorporar concentraciones no tóxicas de medicamentos, como a nivel de investigación pre-clínica y clínica en la que se pueda estudiar la eficacia de los mismos mediante la futura realización de estudios multicéntricos.

Hasta que no se avance más en el establecimiento de dosis efectivas de antibióticos a nivel tópico corneal que permitan disminuir las concentraciones de los CAR elaborados en los Servicios de Farmacia, debemos priorizar la utilización de los más seguros teniendo en cuenta que todos los CAR ensayados, excepto la vancomicina e imipenem, han mostrado citotoxicidad con efecto concentración y tiempo dependiente, siendo las concentraciones más altas y los tiempos más prolongados, los que provocan un descenso más pronunciado en la población

de queratocitos. La vancomicina muestra un importante efecto citotóxico inicial que revierte con el transcurso del tiempo y el imipenem se muestra como un compuesto no tóxico para las células estromales.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses por parte de los autores del presente trabajo.

Agradecimientos

Fundación Española de Farmacia Hospitalaria y Fundación Mutua Madrileña.

Bibliografía

1. Menéndez de Lucas JA, Morcillo Laiz R. Medical and legal issues related to the drugs currently used in the treatment of Age-Related Macular Degeneration (ARMD). Arch Soc Esp Ophthalmol. julio de 2006;81(7):359-62.
2. García Salom P, Alonso Herreros JM. El real decreto de medicamentos en situaciones especiales y la farmacotecnia hospitalaria. Farm Hosp. mayo de 2010;34(3):103-5.
3. Herreros JMA. Preparación de medicamentos y formulación magistral para oftalmología. 1ª ed. Ediciones Díaz de Santos; 2003.
4. Garg A, Sheppard JD, Donnenfeld ED, Friedlaender MH. Clinical Applications of Antibiotics and Anti-Inflammatory Drugs in Ophthalmology. 1ª ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
5. José A. Zumieta Santamaría, Miren Gotzone Barbarías Salinas, Juan San Cristóbal Epalza. Manual de urgencias de oftalmología. 1ª ed. Alcon. 2012
6. Fernández-Ferreiro A, Gonzalez Barcia M. Farmacoterapia ocular. En: Jose Luis Poveda. Manual para el residente de primer año de farmacia hospitalaria. 1ª ed. Madrid:Edimsa. 2014. p. 229-249
7. Bremond-Gignac, Bremond-Gignac, F. Chiambaretta, S. Milazzo. A European Perspective on Topical Ophthalmic Antibiotics: Current and Evolving Options. Ophthalmol Eye Dis. 2011; 3:29-43.
8. Chiquet C, Romanet J-P. Prescrire les collyres fortifiés. J Fr Ophtalmol. 2007;30(4):423-30.
9. Hsu HY, Nacke R, Song JC, Yoo SH, Alfonso EC, Israel HA. Community opinions in the management of corneal ulcers and ophthalmic antibiotics: a survey of 4 states. Eye Contact Lens. 2010;36(4):195-200.
10. Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. *In vitro* assessment of the cytotoxicity of six topical antibiotics to four cultured ocular surface cell lines. Biocontrol Sci. 2012;17(2):93-9.
11. EURL ECVAM progress report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods (2010-2013) [Internet]. [citado 6 de octubre de 2013]. Recuperado a partir de: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-releases-2013-progress-report-development-validation-regulatory-acceptance-alternative-methods/at_multi_download/file?name=EURL_ECVAM_progress_report_cosmetics_2013.pdf
12. Bartlett JD. Clinical Ocular Pharmacology. 5ª ed. Elsevier; 2013.
13. Ramke M, Lam E, Meyer M, Knipper A, Heim A. Porcine corneal cell culture models for studying epidemic keratoconjunctivitis. Mol Vis. 2013;19:614-22.
14. Boyd JM, Huang L, Xie L, Moe B, Gabos S, Li X-F. A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals. Anal Chim Acta. 2008;615(1):80-7.
15. Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y. Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays. J Biomol Screen. 2005;10(8):795-805.

16. Halle W. The Registry of Cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD50) and to reduce testing in animals. *Altern Lab Anim ATLA*. 2003;31(2):89-198.
17. Otero-González L, Sierra-Alvarez R, Boitano S, Field JA. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol*. 2012;46(18):10271-8.
18. Xing JZ, Zhu L, Jackson JA, Gabos S, Sun X-J, Wang X-B, et al. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. *Chem Res Toxicol*. 2005;18(2):154-61.
19. Fernández-Ferreiro A, Santiago-Varela M, Gil-Martínez M, Parada TG-C, Pardo M, González-Barcia M, et al. Ocular safety comparison of non-steroidal anti-inflammatory eye drops used in pseudophakic cystoid macular edema prevention. *Int J Pharm*. 2015;495(2):680-91.
20. Fernández-Ferreiro A, González Barcia M, Gil Martínez M, Blanco Mendez J, Lamas Díaz MJ, Otero Espinar FJ. Analysis of ocular toxicity of fluconazole and voriconazole eyedrops using HET-CAM. *Farm Hosp*. 2014;38(4):300-4.
21. Campos M, Szerenyi K, Lee M, McDonnell JM, Lopez PF, McDonnell PJ. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol*. 1994;112(2):254-60.
22. Ke N, Xi B, Ye P, Xu W, Zheng M, Mao L, et al. Screening and identification of small molecule compounds perturbing mitosis using time-dependent cellular response profiles. *Anal Chem*. 2010;82(15):6495-503.
23. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*. 2006;10(1):R27.
24. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiro N, Treviño M, Gonzalez F, Yebra-Pimentel E, et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 22;56(2):983-92
25. Ksander BR, Kolovou PE, Wilson BJ, Saab KR, Guo Q, Ma J, et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature*. 2014. 17;511(7509):353-7
26. Kilic C, Girotti A, Rodriguez-Cabello JC, Hasirci V. A collagen-based corneal stroma substitute with micro-designed architecture. *Biomater Sci*. 2014;2(3):318-29.
27. Sleath B, Blalock S, Covert D, Stone JL, Skinner AC, Muir K, et al. The relationship between glaucoma medication adherence, eye drop technique, and visual field defect severity. *Ophthalmology*. 2011;118(12):2398-402.
28. Castel OC, Keinan-Boker L, Geyer O, Milman U, Karkabi K. Factors associated with adherence to glaucoma pharmacotherapy in the primary care setting. *Fam Pract*. 2014; 31(4):453-61.
29. Fernández-Ferreiro A, González Barcia M. Optimization Ophthalmic Topical Antifungal Treatment. *Fungal Genomics Biol*. 2015; 5 (2)
30. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 19(2):141-60.
31. Haas W, Pillar CM, Torres M, Morris TW, Sahm DF. Monitoring antibiotic resistance in ocular microorganisms: results from the Antibiotic Resistance Monitoring in Ocular microorganisms (ARMOR) 2009 surveillance study. *Am J Ophthalmol*. 2011;152(4):567-74.
32. Lin CP, Boehnke M. Effect of fortified antibiotic solutions on corneal epithelial wound healing. *Cornea*. 2000;19(2):204-6.
33. Sandboe FD, Medin W, Bjerknes R. Toxicity of vancomycin on corneal endothelium in rabbits. *Acta Ophthalmol Scand*. 1998; 76(6): 675-8.
34. Garcia-Ferrer FJ, Pepose JS, Murray PR, Glaser SR, Lass JH, Green WR. Antimicrobial efficacy and corneal endothelial toxicity of DexSol corneal storage medium supplemented with vancomycin. *Ophthalmology*. 1991;98(6):863-9.
35. Fernández-Ferreiro A, Gonzalez-Barcia M, Gil-Martinez M, Alba Dominguez J, Otero Espinar FJ. Use of fortified eye drops on eye infections. *Eur J Clin Pharm*. 2014;16(4).
36. Chiang C-C, Lin J-M, Chen W-L, Chiu Y-T, Tsai Y-Y. Comparison of topical fixed-combination fortified vancomycin-amikacin (VA solution) to conventional separate therapy in the treatment of bacterial corneal ulcer. *Eye Lond Engl*. 2009;23(2):294-8.
37. Fernández-Ferreiro A, González Barcia M, Gil-Martínez M, Vieites-Prado A, Lema I, Argibay B, et al. *In vitro* and *in vivo* ocular safety and eye surface permanence determination by direct and Magnetic Resonance Imaging of ion-sensitive hydrogels based on gellan gum and kappa-carrageenan. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 94:342-51.
38. Fernández-Ferreiro A, Fernández Bargiela N, Varela MS, Martínez MG, Pardo M, Piñeiro Ces A, et al. Cyclodextrin-polysaccharide-based, *in situ*-gelled system for ocular antifungal delivery. *Beilstein J Org Chem*. 2014;10:2903-11.
39. Fernández-Ferreiro A. Manejo, seguridad y optimización de las formulaciones tópicas oftálmicas en Servicios de Farmacia Hospitalaria. Santiago de Compostela: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidade de Santiago de Compostela; 2015.
40. Khoh-Reiter S, Jessen BA. Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal epithelium using an organotypic 3-D model. *BMC Ophthalmol*. 2009;9(1):5.