

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo y caracterización de nanosistemas farmacéuticos  
de administración ocular para aumentar la biodisponibilidad  
de sustancias activas poco hidrosolubles**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Miguel Gómez Ballesteros**

DIRECTORAS

**Irene T. Molina Martínez**  
**Rocío Herrero Vanrell**

Madrid, 2018





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**



**Desarrollo y caracterización de nanosistemas farmacéuticos  
de administración ocular para aumentar la biodisponibilidad  
de sustancias activas poco hidrosolubles**

**Miguel Gómez Ballesteros**

**Bajo la dirección de las doctoras:**

**Irene T. Molina Martínez**

**Rocío Herrero Vanrell**

**Madrid, 2017**



**LA DRA. ROCÍO HERRERO VANRELL Y LA DRA. IRENE T. MOLINA MARTÍNEZ** PROFESORAS TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada **“Desarrollo y caracterización de nanosistemas farmacéuticos de administración ocular para aumentar la biodisponibilidad de sustancias activas poco hidrosolubles”** ha sido elaborada bajo su dirección por el licenciado en Farmacia **Don Miguel Gómez Ballesteros** en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y hallándose concluida autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Madrid a 18 de abril de 2017

Fdo Rocío Herrero Vanrell

Fdo Irene T. Molina Martínez



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dar las gracias a todas las personas que me han acompañado durante este recorrido y han contribuido a que este trabajo haya sido posible:

A la Dra. Emilia María Barcía Hernández, directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica por haberme permitido realizar la tesis doctoral en este departamento.

A mis tutoras, las doctoras Irene T. Molina Martínez y Rocío Herrero Vanrell por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación cuando era alumno suyo y confiar en mis capacidades. Agradecerles su dedicación y ayuda durante estos años.

A los doctores Julio San Román Del Barrio, Blanca Vázquez Lasa y Francisco Jesús Parra Ruiz del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC por su implicación en la elaboración y suministro del polímero HEMA-Bayfit-MA.

A la Doctora Beatriz de las Heras del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la UCM y así mismo al Doctor Manuel Guzmán Navarro del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Farmacia de la UAH, ambos por su contribución a los ensayos de viabilidad celular *in vitro* del presente trabajo.

A los doctores Alfonso Rodríguez Álvaro y Elisa González Alonso-Alegre del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM por su contribución en los ensayos de eficacia en perros que padecen síndrome de ojo seco del presente trabajo.

A la doctora Vanessa Andrés Guerrero por su inagotable ayuda durante estos años, siendo no solo una compañera de trabajo durante un periodo de mi etapa predoctoral, sino también una amiga y una inspiración. Nunca voy a poder darte

las gracias suficientes veces por tu atención, porque cuando me he sentido perdido me has ayudado a retomar el camino.

A la Universidad Complutense de Madrid por la concesión de la beca predoctoral y la Fundación de Investigación del Hospital clínico San Carlos por la concesión de un contrato de personal investigador.

A mis compañeros de laboratorio y del departamento por haber hecho que esta etapa de mi vida fuera mas amena y poder superar las dificultades que se iban presentando. Quisiera agradecer más atentamente al grupo de liberación controlada de fármacos a nivel ocular de la sección de biofarmacia porque han sido como una familia siempre que les he necesitado.

Y quisiera agradecer principalmente a mis padres por ser los principales promotores de esta etapa, por aguantar mis malos momentos, por entenderme, y en definitiva por ser mis referentes en cuanto a dedicación y esfuerzo. Gracias por creer en mí y en mis expectativas.

<b>ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN/SUMMARY</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	23
1.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA OCULAR.....	25
1.2 GLAUCOMA .....	28
1.2.1 Tipos de glaucoma.....	29
1.2.2 Factores de riesgo .....	30
1.2.3 Fisiopatología .....	31
1.2.4 Evaluación clínica .....	33
1.2.5 Tratamiento del glaucoma .....	35
1.2.6 Acetazolamida .....	38
1.3 SÍNDROME DE OJO SECO.....	40
1.3.1 Etiopatogenia: tipos de ojo seco .....	42
1.3.2 Tratamiento.....	48
1.4 NUEVOS SISTEMAS FARMACÉUTICOS DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.....	63
1.4.1 Liposomas.....	63
1.4.2 Nanopartículas .....	69
1.4.3 Micropartículas .....	70
1.4.4 Lentes de contacto blandas e insertos oftálmicos .....	71
1.4.5 Dendrimeros.....	71
1.4.6 Hidrogeles y sistemas de gelificación <i>in situ</i> .....	73
1.4.7 Microemulsiones y niosomas.....	73
1.5 BIBLIOGRAFÍA.....	74

<b>2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO</b> .....	93
2.1 PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOTENSORA DE NANOSITEMAS DE ACETAZOLAMIDA DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.....	96
2.1.1 Formulación nanoparticular de HEMA-Bayfit-MA cargada con acetazolamida .....	96
2.1.2 formulación liposomal con acetazolamida .....	97
2.2 PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE GELIFICACIÓN <i>IN SITU</i> DE CICLOSPORINA A DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.....	98
2.2.1 Estudios de eficacia de la formulación liposomal de CsA con hialuronato sódico en perros que padecen el síndrome de ojo seco .....	99
2.2.2 Desarrollo y caracterización de una formulación de gelificación <i>in situ</i> de CsA. ....	99
<b>3. CAPÍTULO 1: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE HEMA-Bayfit-MA CARGADAS CON ACETAZOLAMIDA</b> .....	101
3.1 INTRODUCCIÓN.....	103
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
3.2.1 Materiales .....	107
3.2.2 Cuantificación de la ACZ por HPLC .....	108
3.2.3 Preparación y caracterización de las NP blanco.....	109
3.2.4 Preparación y caracterización de las NP cargadas con acetazolamida.....	112
3.2.5 Ensayo de cesion <i>in vitro</i> .....	114
3.2.6 Ensayos de viabilidad celular <i>in vitro</i> .....	114
3.2.7 Estudios <i>in vivo</i> en animales de experimentación .....	116

3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	120
3.3.1	Cuantificación de la ACZ por HPLC .....	120
3.3.2	Caracterización de las nanopartículas blanco .....	121
3.3.3	Caracterización de las nanopartículas cargadas con ACZ .....	127
3.3.4	Estudio de cesión <i>in vitro</i> de la formulación de acetazolamida (FOR-ACZ) .....	130
3.3.5	Estudio de actividad hipotensora de la formulación de acetazolamida (FOR-ACZ) .....	132
3.4	BIBLIOGRAFÍA .....	136
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 2: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN LIPOSOMAL CON ACETAZOLAMIDA .....</b>	<b>141</b>
4.1	INTRODUCCIÓN .....	143
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	147
4.2.1	Materiales .....	147
4.2.2	Preparación de los liposomas cargados con ACZ .....	148
4.2.3	Caracterización de los liposomas cargados con ACZ .....	149
4.2.4	Ensayos de viabilidad celular <i>in vitro</i> .....	152
4.2.5	Ensayo de tolerancia <i>in vivo</i> .....	153
4.2.6	Medidas de presión intraocular .....	154
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	157
4.3.1	Caracterización de las formulaciones liposomales de acetazolamida .....	157
4.3.2	Estudios de viabilidad celular <i>in vitro</i> .....	163
4.3.3	Estudios de tolerancia ocular <i>in vivo</i> .....	167
4.3.4	Estudios de actividad hipotensora en conejos .....	168
4.4	BIBLIOGRAFÍA .....	180

<b>5. CAPÍTULO 3: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE GELIFICACIÓN IN SITU DE CICLOSPORINA A</b> .....	187
5.1 INTRODUCCIÓN.....	189
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	193
5.2.1 Materiales .....	193
5.2.2 Preparación de los liposomas cargados con ciclosporina A....	194
5.2.3 Caracterización fisicoquímica de los preparados.....	196
5.2.4 Ensayos de viabilidad celular <i>in vitro</i> .....	198
5.2.5 Ensayo de tolerancia ocular en conejos.....	200
5.2.6 Ensayos de eficacia en perros que padecen el SOS .....	201
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	205
5.3.1 Estudios de eficacia de la formulación liposomal de ciclosporina A con hialuronato sódico (AH-L-CSA) en perros que padecen el síndrome de ojo seco .....	205
5.3.2 Selección del agente gelificante y concentración del mismo en las formulaciones. ....	213
5.3.3 Desarrollo y caracterización de la formulación gelificante con ciclosporina A. ....	216
5.3.4 Caracterización del gel formado por simulación <i>in situ</i> .....	224
5.3.5 Estudios de tolerancia ocular <i>in vivo</i> .....	228
5.3.6 Estudios de eficacia de la formulación gelificante de ciclosporina A (GG-L-CSA) en perros que padecen el síndrome de ojo seco .....	229
5.4 BIBLIOGRAFÍA.....	232
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	239
6.1 PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOTENSORA DE NANOSISTEMAS DE ACETAZOLAMIDA DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.....	241

6.1.1	Nanopartículas de HEMA-Bayfit-MA cargadas con ACZ.....	244
6.1.2	formulación liposomal con acetazolamida .....	249
6.2	PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE GELIFICACIÓN <i>IN SITU</i> DE CICLOSPORINA A DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.....	255
6.2.1	Estudios de eficacia de la formulación liposomal de CsA con hialuronato sódico en perros que padecen el síndrome de ojo seco .....	258
6.2.2	Desarrollo y caracterización de una formulación de gelificación <i>in situ</i> de ciclosporina A.....	260
6.3	BIBLIOGRAFÍA.....	264
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>273</b>



## **ABREVIATURAS**

**$\Delta$ PIO:** incremento en términos de reducción de la presión intraocular

**$\Delta$ PIOmax:** descenso máximo de la presión intraocular

**ACZ:** acetazolamida

**ACZ-VB:** formulación de acetazolamida en vehículo base

**AFM:** microscopia de fuerza atómica

**AH-L-CsA:** formulación liposomal cargada con ciclosporina A y diluida con ácido hialurónico

**ARVO:** Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología

**AUC<sub>0</sub><sup>8h</sup>:** área bajo la curva de 0 a 8 horas.

**BAK:** cloruro de benzalconio

**Bayfit-MA:** Bayfit®-10WF15 funcionalizado con grupos metacrilicos

**BR:** biodisponibilidad relativa

**Ch:** colesterol

**COX:** ciclooxigenasa

**CR:** modo rotacional

**CS:** modo oscilatorio

**CsA:** ciclosporina A

**CSIC:** Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**DE:** desviación estándar

**Dh:** diámetro aparente hidrodinámico

**DLS:** dispersión dinámica de luz

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**EE:** error estándar

**Ec:** esfuerzo crítico

**EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico

**FC:** fosfatidilcolina

**FCN:** factor de crecimiento nervioso

**FOR-ACZ:** formulación de nanopartículas cargadas con acetazolamida

**G':** módulo elástico o de almacenamiento

**G'':** módulo viscoso o de pérdida

**GG-L-CsA:** formulación liposomal de gelificación *in situ* de ciclosporina A al 0,1%

**HeLa:** línea de células inmortalizadas de cáncer cérvico-uterino

**HEMA:** 2-hidroxietil metacrilato

**HCLE:** línea de células epiteliales corneales-limbales humanas inmortalizadas

**HNa:** hialuronato sódico

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia

**HPMC:** hidroxipropilmetilcelulosa

**ICTP:** Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros

**ICTS:** Centro Nacional de Microscopía Electrónica

**ID:** índice de dispersión

**IOBA-NHC:** línea de células corneales humanas normales cedidas por el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada

**IL:** interleucina

**L-ACZ:** formulación liposomal de acetazolamida

**L-ACZ-P:** formulación liposomal de acetazolamida que además contiene HPMC al 0,3%

**LDE:** electroforesis laser doppler

**LUV:** liposomas unilamelares grandes

**MAO:** monoamina oxidasa

**MLV:** liposomas multilamelares

**Mn:** peso molecular promedio en número

**MMP:** metaloproteinasa

**Mw:** peso molecular promedio en masa

**Mw/Mn:** índice de polidispersión

**NP:** nanopartículas

**NP1:** nanopartículas blanco obtenidas a partir del copolímero HEMA-Bayfit-MA de 1:99 (m/m)

**NP5:** nanopartículas blanco obtenidas a partir del copolímero HEMA-Bayfit-MA de 5:95 (m/m)

**NP10:** nanopartículas blanco obtenidas a partir del copolímero HEMA-Bayfit-MA de 10:90 (m/m)

**NP5-ACZ:** nanopartículas cargadas con acetazolamida obtenidas a partir del copolímero HEMA-Bayfit-MA de 5:95 (m/m)

**PLGA:** ácido poliláctico-co-glicólico

**PBS:** solución isotónica de tampón fosfato a pH 7,4

**PG:** propilenglicol

**PIO:** presión intraocular

**RGCs:** células ganglionares de la retina

**SCB:** Sistema de clasificación Biofarmacéutica

**SEM:** microscopia electrónica de barrido

**SO:** superficie ocular

**SOS:** síndrome de ojo seco

**STT:** prueba lagrimal de Schirmer

**SUV:** liposomas unilamelares pequeños

**TEM:** microscopia electrónica de transmisión

**tg  $\theta$ :** tangente del ángulo de desfase

**TGF:** factor de crecimiento transformante

**TNF-alpha:** factor de necrosis tumoral alpha

**Ts:** tensión superficial

**UCM:** Universidad Complutense de Madrid

**VB:** vehículo base

**Vit-E:** vitamina E

**w-3:** ácido graso omega 3

**w-6:** ácido graso omega 6

# **RESUMEN/SUMMARY**



## **DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOSISTEMAS FARMACÉUTICOS DE ADMINISTRACIÓN OCULAR PARA AUMENTAR LA BIODISPONIBILIDAD DE SUSTANCIAS ACTIVAS POCO HIDROSOLUBLES**

### INTRODUCCIÓN

La biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía tópica viene condicionada tanto por las especiales características anatomofisiológicas del ojo, como por la naturaleza del principio activo y de la forma dosificación utilizada para su administración. En este último aspecto es en el que se centra esta memoria.

Los sistemas nanoparticulares han sido ampliamente estudiados como sistemas de liberación de fármacos en el campo farmacéutico y médico. A nivel ocular, estos sistemas, han demostrado una capacidad de liberar fármacos en localizaciones diana y proporcionar alternativas a diferentes tratamientos convencionales.

El glaucoma es una de las enfermedades oculares más importantes por ser la principal causa de ceguera en los países industrializados. Esta patología está caracterizada por una pérdida de las células ganglionares de la retina (RGCs) y sus axones. En esta enfermedad, es frecuente el incremento de la presión intraocular (PIO > 21 mmHg), produciendo un daño irreversible en el nervio

óptico, seguido de una neuropatía ocular y pérdida de la visión. Por esta razón, los agentes hipotensores oculares se han convertido en los componentes principales en el tratamiento de la enfermedad.

La acetazolamida (ACZ) es una sustancia activa inhibidora de la anhidrasa carbónica estando aprobada su utilización por vía oral como reductor de la presión intraocular en el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, su prescripción está bastante limitada debido a los potenciales efectos adversos sistémicos que puede generar. Además, su hidrosolubilidad es muy baja (0,7 mg/mL) y su permeabilidad corneal está muy limitada. Estas condiciones suponen nuevos retos en el desarrollo de formulaciones de aplicación tópica ocular.

Otra de las enfermedades con elevada incidencia a nivel ocular es el Síndrome de Ojo Seco (SOS). Se trata de una patología presente en el 14-33% de la población mundial. Se considera una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular (SO) que origina inestabilidad de la película lagrimal y se acompaña de un aumento de osmolaridad de la lagrime e inflamación de la SO. En la actualidad no existe un tratamiento eficaz, sino una mejoría de sus síntomas. En pacientes con ojo seco leve o episódico se puede controlar la enfermedad con la modificación de su entorno y de las actividades diarias. Sin embargo, cuando estas medidas preventivas son insuficientes en el síndrome del ojo seco existen diversas terapias a utilizar, como por ejemplo las lágrimas artificiales y la ciclosporina A.

Las lágrimas artificiales se utilizan en el tratamiento de cualquier estadio de la enfermedad tanto solas como en combinación con otros tratamientos. Sus componentes más importantes son lubricantes de base polimérica y/o viscosizantes con el fin de aumentar el tiempo de permanencia de la lagrime sobre la superficie ocular y reducir la fricción entre el globo ocular.

La ciclosporina A (CsA) es un inmunomodulador y agente antiinflamatorio que tiene diversas aplicaciones en oftalmología, incluyendo el síndrome de ojo seco.

La hidrofobicidad y la solubilidad acuosa extremadamente baja de la CsA da lugar a bajas concentraciones en la película lagrimal y si además se considera su baja permeabilidad, se explica fácilmente la baja biodisponibilidad ocular que presenta.

### OBJETIVOS Y RESULTADOS

El objetivo general de la Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de nuevos nanosistemas que permitan la administración tópica ocular de sustancias activas, que en formas de dosificación clásicas presentan problemas de formulación. El trabajo se ha estructurado en cuatro etapas:

A.- Desarrollar y caracterizar una formulación de nanopartículas utilizando un copolímero de HEMA-Bayfit-MA que además presente una buena tolerancia sobre la superficie ocular, permitiendo su administración por vía tópica oftálmica. La síntesis del copolímero fue llevada a cabo por el grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y tecnología de Polimeros (ICTP). La estructura del copolímero corresponde a secuencias de HEMA unidas al azar a unidades del poloxámero con tres ramas en forma de estrella. Los ensayos de tolerancia *in vitro* permitieron seleccionar el copolímero más adecuado para la formulación. La elaboración de los nanosistemas se ha basado en la nanoprecipitación mediante diálisis y como fármaco modelo se ha utilizado la acetazolamida con baja biodisponibilidad ocular. La caracterización de las nanopartículas incluye ensayos de tamaño de partícula, potencial Z, microscopia electrónica de barrido y estudios de tolerancia *in vitro* utilizando líneas celulares de córnea, conjuntiva y macrófagos. Se ha realizado el estudio de la actividad hipotensora del nanosistema cargado con ACZ utilizando el conejo como animal de experimentación.

B.- Desarrollar y caracterizar una formulación liposomal de acetazolamida con el objetivo de mejorar su biodisponibilidad y por tanto su actividad hipotensora

tras su administración tópica ocular, preservando, al mismo tiempo, la SO y la funcionalidad de la película precorneal. En este capítulo se elaboraron dos formulaciones liposomales: la (1) fueron liposomas dispersos en tampón borato y agentes osmoprotectores (trehalosa y eritritol) y a la (2) se le incorporó además, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Estas formulaciones se caracterizaron desde el punto de vista fisicoquímico: tamaño de vesícula, pH, osmolaridad, comportamiento reológico y tensión superficial. Los estudios de viabilidad celular demostraron una tolerancia óptima de las formulaciones. El estudio de actividad hipotensora se realizó en conejos normotensos. Con ambas formulaciones se consigue un aumento en el descenso de la presión intraocular con respecto a la solución de acetazolamida que se utiliza como comparador activo.

C.- Estudio de eficacia de la formulación liposomal de ciclosporina con hialuronato sódico en perros que padecen el síndrome de ojo seco. La formulación liposomal de ciclosporina A (al 0,1%) desarrollada en el grupo de investigación, incluye componentes semejantes a los de la película precorneal. El preparado contiene fosfatidilcolina como componente lipídico, trehalosa como osmoprotector, vitamina E como antioxidante e hialuronato sódico como mucomimético. Para este estudio de eficacia se diseñó un protocolo de evolución clínica que permitiera un seguimiento objetivo del SOS en perros de origen autoinmune o asociados a endocrinopatías leves, moderadas y graves. El estudio se planteó como ensayo clínico observacional temporal de 2 meses de duración, en el que los pacientes recibieron el tratamiento 3 veces al día. Con el tratamiento de la formulación liposomal de ciclosporina A, se observaron mejorías substanciales.

D.- Desarrollar y caracterizar un nuevo preparado liposomal con CsA de administración tópica ocular capaz de gelificar *in situ*. Este preparado combinaría las características de una formulación líquida a la hora de la administración con las de un gel en el lugar de administración. Con esta formulación gelificante se trata de aumentar el tiempo de contacto de los

componentes con la superficie ocular y por tanto aumentar su eficacia, así como disminuir el número de instilaciones. En la caracterización de la formulación se incluye los estudios de tamaño de vesícula, osmolaridad, pH, tensión superficial y comportamiento reológico. Se realizaron estudios de tolerancia ocular en conejos. El ensayo de eficacia para esta formulación, se planteó en perros con queratoconjuntivitis seca muy graves. Al tratarse de perros con patologías tan graves (hipoplasia glandular severa) resulta difícil encontrar una mejoría satisfactoria. Estos cuadros tan severos no se pueden manejar con monoterapia de CsA y requieren tratamientos más complejos.

### CONCLUSIONES

- 1) El copolímero HEMA-Bayfyt-MA (5:95) sintetizado por el grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) resulta adecuado para la preparación de nanosistemas de administración tópica ocular. Estas nanopartículas cargadas con acetazolamida presentan una tolerancia ocular óptima y su actividad hipotensora es significativamente superior a la solución de la misma concentración, tanto en el descenso máximo como en la duración de efectos.
- 2) La formulación liposomal de acetazolamida con hidroxipropilmetilcelulosa presenta una tolerancia ocular óptima. Con la adición del polímero se consigue una superioridad significativa en la actividad hipotensora de la formulación liposomal. Además, con esta formulación se aumenta la biodisponibilidad hasta 3,7 veces con respecto a la solución de la sustancia activa.
- 3) La formulación liposomal de ciclosporina A al 0,1% con hialuronato sódico al 0,4% ha demostrado ser eficaz en el síndrome de ojo seco espontáneo en la especie canina. En los dos grupos de casos estudiados (leves o moderados y graves) se obtienen valores promedios en la

prueba de Schirmer superiores a 15 mm/min después de 60 días de tratamiento.

- 4) La combinación de goma gelano e hidroxipropilmetilcelulosa permite preparar un formulación con Ciclosporina A con una tolerancia ocular óptima y características adecuadas de gelificación *in situ*. El comportamiento reológico del gel simulado *in situ* asegura una mayor permanencia de la formulación sobre la superficie ocular.

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF PHARMACEUTICAL NANOSYSTEMS OF EYE ADMINISTRATION TO INCREASE THE BIODISPONIBILITY OF LOW HYDROSOLUBLE ACTIVE SUBSTANCES**

INTRODUCTION

The bioavailability of topically administered drugs is conditioned by the special anatomo-physiological characteristics of the eye, the nature of the active substance and the dosage form used for its administration. In this last aspect is where this memory is focused.

Nanoparticulate systems have been widely studied as drug delivery systems in the pharmaceutical and medical fields. At ocular level, these systems have demonstrated an ability to release drugs at target sites and provide alternatives to different conventional treatments.

Glaucoma is one of the most important eye diseases since it is the leading cause of blindness in industrialized countries. This pathology is characterized by a loss of retinal ganglion cells (RGCs) and their axons. In this disease, an increase in intraocular pressure (IOP > 21 mmHg) is common, leading to irreversible damage to the optic nerve, followed by ocular neuropathy and loss of vision. For this reason, ocular hypotensive agents have become the main drug agents used in the treatment of the disease.

Acetazolamide (ACZ) is an active substance that inhibits carbonic anhydrase and its use as an oral intraocular pressure reducer is approved for the treatment of glaucoma. However, its prescription is quite limited due to the potential systemic adverse effects that can generate with the use of this route of administration. In addition, its water solubility is very low (0.7 mg/mL) and its corneal permeability is very limited. For all of the above, the development of topical ocular acetazolamide formulations is a technological challenge.

Another disease with a high incidence at the ocular level is dry eye syndrome. It is a pathology present in 14-33% of the world population. It is considered a multifactorial disease of tears and ocular surface that causes instability of the tear film and is accompanied by an increase in osmolarity of the tear and inflammation of the ocular surface. To this day there is no effective treatment, but only an improvement of its symptoms. In patients with mild or episodic dry eye disease can be controlled with the modification of their environment and daily activities. However, when these preventive measures are insufficient for dry eye syndrome several therapies can be used, such as artificial tears and cyclosporin A.

Artificial tears are used in the treatment of any stage of the disease either alone or in combination with other treatments. The most important components are polymeric and/or viscosifying based lubricants used to increase the residence time of the artificial tears on the ocular surface and to reduce the friction in the eye.

Cyclosporin A (CsA) is an immunomodulator and anti-inflammatory agent that has several applications in ophthalmology, including dry eye syndrome. The extremely low water solubility and hydrophobicity of CsA results in low concentrations of the active substance in the tear film and, taking also into account its low permeability, explains the low ocular bioavailability.

## AIM AND RESULTS

The general aim of the Doctoral Thesis was the development of new nanosystems allowing topical ocular administration of active substances, which in classic dosage formats show formulation problems. The work has been structured in four stages:

A.- Development and characterization of a nanoparticle formulation using a copolymer of HEMA-Bayfit-MA with a good ocular surface tolerance, allowing its ophthalmic topical administration. The synthesis of the copolymer was carried out by the Biomaterials group of *Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP)* led by Dr. Julio San Roman. The structure of the copolymer corresponds to HEMA sequences randomly attached to poloxamer units with three star-shaped branches. In vitro tolerance tests allowed the selection of the most suitable copolymer to prepare the formulation. The preparation of nanosystems was based on nanoprecipitation through dialysis and acetazolamide with low ocular bioavailability was used as the model drug. Nanoparticle characterization includes particle size, Z potential, SEM and in vitro tolerance studies using corneal, conjunctival and macrophage cell lines. The study of the hypotensive activity of the nanosystems loaded with ACZ was performed on rabbits as experimental animal. The results obtained demonstrate that the hypotensive effect in the nanoparticle formulation is increased when compared to the acetazolamide solution at the same concentration.

B.- Development and characterization of a liposomal formulation of acetazolamide with the aim of improving its bioavailability and therefore its hypotensive activity after its topical ocular administration, while preserving the ocular surface and the functionality of the precorneal film. In this chapter two liposomal formulations were made: the first consisting on dispersed liposomes in borate buffer and osmoprotective agents (trehalose and erythritol), the second was made by adding the hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) to the

previous formulation. These formulations were characterized from a physicochemical point of view: vesicle size, pH, osmolarity, rheological behavior and surface tension. Cell viability studies demonstrated optimal tolerance of the formulations. The study of hypotensive activity was performed in normotensive rabbits. With both formulations an increase in the intraocular pressure decrease is achieved when compared to the acetazolamide solution used as active comparator.

C.- Efficacy study of the liposomal formulation of cyclosporin A with sodium hyaluronate in dogs suffering from Dry Eye Syndrome. The liposomal formulation of cyclosporin A (0.1%) developed in the research group includes components similar to those of the precorneal film. The formulation contains phosphatidylcholine as lipid component, trehalose as an osmoprotective agent, vitamin E as antioxidant and sodium hyaluronate as mucomimetic. For this efficacy study, a protocol of clinical evolution was designed to allow dry eye syndrome follow-up in dogs of autoimmune origin or associated with mild or moderate and severe endocrinopathies. The study was designed as a 2-month observational clinical trial, in which patients received treatment 3 times a day. With cyclosporin A liposomal formulation treatment, substantial improvements were observed.

D.- Development and characterization of a new liposomal preparation with ocular topical CsA able to become gel in situ. This preparation would combine the characteristics of a liquid formulation at the time of administration with those of a gel at the site of administration. The aim of this formulation is to increase the time of contact of the components with the ocular surface and therefore to increase its effectiveness, as well as to reduce the number of instillations. The characterization of the formulation includes studies of vesicle size, osmolarity, pH, surface tension and rheological behavior of the formulation. As in previous studies, ocular tolerance tests were performed on rabbits. The efficacy study for this formulation was raised in dogs with very severe dry keratoconjunctivitis. As these were animals with severe pathologies

(severe glandular hypoplasia) it was difficult to find a satisfactory improvement. These severe conditions can not be managed with CsA monotherapy and require more complex treatments.

### CONCLUSIONS

- 1) The HEMA-Bayfit-MA copolymer (5:95) synthesized by the Biomaterials group of *Instituto de Ciencia y Tecnología de Polimeros (ICTP)* is suitable for the preparation of ocular topical nanosystems. These nanoparticles loaded with acetazolamide have an optimal ocular tolerance and their hypotensive activity is significantly higher than the solution of the active substance at the same concentration, for both the maximum decrease and the duration of the effects.
- 2) The liposomal formulation of acetazolamide with hydroxypropylmethylcellulose has an optimal ocular tolerance. The addition of the polymer provides a significant superiority in the hypotensive activity of the liposomal formulation. In addition, with this formulation the bioavailability is increased up to 3.7 times compared to the active substance solution.
- 3) The liposomal formulation of 0.1% cyclosporin A with 0.4% sodium hyaluronate has shown its effectiveness on spontaneous dry eye syndrome in canines. For the two groups of cases studied (mild or moderate and severe), mean values are obtained in the Schirmer test of over 15 mm/min after 60 days of treatment.
- 4) The combination of gellan gum and hydroxypropylmethylcellulose makes it possible to prepare a formulation with cyclosporin A with optimal ocular tolerance and suitable characteristics. The rheological behavior of the in situ simulated gel ensures a higher permanence of the formulation on the ocular surface.



# **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA OCULAR**

Los ojos captan una gran cantidad de estímulos del exterior del organismo y los envían al cerebro donde son procesados.

El globo ocular está constituido por varias túnicas:

- **Túnica externa o fibrosa:** contribuye entre otras funciones a mantener la forma del ojo. La parte posterior de esta capa recibe la denominación de esclerótica o esclera. Dicha zona es blanca, dura, opaca y tiene la función de proteger las partes internas del globo ocular. La parte anterior denominada córnea es blanda, transparente, avascular y actúa como una lente gracias a su forma curva. En la unión entre la córnea y esclerótica se sitúa el seno venoso craneal o canal de Schlemm. Es un pequeño canal circunferencial localizado en el ángulo iridocorneal de la cámara anterior del ojo, por el cual drena el humor acuoso hacia la circulación sanguínea. Tiene un importante papel en la regulación de la presión del humor acuoso del ojo. Si se produce una obstrucción en este canal, se produce una elevación de la presión intraocular, lo cual puede desencadenar una enfermedad conocida como glaucoma.

- Túnica media o vascular: no solo es la capa vascular principal, sino que también regula la incidencia de la luz. Se divide a su vez en tres partes:
  - Coroides: zona vascular que reviste la mayor parte de la superficie interna de la esclerótica. Proporciona nutrientes al epitelio pigmentario de la retina.
  - Cuerpo ciliar: zona formada como resultado del aumento del grosor que se produce en la coroides desde la ora serrata (borde anterior aserrado de la retina) hasta un punto situado inmediatamente por detrás de la unión esclerocorneal. Sus células epiteliales producen el humor acuoso. El musculo ciliar que se encuentra en el cuerpo ciliar esta adherido al cristalino mediante unas fibras que reciben el nombre de ligamentos suspensorios del cristalino. La función de este musculo es dar movilidad al cristalino una correcta acomodación o enfoque de la visión lejana y cercana.
  - Iris: se trata de una zona coloreada situada entre la córnea y el cristalino. A través de sus fibras musculares regula la cantidad de luz que penetra a la parte posterior del ojo a través de la pupila. El tamaño de la pupila está controlado por dos músculos: el esfínter de la pupila que la cierra y está inervado por fibras parasimpáticas y el músculo dilatador de la pupila que la abre y está controlado por fibras simpáticas. Su diámetro es de entre 3 y 4,5 milímetros en el ojo humano. En la oscuridad puede llegar a ensancharse hasta los 5 a 9 mm. Existe una considerable variación en el tamaño máximo de la pupila entre diferentes personas.
- Túnica interna o sensorial: constituida por la retina, en cuyo centro se sitúa la papila óptica, zona de salida del nervio óptico hacia el exterior del globo

ocular. La retina está formada por un epitelio pigmentario (denominada porción no visual) y una zona nerviosa (denominada porción visual). El epitelio pigmentario se encarga de absorber los rayos luminosos dispersos, lo que impide la reflexión y diseminación de la luz dentro del globo ocular. De esta forma se favorece que la imagen proyectada desde la córnea y el cristalino permanezca nítida y clara en la retina. La porción nerviosa de la retina está formada por múltiples capas que procesan ampliamente la información visual antes de transmitir los impulsos nerviosos hacia el tálamo, entre las que se encuentran: la capa de fotorreceptores, la capa de células bipolares y la capa de células ganglionares. La capa de fotorreceptores contiene los llamados conos y bastones. Los bastones son importantes para la visión en blanco y negro y permiten la discriminación entre los diferentes grados de luz y sombras y ver las formas y el movimiento. Los conos proporcionan la visión del color y la agudeza visual en condiciones de luz intensa.<sup>1</sup> Los fotorreceptores sinaptan con las células bipolares que a su vez estas últimas se enlazan con células ganglionares cuyos axones se reúnen para formar las fibras del nervio óptico. Entre las distintas capas encontramos células horizontales que conectan fotorreceptores con fotorreceptores y células amacrinas que conectan células bipolares con algunas células horizontales.

---

<sup>1</sup> Sobotta J, Reinhard P. Sobotta: Atlas de Anatomía humana. Vol. 2. Madrid: Panamericana, 2006.

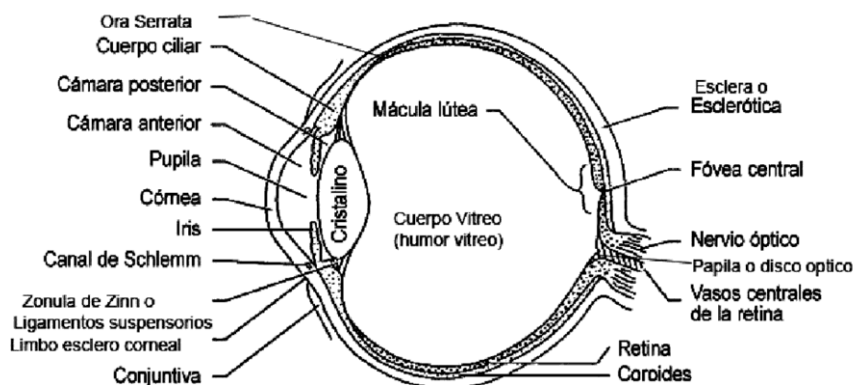


Figura 1.1. Estructura del ojo

## 1.2 GLAUCOMA

El glaucoma es una neuropatía óptica crónica y multifactorial caracterizada por alteraciones estructurales y funcionales del nervio óptico<sup>2</sup>. Se asocia a un daño progresivo del campo visual con una pérdida de sus funciones con efectos perjudiciales sobre la salud y la calidad de vida en los pacientes afectados<sup>3</sup>. La presión intraocular (PIO) es considerada un factor de riesgo primario del glaucoma aunque puede no existir una correlación exacta entre el incremento de la PIO y la aparición de la enfermedad debido a que algunas personas pueden desarrollar la patología con valores de presión intraocular dentro de la normalidad.<sup>4</sup>

Se trata de la segunda enfermedad causante de ceguera en el mundo que se sitúa por detrás de las cataratas. Afecta a 60 millones de personas en todo el

<sup>2</sup> Quigley HA. Glaucoma. The lancet. 2011; 377:1367-77.

<sup>3</sup> Varma R, Lee PP, Goldberg I, Kotak S. An assessment of the health and economic burdens of glaucoma. Am J Ophthalmol 2011;152:515–22.

<sup>4</sup> Ferreiro Lopez S, Ruiz navarro S. Glaucoma. Servicio de oftalmología en atención primaria. 2ªedición. Jaen. 2003. 199-224.

mundo<sup>5</sup> y se prevé que en 2020 sufran esta patología 80 millones de personas, 11,2 millones más de personas que la sufren en los registros actuales.<sup>6</sup>

### 1.2.1 TIPOS DE GLAUCOMA

Existen diferentes tipos de glaucoma. El glaucoma de ángulo abierto y glaucoma de ángulo cerrado son los más frecuentes aunque hay otros tipos como el glaucoma normotensional, glaucomas secundarios y glaucoma congénito<sup>7</sup>.

El glaucoma de ángulo abierto representa un 60% de los casos de glaucoma aumentando su prevalencia en personas mayores de 40 años. No se relaciona con otra enfermedad y tiene un marcado origen genético (4-16% de los casos). Suele ser bilateral.

El glaucoma de ángulo cerrado es el segundo tipo más frecuente (15% de los casos) siendo más prevalente en la mujer que en el hombre (4:1 de los casos) apareciendo en la mayoría de los casos en personas mayores de 50 años y en hipermétropes. Presenta también un componente también hereditario bastante marcado. Generalmente suele ser bilateral aunque también puede ser también unilateral.<sup>8</sup>

Aunque estos dos tipos de glaucoma varían tanto su fisiopatología como en sus factores de riesgo su tratamiento clínico suele ser el mismo.<sup>9</sup>

---

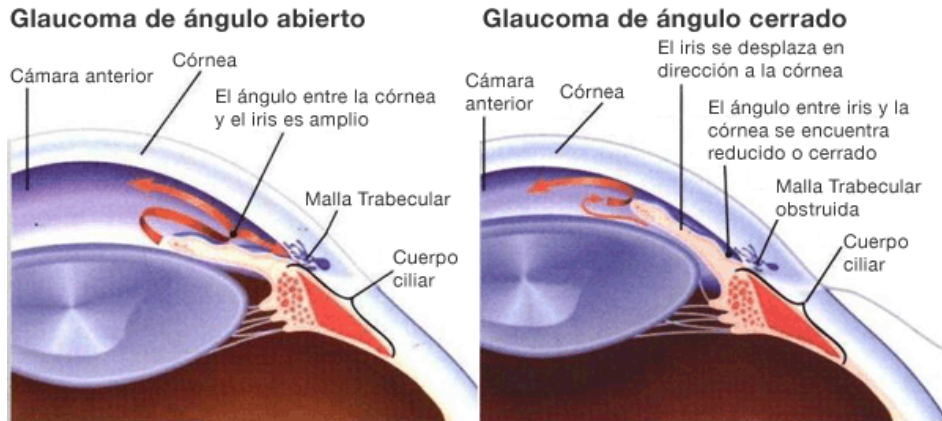
<sup>5</sup> . Kingman S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. Bull World Health Organ. 2004;82:887-888.

<sup>6</sup> Rieck J. The Pathogenesis of Glaucoma in the Interplay with the Immune System. Investigative Ophthalmology & Visual Science. March2013;54(3):2393-2409.

<sup>7</sup> Long K. Glaucoma an insight into disease and therapy. Canadian pharmacist association. 2006.

<sup>8</sup> Ferreiro López S, Ruiz navarro S. Glaucoma. Servicio de oftalmología en atención primaria. 2ªedición. Jaen. 2003. P. 199-224.

<sup>9</sup> Broadway DC, Nicolela MT, Drance SM. Optic Disk Appearances in Primary Open-Angle Glaucoma. Survey of ophthalmology. 1999;43:223-243.



**Figura 1.2.** *Causas del glaucoma de ángulo abierto y cerrado*

### 1.2.2 FACTORES DE RIESGO

Al tratarse de una enfermedad multifactorial, no se va a encontrar un solo factor desencadenante de la patología. Los factores más comunes del glaucoma son los siguientes:

- Presión intraocular elevada: es el principal factor de riesgo aunque hay pacientes que padecen glaucoma sin elevación de la presión intraocular.
- Sexo: las mujeres tienen más probabilidad de sufrir la enfermedad que los hombres.
- Edad avanzada: en personas de la tercera edad hay un número mayor de casos de glaucoma.<sup>10</sup>
- Antecedentes familiares: la genética influye en gran medida, incrementándose la probabilidad de sufrir la patología.

<sup>10</sup> Coleman AL, Miglior S. Risk Factors for Glaucoma Onset and Progression. *Survey of Ophthalmology*. November 2008; 53(6):3–10

- Raza: la raza negra tiene una prevalencia 4-16 veces mayor que la blanca siendo predominante el tipo de glaucoma de ángulo abierto. La tasa de ceguera es hasta 6 veces mayor.<sup>11</sup>
- Miopía: existe un incremento de la probabilidad de sufrir la enfermedad en personas que sufren miopía.
- Pacientes con problemas cardiovasculares<sup>12</sup>

### 1.2.3 FISIOPATOLOGÍA

El incremento de la PIO en el glaucoma depende de la velocidad de producción del humor acuoso y de la resistencia al flujo en los canales de drenaje. En condiciones normales, el volumen de este fluido es aproximadamente 250 µL y su velocidad de producción media de 2,5 µL/min.

El humor acuoso fluye desde la cámara posterior hacia la anterior a través de la pupila. Cuando alcanza la cámara anterior, es drenado a través de la vía trabecular o la vía uveoescleral. La vía trabecular o convencional representa el drenaje a través de la red trabecular y es el mayoritario (90%). Por esta vía el humor acuoso llega al conducto de Schlemm y de ahí, a través de los conductos deferentes, se dirige al sistema venoso. El resto del humor acuoso es eliminado utilizando la vía uveoescleral o no convencional. El drenaje por dicha vía se produce a través del cuerpo ciliar hacia el espacio supracoroideo, para ser posteriormente drenado por la circulación venosa en el cuerpo ciliar, la coroides y la esclera. Cierta volumen de humor acuoso se drena de forma adicional por el iris.<sup>13</sup>.

---

<sup>11</sup> Gonzalez-Martinez A. Tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto. JANO 22-28. ABRIL 2005;66(1562);1380-1383.

<sup>12</sup> Pache M and Flammer J. A Sick Eye in a Sick Body? Systemic Findings in Patients with Primary Open-angle Glaucoma. Survey of ophthalmology. 2006 May-Jun;51(3):179-212.

<sup>13</sup> Ofri R. intraocular pressure and glaucoma. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2002; 5(2):391-406.

El sistema nervioso controla la dinámica del humor acuoso, principalmente a través de la vía simpática y parasimpática. El sistema nervioso autónomo simpático interviene en la formación de humor acuoso y el parasimpático en su drenaje.

En el glaucoma de ángulo abierto, la alteración se produce en la malla trabecular que produce la dificultad del drenaje del humor acuoso por el canal de Schlemm, provocando retenciones del líquido y daño en el nervio óptico. Respecto al glaucoma de ángulo cerrado, se produce por un defecto en el iris y cristalino que ejercen una presión en la pupila. Esto provoca un drenaje insuficiente del humor acuoso por la pupila dirección a la malla trabecular<sup>14</sup>.

En ambos casos la retención del humor acuoso provoca un aumento de la presión provocando destrucción progresiva en las células ganglionares de la retina y daño del nervio óptico siendo por ello el principal factor de riesgo en el glaucoma.

La homeostasis y la supervivencia de las células ganglionares de la retina dependen de una función de equilibrado del sistema inmune. El sistema inmunitario elimina los agentes patógenos y los desechos celulares para mantener la homeostasis del sistema nervioso central a través de la apoptosis, aceptado como una parte fundamental en la neurodegeneración glaucomatosa<sup>15 16</sup>. El inicio de la muerte celular programada está vinculado a la proteína supresora tumoral p53 y activación del receptor CD95 en condiciones

---

<sup>14</sup> Kim YY, Jung HR. Clarifying the Nomenclature for Primary Angle-Closure. *Survey of ophthalmology*. 1997;42(2):125-136.

<sup>15</sup> Rieck J. The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:2393-2409.

<sup>16</sup> Agar A, Li S, Agarwal N, Coroneo, Hill. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. *Brain Res*. 2006;1086:191-200.

autorreactivas<sup>17 18</sup>. Los neurotransmisores tales como la dopamina, serotonina y glutamato tienen el potencial de conducir a las células ganglionares a la apoptosis a través de mecanismos excitadores<sup>19</sup>. El stress tisular crónico y factores dependientes de la edad parecen ser los responsables del fracaso de la regulación actividad inmune, así como a un aumento de la susceptibilidad neuronal a una lesión en el glaucoma. La disfunción mitocondrial y el resultante estrés oxidativo están directamente implicados en el daño neuronal pueden facilitar la desregulación de la actividad inmune durante la neurodegeneración glaucomatosa. De manera similar, la respuesta de la actividad crónica y la disfunción neuroprotectora de la glía bajo estrés glaucomatoso puede ser potencialmente neurotóxico, así como afectar a las funciones inmunorreguladoras<sup>20</sup>.

#### **1.2.4 EVALUACIÓN CLÍNICA**

El diagnóstico de glaucoma no siempre es fácil. La evaluación cuidadosa del nervio óptico sigue siendo esencial. La detección temprana a través de exámenes regulares y completos de los ojos es la clave para proteger la visión. Un examen ocular completo consta de 5 pruebas comunes para detectar el glaucoma: medición de la PIO (tonometría), observación del interior del ojo (oftalmoscopia), evaluación del campo visual del paciente (perimetría),

---

<sup>17</sup> Nickells RW. The molecular biology of retinal ganglion cell death: caveats and controversies. *Brain Res Bull.* 2004;62:439-446.

<sup>18</sup> Li Y, Schlamp CL, Poulsen GL, Jackson MW, Griep AE, Nickells RW. p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by Nmethyl-D-aspartate. *Mol Vis.* 2002;8:341-350.

<sup>19</sup> Russo R, Rotiroti D, Tassorelli C, et al. Identification of novel pharmacological targets to minimize excitotoxic retinal damage. *Int Rev Neurobiol.* 2009;85:407-423.

<sup>20</sup> Tezel G, Yang X, Cai J. Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:3177-3187

evaluación de la profundidad y forma del ángulo de la cámara anterior (gonioscopia) y medición del grosor de la córnea (paquimetría)<sup>21</sup>.

Respecto a la medición de la PIO, los métodos de medición más utilizados son la tonometría por aplanación y la tonometría de rebote:

Tonometría de aplanación: la PIO se mide por la resistencia al aplanamiento de un área determinada de la córnea. Esta técnica puede resultar molesta y por ello se recurre al empleo de anestésicos antes de cada medida. Un ejemplo de este método de medida es el tonómetro Tonopen XL<sup>®22</sup>



**Figura 1.3.** *Tonómetro de aplanación*



**Figura 1.4.** *Tonómetro de rebote*

Tonometría de rebote: la PIO se calcula por la vibración del embolo al rebotar sobre la superficie ocular. Una ventaja que aporta esta técnica sobre la anterior es que no es necesario el uso de anestésicos locales ya que el proceso de

---

<sup>21</sup> de Moraes CG, Liebmann JM, Medeiros FA, Weinreb RN. Management of advanced glaucoma: characterization and monitoring. *Surv Ophthalmol.* 2016;61(5):597-615.

<sup>22</sup> Gomes BA, Turiel P, Cavalcanti RS, Moraes HV Jr, Santhiago MR. The accuracy of Goldmann applanation tonometry over silicone hydrogel contact lenses in patients with glaucoma. *Cont Lens Anterior Eye.* 2014 Aug;37(4):297-9.

medida no es molesto. Un ejemplo de este método de medida es el tonómetro Tonovet<sup>®23</sup>.

### 1.2.5 TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA

El único tratamiento farmacológico aprobado actualmente para el glaucoma va dirigido en la disminución la PIO a través de distintos mecanismos de acción pudiendo ser bien mediante un aumento del drenaje hacia fuera del humor acuoso o una disminución en su producción<sup>24</sup>.

La elección del fármaco más idóneo para cada paciente se basa en los siguientes parámetros: diferentes mecanismos de acción, asequible económicamente, adecuado posológicamente, efectos secundarios mínimos y disminución de la PIO para evitar el progresión.<sup>25</sup>

Entre los tratamientos farmacológicos más comunes se encuentran los siguientes:

- Alfa agonistas adrenérgicos: reducen la producción de humor acuoso por el cuerpo ciliar y favorecen su drenaje. La elevada incidencia de efectos secundarios (hiperemia conjuntival, hipertensión arterial, extrasístoles, taquicardia...) obliga al abandono del tratamiento en muchos pacientes.

---

<sup>23</sup> Zeri F, De Cusatis M, Lupelli L, Swannd PG. The measurement of intraocular pressure over positive soft contact lenses by rebound tonometry. *Journal of Optometry* 2016;9: 182-188.

<sup>24</sup> Wentz SM, Kim NJ, Wang J, Amireskandari A, Siesky B, Harris A. Novel therapies for open-angle glaucoma. *F1000Prime Rep.* 2014;6:102.

<sup>25</sup> Migueli-Rodriguez M, Coba-Gonzalez MJ, Ortiz-Gonzalez E, Perez-Tamayo B. Actualidad en el tratamiento médico del glaucoma. *Rev Cubana Oftalmol.* 2004;17(1):0-0.

- **Betabloqueantes:** reducen la producción de humor acuoso por los cuerpos ciliares. Entre sus efectos secundarios encontramos hipotensión arterial y disminución del calibre bronquial.
- **Agentes colinérgicos:** favorecen la eliminación del humor acuoso por la malla trabecular pero sus efectos secundarios son mal tolerados (miosis permanente, alteraciones de la agudeza y el campo visual y espasmo de la acomodación).
- **Análogos de prostaglandinas:** favorecen la salida de humor acuoso por la vía uveoescleral. Se emplea como tratamiento inicial debido a que disminuye la PIO entre un 30 y 35% además de tener menos efectos adversos que los otros tratamientos. Aun así tiene también reacciones adversas indeseables como coloración marrón del iris, prolongación de las pestañas y edema macular cistoide.
- **Inhibidores de la anhidrasa carbónica:** reducen la producción de humor acuoso en los cuerpos ciliares. Los podemos encontrar tanto tópicos como orales (acetazolamida) teniendo la vía oral muchas más efectos secundarios como son parestesias, malestar fatiga, depresión, alteraciones gastrointestinales, y cálculos renales.<sup>26</sup>

Los fármacos de elección para la disminución de la PIO son los beta bloqueantes y las prostaglandinas debido a su mejor tolerancia y control de la enfermedad, aunque la monoterapia no suele ser suficiente para el control de la patología y se requiere una combinación de fármacos.

---

<sup>26</sup> García Sánchez J, García Feijoo J. Tratamiento médico del glaucoma. Arch Soc Esp Oftalmol. 2000;75:11-20.

La mayoría de los tratamientos con independencia de su actividad farmacológica, se formulan como colirios debido a su actuación en el lugar de acción y un menor riesgo de efectos secundarios a nivel sistémico. Aun así siguen existiendo tratamientos en comprimidos orales como es el caso de la acetazolamida.

En casos graves o si existe fallo del tratamiento farmacológico se puede garantizar el flujo de salida del humor acuoso con terapia laser (trabeculoplastia con láser de argón) o procedimientos quirúrgicos (trabeculectomía, iridotomía y cirugía filtrante)<sup>27 28</sup>.

Como se ha señalado anteriormente, con independencia de los valores de la PIO, en el glaucoma se produce una degeneración de las células ganglionares. Por esta razón, actualmente también se están investigando agonistas de receptores de cannabinoides como el tetrahidrocannabinol por su posible eficacia en el glaucoma y la neuroprotección<sup>29</sup>. También se están ensayando tratamientos con inhibidores de glutamato como la memantina y aminoguanidina (modelos animales) debido a su efecto de neuroprotección sobre células ganglionares de la retina<sup>30</sup>.

En cualquier caso actualmente el glaucoma no tiene curación. Por esta razón, tanto los tratamientos farmacológicos como los quirúrgicos van encaminados a detener la pérdida de visión sin posibilidad de recuperación de la vista perdida.

---

<sup>27</sup>Neil M. Schultz, William B. Wong, Anne L. Coleman, Daniel C. Malone. Predictors, Resource Utilization, and Short-term Costs of Laser Trabeculoplasty Versus Medication Management in Open-Angle Glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*. 2016;168:78-85.

<sup>28</sup>Shalaby U, Amin Heikal M. Unilateral surgically induced Necrotizing Scleritis after trabeculectomy with Ologen in a patient with pigmentary glaucoma. *American Journal of Ophthalmology Case Reports* 2016;3:47-49.

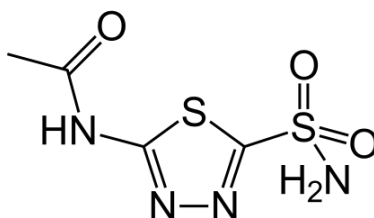
<sup>29</sup>Nucci C, Bari M, Spano A, et al. Potential roles of (endo)cannabinoids in the treatment of glaucoma: from intraocular pressure control to neuroprotection. *Prog Brain Res*. 2008;173:451-464.

<sup>30</sup>Gao L, Chen X, Tang Y, Zhao J, Li Q, Fan X, Xu H, Yin ZQ. Neuroprotective effect of memantine on the retinal ganglion cells of APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DE9</sup> mice and its immunomodulatory mechanisms. *Exp Eye Res*. 2015 Jun;135:47-58.

### 1.2.6 ACETAZOLAMIDA

- Características físico-químicas

Químicamente está en grupo de las sulfonamidas. Se trata del *N*-(5-(aminosulfonyl)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-acetamida.



**Figura 1.5.** Estructura química de la acetazolamida

Se trata de un polvo blanco muy poco soluble en agua, poco soluble en alcohol, prácticamente insoluble en éter, cloroformo y tetracloruro de carbono. Se disuelve en disoluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.<sup>31</sup>

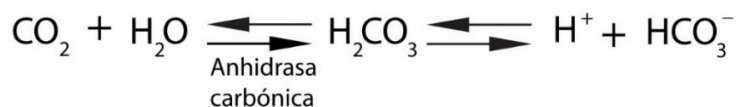
- Actividad farmacológica en el ojo

La acetazolamida es un potente inhibidor de la anhidrasa carbónica, encargada de catalizar la hidratación del dióxido de carbono que se convierte así en ácido carbónico y posteriormente en bicarbonato. Cuando la anhidrasa carbónica se inhibe, se disminuye la producción de bicarbonato y como resultado se produce

---

<sup>31</sup> Farmacopea española. Segunda edición. 2003. Madrid. Ministerio de sanidad y consumo. 632-633.

una alteración en la secreción de iones (principalmente el ión sodio) responsables de la producción de humor acuoso.<sup>32</sup>



**Figura 1.6.** *Reacción química catalizada por la anhidrasa carbónica*

La solubilidad de la acetazolamida tanto en la lagrime como en el agua es muy baja (0,7 mg/mL) y su penetración corneal está muy limitada (logP=3). Estas condiciones limitan su empleo en la administración tópica ocular.<sup>33</sup>

- Usos de la acetazolamida

Su uso es muy amplio, utilizándose frente patologías como:

- Cardiacas. En angina de pecho.
- Epilepsia. Ausencias, epilepsias mioclónicas y petit mal.
- Desordenes gastro-intestinales. Cloridorrea y pancreatitis.
- Síndrome de meniere.
- Mal de montaña.
- Desordenes musculares y reumáticos.
- Hipertensión intracraneal.
- Desordenes renales. Cálculos renales.
- Desordenes respiratorios. EPOC

---

<sup>32</sup> Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucomatherapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;248:1-14.

<sup>33</sup> Aggarwal D, Pal D, Mitra AK, Kaur IP. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;338:21-26.

Además de todos estos usos, en el ámbito ocular se emplea para disminuir la PIO en el glaucoma. Este fármaco se utiliza por vía oral<sup>34</sup>.

La acetazolamida actualmente es uno de los fármacos más potentes para disminuir la PIO. Sin embargo no es muy amplio debido a sus efectos secundarios extraoculares. Por ello, a pesar de su eficacia, su empleo queda relegado a terapias en que otro anti-glaucomatosos no han resultado eficaces, tratándose de un fármaco de segunda elección tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes antihipertensivos.<sup>35</sup>

Para tratar de evitar los efectos secundario sistémicos de la acetazolamida por vía oral, se esa trabajando en nuevas formulaciones tópicas, siendo el principal objeto de estudio la mejora en su biodisponibilidad y coeficiente de penetración por vía ocular

### **1.3 SÍNDROME DE OJO SECO**

El síndrome de ojo seco (SOS) es una enfermedad que afecta en porcentaje que se calcula comprendido entre el 10% - 35% de la población mundial<sup>36</sup>. Afecta a la calidad de vida de los pacientes y también tiene efectos sobre la salud ocular y la función visual<sup>37</sup>. El impacto en la calidad de vida ha sido calificado como el

---

<sup>34</sup> Reynolds JEF. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 31ª Edicin. Londres. The Royal Pharmacopoeia, 1996.

<sup>35</sup> Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucomatherapeutics. International Journal of Pharmaceutics 2002;248:1-14

<sup>36</sup> Pflugfelder SC. Prevalence, burden, and pharmacoconomics of dry eye disease. Am J Manag Care. 2008 Apr;14(3 Suppl):S102-6.

<sup>37</sup> Lemp MA, Baudouin C, Baum J, Dogru M, Foulks GN, Kinoshita S, Laibson P, et al. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). Ocul Surf. 2007 Apr;5(2):75-92.

efecto de la angina de pecho moderada<sup>38</sup> o la diálisis<sup>39</sup>. Debido a su origen multifactorial, el SOS puede manifestarse con una gran variedad de formas y por lo tanto es difícil de diagnosticar. No existe una prueba clínica única fiable para distinguir los individuos que padecen SOS a los que no<sup>40 41</sup>.

En la actualidad la definición internacional aceptada define el ojo seco como una enfermedad multifactorial de las lágrimas y de la superficie ocular que origina malestar ocular, problemas visuales e inestabilidad de la película lagrimal con lesión potencial, acompañándose de un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular<sup>42</sup>.

Dentro de los síntomas que acompañan al SOS se encuentran los siguientes: comezón, ardor, escozor, dolor, ojos pegajosos, sensibilidad a la luz del sol o luz brillante, sensación de cuerpo extraño, irritación ocular, visión borrosa, incomodidad con el aire acondicionado o el viento sobre los ojos, intolerancia a lentes de contacto y/o enrojecimiento ocular<sup>43</sup>.

---

<sup>38</sup> Schiffman RM, Walt JG, Jacobsen G, Doyle JJ, Lebovics G, Sumner W. Utility assessment among patients with dry eye disease. *Ophthalmology* 2003;110(7):1412-9.

<sup>39</sup> Buchholz P, Steeds CS, Stern LS, Wiederkehr DP, Doyle JJ, Katz LM, Figueiredo FC. Utility assessment to measure the impact of dry eye disease. *Ocul Surf* 2006;4(3):155-61.

<sup>40</sup> Bron AJ, Abelson MB, Ousler G, Pearce E, Tomlinson A, Yokoi N, Smith JA, et al. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007), *Ocul. Surf.* 2007;5(2):108–152.

<sup>41</sup> McGinnigle S, Naroo SA, Eperjesi F. Evaluation of dry eye. *Surv. Ophthalmol.* 2012;57(4):293–316.

<sup>42</sup> Report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye work shop. The definition and classification of dry eye disease. *The Ocular Surface* 2007; Apr;5;2.

<sup>43</sup> Barabino S, Labetoulle M, Rolando M, Messmer EM. Understanding Symptoms and Quality of Life in Patients With Dry Eye Syndrome. *The ocular Surface. Ocul Surf.* 2016 Jul;14(3):365-76.

### 1.3.1 ETIOPATOGENIA: TIPOS DE OJO SECO

#### 1.3.1.1 OJO SECO ACUO-DEFICIENTE

Este tipo de ojo seco se origina por la sequedad ocular producida por una alteración de la película lagrimal, como consecuencia de una disminución del volumen y de la secreción lagrimal. A diferencia de otras causas de ojo seco, la evaporación del agua de la película lagrimal no se ve afectada, sino que se origina una disminución de la producción de la parte acuosa de la lágrima. Como consecuencia tiene lugar un aumento de la osmolaridad lagrimal que conduce a su vez a un proceso inflamatorio en la superficie ocular. La inflamación implica infiltración de células inflamatorias y la liberación de distintas citoquinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, TNF-alpha) provocando también edema y neovascularización. Además también se incrementan las concentraciones de metaloproteinasas, como la MMP-9, que lisa las uniones intercelulares de las células del epitelio corneal. Como resultado de este proceso inflamatorio, la córnea se altera con la creación de un tejido de cicatrización que puede provocar alteraciones de la visión<sup>44</sup>.

El ojo seco acuo-deficiente se divide a su vez en ojo seco derivado del síndrome de Sjögren o no derivado del síndrome de Sjögren.

- Ojo seco derivado del síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren se define como una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a las glándulas exocrinas de las membranas mucosas, lo que resulta en el ojo seco y sequedad de boca, pero también en trastornos muscular

---

<sup>44</sup> Luo L, Li D-Q, Doshi A, et al. Experimental Dry Eye Stimulates Production of Inflammatory Cytokines and MMP-9 and activates MAPK Signaling Pathways on the Ocular Surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004;45(12):4293-301.

esqueléticos adicionales y daños en otras partes del cuerpo<sup>45</sup>. En los primeros niveles de la enfermedad se origina un síndrome de Sjögren primario, viéndose afectado solamente las glándulas lagrimales y salivares produciendo ojo seco y/o boca seca. Cuando la enfermedad avanza se ven afectados otros tejidos conectivos provocando otras enfermedades como la artritis reumatoide o lupus eritematoso (síndrome de Sjögren secundario). En este nivel de la enfermedad también se pueden ver afectado el tracto gastrointestinal, la piel y los pulmones, inclusive desarrollar un linfoma de Hodgkin<sup>46</sup>.

- Ojo seco no derivado del síndrome de Sjögren

Al contrario que el anterior, la disfunción lagrimal no va a derivar de ningún proceso autoinmune, siendo la causa más común la edad. Este tipo de ojo seco también puede deberse a la obstrucción de las glándulas lagrimales por conjuntivitis, hiposecreción refleja debido a bloqueo sensorial o motor, o inclusive, al uso de fármacos sistémicos en los que se incluyen los antihistamínicos, betabloqueantes, diuréticos, metildopamina anticolinérgicos, opiáceos, benzodiacepinas, inhibidores de la MAO, fenotiazinas, antidepresivos tricíclicos, ciclobenzaprina, metocarbamol, efedrina, e inhibidores de la anhidrasa carbónica<sup>47 48 49</sup>.

La hiposecreción lagrimal refleja puede producirse por un bloqueo de la secreción o por un daño en el séptimo par craneal, donde se encuentran la innervación de las glándulas lagrimales. Por ello se disminuiría tanto la secreción

---

<sup>45</sup> Grayzel AI. What is Sjogren's? Chapter 2. In: Wallace DJ, ed. The Sjogren's Book, Fourth Ed. New York, Oxford University Press, 2012. pp. 7-10.

<sup>46</sup> Nguyen C, Peck A. Unraveling the Pathophysiology of Sjögren Syndrome-Associated Dry Eye Disease. *Ocul Surf.* 2009;7:11-27.

<sup>47</sup> Michael A. Lemp and Gary N. Foulks. The Definition & Classification of Dry Eye Disease. Guidelines from the 2007 International Dry Eye Workshop. April 2008

<sup>48</sup> Moss SE, Klein R, Klein BEK. Long-term Incidence of Dry Eye in an Older Population. *Optometry & Vision Science* 2008;85:668-674.

<sup>49</sup> Mintzer J, Burns A. Anticholinergic Side-effects of Drugs in Elderly People. *J R Soc Med.* 2000;September;93:457-462.

lagrimal refleja como la frecuencia del parpadeo, aumentándose la velocidad de evaporación de la lágrima. La diabetes también produce una disminución de la secreción lagrimal debido a que el metabolismo anormal de la glucosa afecta al epitelio corneal, provocando una alteración en la membrana celular y disminuyendo el número de células epiteliales. Por ello, los diabéticos tienen un mayor riesgo de sufrir lesiones corneales y queratitis microbianas presentando una menor sensibilidad corneal y como consecuencia, una alteración en la calidad y la cantidad de las lágrimas reflejas<sup>50</sup>.

Los pacientes sometidos a cirugías oculares refractivas y los portadores de lentes de contacto también experimentan una disminución de la sensibilidad corneal que igualmente puede afectar a la secreción refleja de la lágrima.

#### 1.3.1.2 OJO SECO EVAPORATIVO

El ojo seco evaporativo se produce por la pérdida excesiva de agua de la superficie ocular con una secreción lagrimal normal. La pérdida de agua genera hiperosmolaridad en la lágrima que acompaña a su vez con inflamación de la superficie ocular. El origen del ojo seco evaporativo puede ser por causas intrínsecas que afectan a la estructura y a la dinámica de los párpados o por causas extrínsecas que producen alteraciones en la superficie ocular.

- Causas intrínsecas
  - Disfunción de las glándulas de Meibomio: las glándulas de Meibomio situadas en el párpado inferior y superior secretan los componentes

---

<sup>50</sup> Pippa C, Peter C, Harry B, Ken S, Bal D. Tear Production and Corneal Sensitivity in Diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2007;21:371-373.

lipídicos de la película lagrimal. Disfunciones en este proceso provocan una película con menos cantidad de lípidos y con ello una mayor facilidad para la evaporación y el derramamiento de la lágrima<sup>51</sup>.

- Alteraciones relacionadas con la apertura de los párpados: un aumento de la exposición de la superficie ocular al medio externo puede provocar sequedad ocular e hipersosmolaridad. La craneoestenosis (alteración congénita en la que se produce el cierre prematuro de una o más de las suturas que separan los huesos del cráneo de un bebé), exoftalmos endocrino (como un incremento de la anchura palpebral) y otros tipos de proptosis e inclusive la miopía, pueden provocar el ojo seco. Un mal posicionamiento o deformación de los párpados pueden también llevar a un pobre rejuvenecimiento de la película lagrimal. En el caso de intervenciones de cirugía plástica de párpados, posibles complicaciones postquirúrgicas<sup>52 53 54</sup>.
- Frecuencia del parpadeo: el secado de la superficie ocular puede deberse por una frecuencia de parpadeo baja<sup>55</sup>. Las causas son por situaciones que requieren cierta concentración (trabajar con el ordenador, observar muestras al microscopio) y el ojo permanece más tiempo sin parpadear<sup>56</sup>. El Parkinson también produce una disminución

---

<sup>51</sup> Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, et al. The international Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Executive Summary. *Investigative & Visual Science*. 2011;52(4):1922-9.

<sup>52</sup> Rolando M, Refojo MF, Kenyon KR. Tear water evaporation and eye surface diseases. *Ophthalmologica* 1985;190:147-9.

<sup>53</sup> Lemp MA. Surfacing abnormalities in the preocular tear film and dry eye syndromes. *Int Ophthalmol Clin* 1973;13:191-9.

<sup>54</sup> Rees TD, Jelks GW. Blepharoplasty and the dry eye syndrome: guidelines for surgery? *Plast Reconstr. Surg* 1981;68:249-52.

<sup>55</sup> Abelson MB, Ousler GW III, Nally LA, et al. Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt B):121-5.

<sup>56</sup> Nakamori K, Odawara M, Nakajima T, et al. Blinking is controlled primarily by ocular surface conditions. *Am J Ophthalmol* 1997;124:24-30.

de la frecuencia del parpadeo por desórdenes extrapiramidales causados por una disminución de sustancias dopaminérgicas en las neuronas de la sustancia negra<sup>57</sup>.

- Causas extrínsecas
  - Deficiencia de vitamina A (xeroftalmia): La vitamina A es necesaria para el desarrollo de células caliciformes en las mucosas oculares y la expresión de mucinas<sup>58</sup> <sup>59</sup>. La deficiencia de esta vitamina da lugar a inestabilidad de la película precorneal y puede afectar al correcto funcionamiento del sistema lagrimal produciendo ojo seco<sup>60</sup> <sup>61</sup>.
  - Administración de fármacos por vía tópica con conservantes: la aplicación de colirios con conservantes puede provocar una respuesta toxica en la superficie ocular. Uno de ellos y quizás el conservante que mas ampliamente ha sido utilizado, el BAC (cloruro de benzalconio), produce daño en las células epiteliales de la superficie ocular y queratitis punteada epitelial, impidiendo una humectación correcta por parte de la película lagrimal. Los pacientes sometidos a tratamientos prolongados con este tipo de formulaciones como es el caso de glaucoma, frecuentemente desarrollan síntomas y signos de ojo seco por el uso de

---

<sup>57</sup> Lawrence MS, Redmond DE Jr, Elsworth JD, et al. The D1 receptor antagonist, SCH23390, induces signs of Parkinsonism in African green monkeys. *Life Sci* 1991;49:PL229-34.

<sup>58</sup> Tei M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK. Vitamin A deficiency alters the expression of mucin genes by the rat ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:82-8.

<sup>59</sup> Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, et al. Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:114-22.

<sup>60</sup> Calonge M, The treatment of Dry Eye. *Survey of Ophthalmology*. 2001;45(Supplement 2):S227-S39.

<sup>61</sup> Sommer A, Emran N. Tear production in a vitamin A responsive xerophthalmia. *Am J Ophthalmol* 1982;93:84-7.

los mismos y que por lo general es reversible al cambio de preparaciones sin conservantes<sup>62</sup>.

- Portadores de lentes de contacto: el uso de lentes de contacto ha demostrado que contribuye al aumento de número de casos de SOS debido a que produce un incremento en la evaporación de la lágrima y con ello un aumento de la osmolaridad que provoca daño corneal<sup>63 64</sup>. Además las lentes de contacto producen una disminución de la cantidad de mucinas presentes en la lágrima<sup>65</sup>.
- Enfermedades y alergias de la superficie ocular: en las alergias oculares el alérgeno entra en contacto con la superficie ocular que provoca una degranulación de los mastocitos con el lanzamiento de citoquinas inflamatorias<sup>66 67</sup>. Como cualquier enfermedad crónica la superficie ocular conlleva una disminución de las células caliciformes de la conjuntiva que favorece la aparición del ojo seco evaporativo.

---

<sup>62</sup> Pisella PJ, Pouliquen P, Baudouin C. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br J Ophthalmol* 2002;86:418-23.

<sup>63</sup> Korb DR, Greiner JV, Herman JP, et al. Lid-wiper epitheliopathy and dry-eye symptoms in contact lens wearers. *CLAO J* 2002;28(4):211-6.

<sup>64</sup> Glasson MJ, Stapleton F, Keay L, Willcox MDP. The effect of short term contact lens wear on the tear film and ocular surface characteristics of tolerant and intolerant wearers. *Contact Lens and Anterior Eye* 2006;29:41-47.

<sup>65</sup> Ramamoorthy PN, Nichols JJ. Mucins in Contact Lens Wear and Dry Eye Conditions. *Optom Vis Sci* 2008;Aug;85:631-42.

<sup>66</sup> Stahl J, Cook E, Barney N, Graziano F. Pathophysiology of ocular allergy: the roles of conjunctival mast cells and epithelial cells. *Current Allergy and Asthma Reports*.2002;2:332-339.

<sup>67</sup> Baudoin C. Conditions bordering on allergy. *J Fr Ophtalmol* 2007 Mar;30:306-13.

### 1.3.2 TRATAMIENTO

En general, la terapia varía dependiendo de la causa y la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente al tratamiento. El objetivo común a alcanzar es mejorar la calidad de vida de los pacientes mediante la reposición del equilibrio de la superficie ocular. En la actualidad no existe un tratamiento eficaz, sino una mejoría de sus síntomas.

La terapia varía en función del grado de severidad de la patología. En pacientes con ojo seco leve o episódico se puede controlar la enfermedad con la modificación de su entorno y de las actividades diarias. Se debe evitar medicamentos sistémicos que pueden reducir la secreción lagrimal y mantener una higiene del parpado y los bordes palpebrales para evitar la blefaritis anterior y la disfunción de las glándulas de Meibomio. Evitar fumar debido a los irritantes del humo del tabaco y mantener una dieta saludable a base de ácidos grasos omega 3 puede reducir el grado de severidad del ojo seco. También es importante evitar ambientes secos o corrientes de aire directas (aires acondicionados, ventiladores cuya corriente de aire se dirige a la cara o el aire caliente de los hornos). Por último, limitar tareas que impliquen una frecuencia de parpadeo reducida puede ayudar a reducir o controlar los síntomas<sup>68 69 70</sup>. Sin embargo, cuando estas medidas preventivas son insuficientes en el síndrome del ojo seco, existen diversas terapias a utilizar.

---

<sup>68</sup> Optometric Clinical Practice Guideline: Care of the Patient with Ocular Surface Disorders, 2011. <http://www.aoa.org/documents/optometrists/CPG-10.pdf>. Accessed January 21, 2015.

<sup>69</sup> Benitez del Castillo JM, Vico E. Tratamiento del ojo seco. *Gaceta óptica* 2004;385(6):1-32.

<sup>70</sup> Jackson WB. Management of dysfunctional tear syndrome: a Canadian consensus. *Can J Ophthalmol* 2009;44:385-94.

### 1.3.2.1 LÁGRIMAS ARTIFICIALES.

Las lágrimas artificiales se utilizan en el tratamiento de cualquier estadio de la enfermedad tanto solas como en combinación con otros tratamientos. Estos productos tratan de imitar la composición de una lágrima natural aunque no hay actualmente ninguna formulación en el mercado que incluya la totalidad de los componentes que integran las lágrimas naturales.

La mayoría de las lágrimas artificiales están constituidas principalmente por agua. Con el fin de regular el pH y la osmolaridad también se incluyen diversos electrolitos como NaCl, KCl, Zn, NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, etc. Sus componentes más importantes son lubricantes de base polimérica o viscosizantes con el fin de aumentar el tiempo de permanencia de la lagrima sobre la superficie ocular aumentando su humectabilidad y reducir la fricción entre el globo ocular y las pestañas facilitando el parpadeo. El ácido hialurónico es un agente viscosizante altamente higroscópico ampliamente utilizado por su propiedad de revestimiento sobre la superficie ocular con elevados tiempos de permanencia. Además de los agentes viscosizantes, ciertos suplementos lacrimales intentan imitar el componente lipídico de las lágrimas con el fin de estabilizar la película lagrimal y retardar la evaporación<sup>71</sup>.

A parte de las soluciones acuosas también se han desarrollado pomadas, ungüentos o geles con el objetivo de formar una barrera más eficaz que evite la desecación de la superficie ocular. Sin embargo, al ser preparados de alta viscosidad causan visión borrosa y se dedican exclusivamente a la aplicación nocturna complementando el tratamiento durante el día con otros sustitutos lacrimales.

---

<sup>71</sup> Foulks GN, Forstot SL, Donshik PC, Forstot JZ, Goldstein MH, Lemp MA, Nelson JD, Nichols KK, Pflugfelder SC, Tanzer JM, Asbell P, Hammitt K, Jacobs DS. Clinical Guidelines for Management of Dry Eye Associated with Sjögren Disease. *Ocul Surf.* 2015 Apr;13(2):118-32.

Otra opción para la lubricación prolongada de la superficie ocular son los insertos de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). El inserto se coloca en el *cul-de-sac* y se disuelve a la temperatura corporal, engrosando la película lagrimal. El inserto reduce el número de instilaciones de formulaciones oculares suplementarias pero en contra el engrosamiento de la película lagrimal puede causar visión borrosa<sup>72</sup>.

Un punto fundamental a considerar en la preparación de formulaciones oftálmicas es el empleo de conservantes. La función del conservante es evitar o limitar el crecimiento bacteriano con el fin de que no proliferen una infección potencial severa y/o alterar el preparado oftálmico, sobre todo en las formas de multidosis. Uno de los conservantes más utilizados es el cloruro de benzalconio (BAK), derivado de un amonio cuaternario. Pero el problema de los conservantes es que produce alteraciones en la superficie ocular especialmente en los pacientes que requieren tratamientos prolongados<sup>73 74 75</sup>. Por este motivo es más interesante el desarrollo de formulaciones en sistemas de monodosis sin conservantes, siendo obligatorio en tratamientos con instilaciones de 4-6 veces al día, cuando se usan lentes de contacto, por enfermedad de la superficie ocular, cuando el aclaramiento lagrimal está disminuido y cuando hay obstrucción del drenaje lagrimal.

---

<sup>72</sup> . Wander AH, Koffler BH. Extending the duration of tear film protection in dry eye syndrome: review and retrospective case series study of the hydroxypropyl cellulose ophthalmic insert. *Ocul Surf* 2009;7:154-62.

<sup>73</sup> Baudouin C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmologica*. 2008;86(7):716-26.

<sup>74</sup> Ammar D, Noecker R, Kahook M. Effects of Benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved and sofzia preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Advances in Therapy*. 2010;27(11):837-45.

<sup>75</sup> Baudouin C, Labbé A, Liang H, et al. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010;29(4):312-34.

### 1.3.2.2 SUERO AUTÓLOGO

El uso de suero autólogo para para tratar el daño de la superficie ocular queda relegado a los casos más graves que no han respondido a otros tratamientos, como lubricante intenso y en terapia antiinflamatoria. El suero autólogo nutre la superficie ocular mediante el aporte de componentes como la vitamina A, EGF, TGF-B y agentes antibacterianos (lisozima, lactoferrina, IgG)<sup>76</sup>.

El tratamiento con suero autólogo está especialmente indicado para los pacientes de ojo seco grave derivado del síndrome de Sjögren cuya secreción lagrimal basal y refleja están disminuidas. Las desventajas de utilizar este tratamiento son la incomodidad de la preparación(es necesario obtener sangre del paciente), la necesidad de refrigerar las gotas (1 mes a 4°C y 3 meses a 20°C), y el riesgo de infección si se produce contaminación de la solución<sup>77</sup>.

### 1.3.2.3 ANTIINFLAMATORIOS

La alteración de la película lagrimal en el síndrome de ojo seco conlleva un aumento de la osmolaridad de la lágrima que puede desencadenar un proceso inflamatorio de la superficie ocular. En estos casos los tratamientos de elección son el empleo de sustancias capaces de modular esta respuesta inflamatoria. Entre las alternativas terapéuticas se encuentran los corticosteroides, los inmunomoduladores, la terapia hormonal sustitutiva y los ácidos grasos omega-3 y omega-6.

---

<sup>76</sup> Liu L, Hartwig D, Harloff S, et al. An optimised protocol for the production of autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(11):1467-74.

<sup>77</sup> Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-5.

- Corticoesteroides

El mecanismo de acción de los corticoesteroides tiene lugar en diferentes fases del proceso inflamatorio. Son capaces de inhibir la actividad de la fosfolipasa A impidiendo la formación del ácido araquidónico y bloqueando las vías de la ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa evitando así la liberación de sustancias proinflamatorias (leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos). Además inhiben la liberación de citoquinas y quimiocinas y la síntesis de metaloproteasas. Igualmente son capaces de suprimir la expresión de las moléculas de adhesión e inciden la apoptosis de los linfocitos<sup>78</sup>.

Múltiples estudios han demostrado la efectividad de los corticoides a corto plazo en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el síndrome del ojo seco que cursan con inflamación<sup>79 80 81 82</sup>. Sin embargo las posibles complicaciones asociadas con su uso a largo plazo (cataratas, queratitis infecciosas, glaucoma y la interferencia en la cicatrización corneal) limitan su uso para un uso a corto plazo de 2 a 4 semanas y para enfermedades moderadas o graves que no se logran controlar con otras terapias<sup>83</sup>. El glaucoma asociado al uso de corticoesteroides se desarrolla por una disminución de la salida del humor acuoso causando un aumento de la presión intraocular (PIO) tras 3 o 4 semanas de tratamiento. Por ello para tratamientos prolongados se

---

<sup>78</sup> Robbins & Cotran. Patología estructural y funcional. 7ª ed. Vol.1. Madrid: S.A Elsevier España. 2007.

<sup>79</sup> Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjogren Syndrome. *Ophthalmology* 1999;106:811-6.

<sup>80</sup> Pflugfelder SC, Maskin SL, Anderson B, et al. A randomized doublemasked, placebo-controlled, multicenter comparison of loteprednol etabonate ophthalmic suspension, 0.5% and placebo for treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with delayed tear clearance. *Am J Ophthalmol* 2004;138:444-7.

<sup>81</sup> Yang C, Sun WY. A clinical study of the efficacy of topical corticosteroids on dry eye. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;7:675-8.

<sup>82</sup> Hong S, Kim T, Chung SH, et al. Recurrence after topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjogren's syndrome. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23:78-82.

<sup>83</sup> Diaz-Valle D, Benitez del Castillo JM. Antiinflamatorios en superficie ocular. Ed Madrid: Sociedad Española de Oftalmología. 2004.

recomienda utilizar fármacos esteroídicos con un efecto antiinflamatorio menos potente pero con efectos secundarios más leves, y si fuera preciso asociar al tratamiento un fármaco hipotensor<sup>84 85</sup>.

Existe una gran variedad de fármacos esteroideos disponibles en el mercado para el tratamiento tópico de la inflamación ocular como es el caso de la prednisolona, la dexametasona, la fluorometalona y la medroxiprogesterona. De todos ellos, el acetato de prednisolona al 1% es el tratamiento disponible más efectivo<sup>86</sup> y el acetato de medroxiprogesterona es el tratamiento con menor potencial inflamatorio pero también el de menor tasa de efectos secundarios, con lo que su uso es muy utilizado en una aplicación a largo plazo o crónica.

- Inmunomoduladores. La ciclosporina A

La ciclosporina A fue descubierta por Sandoz en 1970 producido por el hongo *Tolypocladium*. Al principio de su descubrimiento se utilizó como antifúngico y luego se empleó durante décadas como fármaco inmunomodulador. No fue hasta 2003 que se aprobó su uso para el tratamiento de la inflamación asociada al ojo seco crónico a través del nombre comercial Restasis® (Allergan, Inc Irvine, CA)<sup>87</sup>. Diversos estudios han demostrado que la eficacia terapéutica para el

---

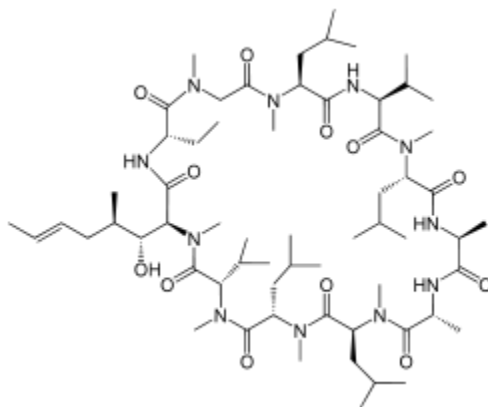
<sup>84</sup> Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *American Journal of Ophthalmology*. 2004;137(2):337-42.

<sup>85</sup> De paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye síndrome. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2008;71:89-95.

<sup>86</sup> Diaz-Valle D, Benitez del Castillo JM. Antiinflamatorios en superficie ocular. Ed Madrid: Sociedad Española de Oftalmología. 2004.

<sup>87</sup> [www.restasis.com](http://www.restasis.com)

tratamiento del SOS<sup>88 89 90</sup> se alcanza con una concentración del ciclosporina A de 0,05% (concentración del Restasis®) y que no se hallan niveles plasmáticos de la misma por lo que no es necesario monitorizar a los pacientes que siguen este tratamiento<sup>91 92 93</sup>.



**Figura 1.7.** Estructura química de la ciclosporina A

Aunque el mecanismo de acción se pensó inicialmente principalmente para inhibir la activación de los linfocitos T (impide de la formación de IL-2 que favorece la aparición de los linfocitos T), hay estudios que han confirmado que

---

<sup>88</sup> Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology* 2000;107:631-9.

<sup>89</sup> Brignole F, Pisella PJ, De Saint Jean M, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:90-5.

<sup>90</sup> Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1489-96.

<sup>91</sup> Barber LD, Pflugfelder SC, Tauber J, Foulks GN. Phase III Safety Evaluation of Cyclosporine 0,1% Ophthalmic Emulsion Administered Twice Daily to Dry Eye Disease Patients for Up to 3 Years. *Ophthalmology*. 2005;112(10):1790-4.

<sup>92</sup> Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1489-96.

<sup>93</sup> Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. *Ophthalmology* 2000;107(4):631-9.

tiene múltiples propiedades inhibitorias, incluyendo la capacidad de regular la apoptosis en las células<sup>94 95</sup>. Además, se ha observado también que es capaz de incrementar el número de células calciformes en pacientes de ojo seco<sup>96 97</sup>.

La CsA tiene un carácter lipófilo por lo que precisa vehículos lipófilos que favorezcan su absorción a través de la córnea. Con el fin de mejorar su biodisponibilidad, inicialmente se formuló con diferentes aceites (oliva, de castor, de cacahuete...) y en forma de emulsión<sup>98 99</sup>. Sin embargo debido a los efectos adversos de estas formas farmacéuticas (picor, escozor, ojos rojos, sensación de quemazón), en la actualidad se están desarrollando formulaciones que incluyen la CsA en liposomas, nanopartículas<sup>100</sup>, microemulsiones<sup>101</sup>, micelas<sup>102</sup>, sistemas de gelificación *in situ*<sup>103</sup> e hidrogeles<sup>104</sup>.

---

<sup>94</sup> Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, et al. Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem* 2003;10:1485-506.

<sup>95</sup> Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical Ophthalmic Cyclosporine: Pharmacology and Clinical Uses. *Survey of Ophthalmology*. 2009;54(3):321-38.

<sup>96</sup> Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical Cyclosporine Treatment of Patients With Dry Eye Syndrome: Effect on Conjunctival Lymphocytes. *Arch Ophthalmol* 2000;118(11):1489-96.

<sup>97</sup> Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Globet Cell Numbers and Epithelial Proliferation in the Conjunctiva of Patients With Dry Eye Syndrome Treated With Cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 2002;120(3):330-96.

<sup>98</sup> Benitez del Castillo JM, Del Aguila C, Duran S, et al. Influence of Topically Applied Cyclosporine A in Olive Oil on Corneal Epithelium Permeability. *Cornea* 1994;13(2):136-40.

<sup>99</sup> Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, et al. Cyclosporine A delivery to the eye: A pharmaceutical challenge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003;56(3):307-18.

<sup>100</sup> Yenice, I. et al. Hyaluronic acid coated poly-ε-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Exp. Eye Res*. 2008;87:162–167

<sup>101</sup> Stevenson, D. et al. Efficacy and safety of cyclosporin a ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. *Ophthalmology* 2000;107:967–974.

<sup>102</sup> Guo, C. et al. Nanomicelle formulation for topical delivery of cyclosporine A into the cornea: in vitro mechanism and in vivo permeation evaluation. *Sci. Rep*. 2015;5: 12968

<sup>103</sup> Chen, C.F. et al. Controlled release of cyclosporine a from biodegradable amphiphilic diblock copolymer sol-gel drug delivery system. *J. Med. Biol. Eng*. 2011;31:177–184.

<sup>104</sup> Peng CC, Kim J, Chauhan A. Extended delivery of hydrophilic drugs from silicone-hydrogel contact lenses containing vitamin E diffusion barriers. *Biomaterials*. 2010 May;31(14):4032-47.

- Terapia hormonal sustitutiva

Diversos estudios han demostrado que el mantenimiento de unos niveles idóneos de estrógenos y andrógenos resultan esenciales para el buen funcionamiento de las glándulas lagrimales y su organización estructural<sup>105 106</sup>. La aplicación tópica de andrógenos y estrógenos durante 3 o 4 meses ha mostrado una mejoría clínico en forma de aumento de la producción de lágrimas y del espesor de la capa de lípidos con el correspondiente alivio sintomático<sup>107 108</sup>. Se ha visto en estudios que en mujeres menopaúsicas siguiendo terapias de reemplazo hormonal con estrógenos esterificados combinado con metilttestosterona durante 4-24 meses se logra reducir los síntomas y producir una mejoría clínica de los pacientes con ojo seco<sup>109</sup>.

- Ácidos grasos esenciales

El omega 3 (w-3) asociado a un incremento de prostaglandinas antiinflamatorias y el omega 6 (w-6) asociado a un incremento de prostaglandinas proinflamatorias, son ácidos grasos biológicamente necesarios que deben de ser ingeridos en la dieta porque no son sintetizados por el cuerpo humano. La relación sistémica de estos grasos esenciales es de ¼ (w-3/w-6), sin

---

<sup>105</sup> Sullivan DA. Tearful relationships? Sex, hormones, the lacrimal gland, and aqueous-deficient dry eye. *Ocul Surf* 2004;2(2):92–123.

<sup>106</sup> Gagliano C, Caruso S, Napolitano G, et al. Low levels of 17-betaoestradiol, oestrone and testosterone correlate with severe evaporative dysfunctional tear syndrome in postmenopausal women: a case-control study. *Br J Ophthalmol* 2014;98(3):371–6.

<sup>107</sup> Worda C, Nepp J, Huber JC, Sator MO. Treatment of keratoconjunctivitis sicca with topical androgen. *Maturitas* 2001;37(3): 209–12.

<sup>108</sup> Vico Ruiz E, Benitez del Castillo JM. Tratamiento hormonal In: Superficie ocular. Madrid: Sociedad Española de Oftalmología, 2004.

<sup>109</sup> Scott G, Yiu SC, Wasilewski D, et al. Combined esterified estrogen and methyltestosterone treatment for dry eye syndrome in postmenopausal women. *Am J Ophthalmol* 2005;139(6):1109–10.

embargo en países desarrollados esta relación suele verse descompensada en proporción 1/25<sup>110</sup> promoviendo la aparición de ojo seco.

La investigación clínica sugiere que la ingesta de ácidos grasos omega 3 puede ayudar a disminuir las enfermedades del corazón y mejorar la artritis reumatoide, aunque la investigación está todavía en curso para determinar el nivel de eficacia de estas enfermedades. Siguiendo este razonamiento, la ingesta de ácidos grasos omega 3 ha sido recomendada para los pacientes con enfermedad del ojo seco, dado el papel de la inflamación en la enfermedad del ojo seco<sup>111 112</sup>.

La terapia con estos ácidos grasos esenciales puede enfocarse disminuyendo la ingesta de w-6 o aumentando la ingesta de w-3. Niveles bajos y adecuados de w-6 dan lugar a un incremento de la prostaglandina E1 en las glándulas de Meibomio con un carácter antiinflamatorio y como consecuencia se produce mejoría en los signos y síntomas derivados del SOS<sup>113</sup>. También se ha visto que suplementos dietéticos de w-3 son capaces de disminuir la inflamación inhibiendo la transformación de ácido linoleico (un ácido graso w-6) en ácido araquidónico, regula la apoptosis de las células de las glándulas lagrimales inhibiendo la síntesis del TNF-alpha, desempeñan un papel importante en la síntesis de los lípidos de las glándulas de Meibomio al mismo tiempo que aumenta la secreción lagrimal. De esta manera se mejora la película precorneal

---

<sup>110</sup> Roncone M, Bartlett H, Esperjesi F. Essential fatty acids for dry eye; A review. Contact Lens and Anterior Eye. 2010;33(2):49-54.

<sup>111</sup> Rosenberg ES, Asbell PA. Essential fatty acids in the treatment of dry eye. Ocul Surf 2010;8:18-28.

<sup>112</sup> Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, et al. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. Arch Ophthalmol 2008;126:219-25.

<sup>113</sup> Aragona P, Bucolo C, Spinella R, et al. Systemic omega-6 Essential Fatty Acid Treatment and PGE1 Tear Content in Sjögren Syndrome Patients. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2005;46(12):4474-9.

y se retarda la evaporación de la parte acuosa de la lágrima mejorando la superficie ocular<sup>114</sup>.

Los resultados obtenidos en modelos animales de ojo seco son prometedores<sup>115</sup>. El tratamiento tópico con w-3 ha disminuido los signos de ojo seco y la inflamación característica de esta patología<sup>116</sup>.

- Factor de crecimiento nervioso (FCN)

Se ha observado que el FCN aumenta la sensibilidad de la superficie ocular, inhibe reacciones inflamatorias y regula la producción de la película lagrimal<sup>117</sup>. Por ello el FCN parece tener un papel fundamental en la fisiopatología del ojo seco y puede ser una opción terapéutica prometedora<sup>118</sup>. Se ha demostrado que se produce un incremento de la concentración de FCN en la lágrima como mecanismo compensatorio en el SOS, particularmente bajo estrés hiperosmolar, lo que sugiere que el factor de crecimiento nervioso puede estar implicado en la reducción de la apoptosis de las células epiteliales de la córnea provocados por hiperosmolaridad<sup>119</sup>. Además, se ha demostrado que el FCN regula la diferenciación del epitelio conjuntival en células calciformes secretoras<sup>120</sup>. Por lo tanto la administración exógena de FCN puede ser

---

<sup>114</sup> Roncone M, Bartlett H, Esperjesi F. Essential fatty acids for dry eye; A review. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2010;33(2):49-54.

<sup>115</sup> Li N, He JC, Schwartz CE, et al. Resolvin E1 improves tear production and decreases inflammation in a dry eye mouse model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;26(5):431-9.

<sup>116</sup> Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, et al. Topical Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids for Treatment of Dry Eye. *Arch Ophthalmol* 2008;126(2):219-25.

<sup>117</sup> Lee HK, Lee KS, Kim HC, et al. Nerve growth factor concentration and implications in photorefractive keratectomy vs laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2005;139(6):965-71.

<sup>118</sup> Lambiase A, Mantelli F, Sacchetti M, et al. Clinical applications of NGF in ocular diseases. *Archives Italiennes De Biologie* 2011;149(2):283-92.

<sup>119</sup> Chang EJ, Im YS, Kay EP, et al. The role of nerve growth factor in hyperosmolar stress induced apoptosis. *J Cell Physiol* 2008;216(1):69-77.

<sup>120</sup> Lambiase A, Aloe L, Centofanti M, et al. Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(32):13469-74.

beneficiosa en la recuperación de daños en la superficie ocular debido a hiperosmolaridad crónica. Diversos estudios demuestran que la administración tópica de FCN aumenta la producción de lágrimas y la densidad de células calciformes en un modelo de ojo seco en perros<sup>121</sup>.

#### 1.3.2.4 FÁRMACOS AGONISTAS PARASIMPATICOMIMÉTICOS

Entre estos fármacos destacan dos sustancias activas para el tratamiento del SOS: pilocarpina y cevimelina, que se unen a receptores muscarínicos M3 causando contracción del musculo liso y estimulando algunas glándulas exocrinas como las salivares y lagrimales debido a que aumenta el número de células calciformes en la conjuntiva humana<sup>122</sup>. La pilocarpina se administra por vía oral en una dosis de 10-30 mg/día con mejoría de los síntomas en el tratamiento de ojo seco en la enfermedad de Sjögren<sup>123</sup>. La pilocarpina no es un fármaco selectivo y de este hecho procede gran parte de sus efectos secundarios, derivados de la administración sistémica, entre los que destacan: sudoración, aumento de la frecuencia urinaria, rubor, aumento de la salivación, cefalea y náuseas<sup>124</sup>. También se ha observado que la cevimelina por vía oral en una dosis de 30 mg/día tiene efectos beneficiosos sobre estos pacientes con el SOS derivado de la enfermedad de Sjögren pero con similares efectos

---

<sup>121</sup> Coassin M, Lambiase A, Costa N, et al. Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243(2):151–5.

<sup>122</sup> Aragona P, Di Pietro R, Spinella R, Mobrisci M. Conjunctival epithelium improvement after systemic pilocarpine in patients with Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 2006;90:166-70.

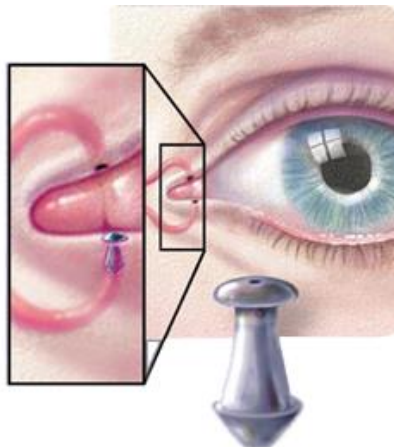
<sup>123</sup> Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, et al. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjogren syndrome. *Arch Intern Med* 1999;159:174-91.

<sup>124</sup> Tsifetaki N, Kitsos G, Pashides C, et al. Oral pilocarpine for the treatment of ocular symptoms in patients with Sjögren's syndrome: a randomized 12 week controlled study. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1204-7.

secundarios que la pilocarpina oral: sudoración, náuseas y escalofríos<sup>125</sup>. Por lo tanto la pilocarpina y la cevimelina oral han demostrado ser eficaz en la reducción de los síntomas de ojo seco, sin embargo, parece tener mayor efecto sobre los síntomas de boca seca debido a sus efectos secundarios.

### 1.3.2.5 TRATAMIENTOS QUIRÚRGICOS: OCLUSIÓN DE PUNTOS LAGRIMALES

La oclusión de los puntos lagrimales consiste en la obstrucción del sistema del drenaje del ojo a la altura de los puntos lagrimales o canaliculos ayudando a preservar las lágrimas naturales o artificiales sobre la superficie ocular. El tratamiento quirúrgico se puede realizar mediante la oclusión temporal, semi-permanente o permanente de los puntos lagrimales superior e inferior<sup>126</sup>.



**Figura 1.8.** Oclusión de puntos lagrimales

<sup>125</sup> Petrone D, Condemi J, Fife R, et al. A double-blind, randomized placebo-controlled study of cevimeline in Sjögren's syndrome patients with xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 2002;46:748-54.

<sup>126</sup> Balado Vazquez M, Antolin Garcia DD. Oclusión de los puntos lagrimales. In: *Superficie Ocular*. Madrid: Sociedad Española de Oftalmología, 2004.

Existen estudios que demuestran la efectividad de este tratamiento para enfermedades como el SOS derivado de la enfermedad de Sjögren y la queratoconjuntivitis<sup>127</sup>. Además el uso de la oclusión lagrimal combinada al uso de lágrimas artificiales de ciclosporina al 0,05% ha demostrado mejoría en comparación con cualquiera de los tratamientos por separado<sup>128</sup>.

#### 1.3.2.6 TERAPIA MUCOLÍTICA

A veces el SOS produce la permanencia en la córnea de filamentos o hebras de mucosidad provocando irritación y justificando el tratamiento con soluciones mucolíticas tópicas<sup>129 130</sup>. La N-acetilcisteína no está disponible comercialmente para administración tópica pero se puede preparar en farmacias como soluciones acuosas al 10-20%. La aplicación tópica 3 veces al día por lo general suele resolver el problema en 2 semanas a 4 semanas. A pesar de que las gotas pueden picar en la instilación y tienen un olor a azufre, suelen ser generalmente toleradas durante el periodo de tratamiento.

#### 1.3.2.7 LENTES DE CONTACTO TERAPÉUTICAS

Las lentes de contacto terapéuticas son recomendadas para el tratamiento del SOS junto con el suero autólogo y la oclusión lagrimal cuando los demás

---

<sup>127</sup> Qiu W, Liu Z, Ao M, et al. Punctal plugs versus artificial tears for treating primary Sjogren's syndrome with keratoconjunctivitis sicca: a comparative observation of their effects on visual function. *Rheumatol Int* 2013;33:2543-8.

<sup>128</sup> Roberts CW, Carniglia PE, Brazzo BG. Comparison of topical cyclosporine, punctal occlusion, and a combination for the treatment of dry eye. *Cornea* 2007;26(7):805-9.

<sup>129</sup> Foulks GN. Treatment of dry eye disease by the non-ophthalmologist. *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:987-1000.

<sup>130</sup> Preferred Practice Guidelines: Dry Eye. American Academy of Ophthalmology, 2012. <http://one.aao.org/summary-benchmark-detail/summarybenchmarks-complete-seteoctober-2012>. Accessed August 19, 2014.

tratamientos de elección han fracasado<sup>131</sup>. El objetivo de este tratamiento es promover la cicatrización corneal, proteger la superficie ocular del medio ambiente, reducir la desecación y aliviar el malestar.

En la actualidad existen varias lentes de contacto blandas compuestas por hidrogeles de silicona aprobadas para su uso en la enfermedad primaria y secundaria de Sjögren siendo útiles en la mejoría de los síntomas y la visión borrosa<sup>132</sup>.

#### 1.3.2.8 MANEJO DE LAS PESTAÑAS

Para pacientes con disfunción de las glándulas de Meibomio, es una práctica habitual la extracción manual de los lípidos utilizando dos bastoncillos de algodón prensados para comprimir el párpado<sup>133</sup>. Además se ha desarrollado numerosos dispositivos para mejorar o ayudar el funcionamiento de las glándulas de Meibomio como por ejemplo las toallitas de gel caliente que se aplican sobre los párpados o el sistema de compresión térmica controlada continua (sistema lipiflow™) que favorece la secreción de las glándulas de Meibomio<sup>134 135</sup>. Como último recurso puede ser necesario intervenciones quirúrgicas para proteger el ojo de exposiciones externas de la superficie ocular durante un breve periodo de tiempo. En casos que se necesite cerrar el párpado

---

<sup>131</sup> Management and therapy of dry eye disease: report of the Subcommittee on Management and Therapy of Dry Eye Disease. *Ocul Surf* 2007;5:163-78.

<sup>132</sup> Russo PA, Bouchard CS, Galasso JM. Extended-wear silicone hydrogel soft contact lenses in the management of moderate to severe dry eye signs and symptoms secondary to graft-versus-host disease. *Eye Contact Lens* 2007;33:144-7.

<sup>133</sup> Korb DR, Greiner JV. Increase in tear film lipid layer thickness following treatment of meibomian gland dysfunction. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:293-8.

<sup>134</sup> Lane SS, Dubiner HB, Epstein RJ, et al. A new system, the LipiFlow, for the treatment of meibomian gland dysfunction (MGD). *Cornea* 2012;31:396-404.

<sup>135</sup> Finis D, Hayajneh J, König C, et al. Evaluation of an automated thermodynamic treatment (LipiFlow) system for meibomian gland dysfunction: a prospective, randomized, observer-masked trial. *Ocul Surf* 2014;12:146-54.

parcial o totalmente, la toxina botulínica es el fármaco utilizado para este tipo de procedimiento<sup>136</sup>.

## **1.4 NUEVOS SISTEMAS FARMACÉUTICOS DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR**

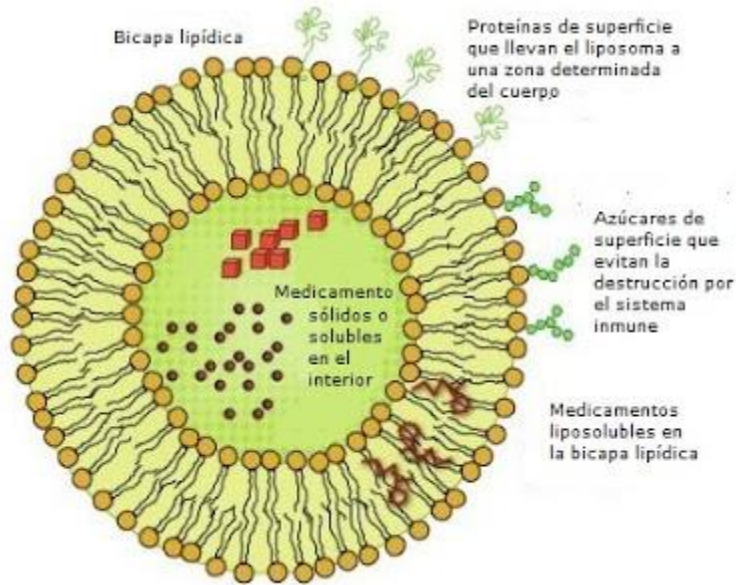
### **1.4.1 LIPOSOMAS**

Los liposomas son sistemas vesiculares constituidos por una o más bicapas lipídicas concéntricas, formadas principalmente por fosfolípidos y colesterol que forman el mismo número de compartimentos acuosos, cuyo diámetro oscila entre 80 nm y 1 µm. La capa lipídica compuesta principalmente por los fosfolípidos, son anfifílicos debido a que tiene una cabeza hidrófila y una cola lipófila. Las cadenas de ácidos grasos se encuentran en el interior de la capa y las cabezas hidrofílicas forman el límite exterior, formando vesículas cerradas. Son capaces de encapsular principios activos hidrófilos solubilizados en el compartimento acuoso y sustancias activas lipófilas incluidas en la bicapa lipídica, por ello, estos sistemas permiten administrar fármacos insolubles en agua en forma de colirios liposomas también mejoran la penetración del fármaco a través de la córnea ya que establecen un contacto íntimo con la superficie corneal y conjuntival<sup>137</sup>.

---

<sup>136</sup> Benvenuti D. Botox use in prevention of dry eyes. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:918

<sup>137</sup> Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv.* 2011;2011:863734.



**Figura 1.9.** Representación de la estructura de un liposoma y la integración de las sustancias activas

En función de la composición de los liposomas se puede tener carga negativa, positiva o neutra. El comportamiento de los liposomas como sistemas especiales de liberación controlada depende de la carga superficial en parte. Los liposomas con carga positiva son captados preferentemente por la córnea debido a la formación de interacciones electroestáticas entre las cargas positivas del tejido corneal y conjuntival, provocando un aumento del tiempo

de retención de las vesículas lipídicas sobre la superficie ocular y mejorando la biodisponibilidad de la sustancia encapsulada<sup>138 139 140 141 142</sup>.

Los componentes de los liposomas son los lípidos, agua, principio activo y electrolitos. Respecto a los lípidos utilizados los principales son los fosfolípidos y el colesterol. El colesterol se incluye para estabilizar la membrana liposomal y para reducir al mínimo la lixividación del principio activo solubilizado en el agua. Los electrolitos se utilizan para mejorar la formación de la bicapa lipídica y además proporciona isotonicidad<sup>143</sup>. Debido a la gran similitud de componentes de las membranas celulares, los liposomas se esperan que sean biocompatibles y biodegradables.

Los fosfolípidos pueden ser naturales como la fosfatidilcolina, denominándose liposomas convencionales o pueden estar constituidos por tensioactivos sintéticos como el Tween, denominándose entonces niosomas. A veces los liposomas pueden recubrirse por un polímero con el fin de evitar su captación por macrófagos, denominándose liposomas Stealh. Asimismo hay técnicas que van a permitir recubrir la superficie del liposoma con antígenos para permitir una mayor eficacia en la vectorización del fármaco.

---

<sup>138</sup> Scheaffer HE, Krohn DL. Liposomes in topical drug delivery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1982;22(2):220-7.

<sup>139</sup> Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery: corneal penetration and absorption. *Journal of Controlled Release*. 2000;63(1-2):135-40.

<sup>140</sup> Mainardes RM, Urban MCC, Cinto PO, et al. Colloidal carriers for ophthalmologic drug delivery. *Current Drug Targets*. 2005;6(3):363-71.

<sup>141</sup> Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *Journal of Drug Delivery*. *J Drug Deliv*. 2011;2011:863734.

<sup>142</sup> Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery reviews*. 1995;16:75-93.

<sup>143</sup> Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery reviews*. 1995;16:75-93.

En función de su tamaño los liposomas pueden ser:

- a) Liposomas unilamelares pequeños (SUV): tamaño entre 20 y 200 nm.
- b) Liposomas unilamelares grandes (LUV): tamaño mayor de 200 nm.
- c) Liposomas multilamelares (MLV): tamaño mayor de 500 nm (entre 5-25 bicapas lipídicas concéntricas).

En función del método de elaboración se clasifican como:

- Método de Bangham

Este procedimiento se basa en la solubilización de los fosfolípidos en un solvente orgánico que posteriormente es eliminado. Cuando desaparece el solvente orgánico, los fosfolípidos forman una fina película sólida que es dispersada con una solución acuosa y como consecuencia a un hinchamiento e hidratación de los fosfolípidos dando lugar espontáneamente a los liposomas. Con este método se obtienen liposomas multilamelares (MLV). Se pueden obtener liposomas unilamelares pequeños (SUV) a través de la sonicación o filtración secuencial a través de filtros con tamaño de poro decreciente de los liposomas obtenidos por el método de Bangham.

- Método de evaporación de fase inversa

En este método los fosfolípidos son solubilizados en una fase orgánica y a continuación se le añade la fase acuosa dando lugar a una emulsión. La parte orgánica se elimina bajo presión reducida, en presencia de nitrógeno para crear una atmósfera inerte, hasta obtener un gel semisólido en el que se encuentran las vesículas lipídicas. Con este método se obtienen liposomas unilamelares grandes (LUV).

- Método de congelación descongelación

Consiste en someter a los liposomas mediante la técnica de Bangham a ciclos sucesivos de congelación-descongelación alternándolos con procesos de extrusión. Proporciona liposomas unilamelares grandes (LUV).

Los componentes de los liposomas son lípidos, agua, principio activo y electrolitos. Respecto a los lípidos utilizados los principales son los fosfolípidos y el colesterol. El colesterol se incluye para estabilizar la membrana liposomal debido a que se interpone entre las bicapas orientando el grupo hidroxilo hacia la parte acuosa y la cadena alifática en el centro de las bicapas lipídicas. De esta manera, se consigue aumentar la distancia entre los grupos de colina de los fosfolípidos evitando las interacciones entre ellas, tanto electroestáticas como por enlaces de hidrogeno, aumentando así la fluidez y la estabilidad de las bicapas lipídicas frente a cambios de temperatura y reduciendo al mínimo la lixividación del principio activo solubilizado en el agua. Los electrolitos se utilizan para mejorar la formación de la bicapa lipídica y además aumentan la tonicidad<sup>144 145 146</sup>.

Debido a su gran similitud con los componentes de las membranas celulares, los liposomas se esperan que sean biocompatibles, biodegradables y no tóxicos. Además deben de ser capaces de interactuar con la superficie corneal y conjuntival. Esto les convierte en sistemas idóneos para la administración de fármacos de baja absorción. La versatilidad y simplicidad en el método de

---

<sup>144</sup> Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;Sep:75(9):4194-8.

<sup>145</sup> Szoka F, Papahadjopoulos D. comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (Liposomes). Annual Review of Biophysics and Bioengineering. 1980;9(1):467-508.

<sup>146</sup> Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. Advanced Drug Delivery reviews. 1995;16:75-93.

preparación confieren a los liposomas unas propiedades únicas para ser utilizadas en oftalmología<sup>147</sup>.

El éxito de los liposomas como sistemas de liberación controlada de fármacos por vía tópica depende de la eficacia de encapsulación, la carga superficial, el tamaño de las vesículas lipídicas, la distribución del fármaco en los liposomas, la estabilidad de los liposomas en los tejidos oculares y el tiempo de permanencia sobre la superficie ocular<sup>148</sup>.

Los liposomas de gran tamaño son más resistentes al drenaje nasolacrimal y se quedan retenidos en el borde inferior del párpado anterior, aumentando el tiempo de contacto con la superficie del ojo. No obstante un tamaño elevado unido a la opacidad de estos sistemas puede causar visión borrosa. Una estrategia muy eficaz para aumentar el tiempo de permanencia es la adición de biopolímeros adhesivos como el ácido hialurónico, derivados de la celulosa, quitosano o carbómeros<sup>149 150 151 152</sup>.

---

<sup>147</sup> Le Boursais C, Acar L, Zia H, et al. Ophthalmic drug delivery systems – recent advances. *Progress in retinal and Eye Research* 1998;17(1):33-58.

<sup>148</sup> Monem AS, Ali FM, Ismail MW. Prolonged effect of liposomes encapsulating pilocarpine HCL in normal and glaucomatous rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;198(1):29-38.

<sup>149</sup> Greaves JL, Wilson CG. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993;11(3):349-83.

<sup>150</sup> Diebold Y, Jarrin M, Sáez V, et al. Ocular drug delivery by liposomes chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials* 2007;28(8):1553-64.

<sup>151</sup> Lajavardi L, Camelo S, Agnely F, et al. New formulations of vasoactive intestinal peptide using liposomes in hyaluronic acid gel for uveitis. *Journal of Control Release*. 2009;139(1):22-301.

<sup>152</sup> Mehanna MM, Elmaradny HA, Samaha MW. Ciprofloxacin liposomes as vesicular reservoirs for ocular delivery: formulation, optimization and in vitro characterization. *Drug Development & Industrial Pharmacy*. 2009;35(5):583-93.

### 1.4.2 NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas son sistemas coloidales sólidos cuyo tamaño varía entre 1-1000 nm<sup>153</sup>. Dependiendo del procedimiento de elaboración se clasifican en nanocápsulas y nanoesferas. Las nanoesferas están constituidas por una red polimérica con una estructura tipo matriz en la que el fármaco puede ser adsorbido ya sea en la superficie de la partícula o encapsulado dentro de la partícula. Las nanocápsulas son pequeños depósitos que constan de un núcleo líquido interior en donde la sustancia activa se disuelve rodeado por una membrana polimérica. El empleo de estos sistemas constituye una estrategia innovadora para llegar a los órganos diana y aumentar la biodisponibilidad de los fármacos<sup>154</sup>.

En oftalmología las nanopartículas se emplean para mejorar la eficacia en el tratamiento debido a que quedan retenidas en el *cul de sac* y son capaces de liberar la sustancia activa de forma progresiva. Además el tamaño de las nanopartículas hace que sean adecuadas para ser internalizadas por las células<sup>155 156</sup>. Los materiales empleados en la elaboración de las nanopartículas deben de ser biodegradables y transparentes<sup>157</sup>

---

<sup>153</sup> Kothuri M.K., Pinnamaneni S., Das N.G., Das S.K. - Microparticles and nanoparticles in ocular drug delivery - In: Ophthalmic Drug Delivery Systems, M. Dekker, New York, 2003, p. 437-466.

<sup>154</sup> De Campos AM, Sanchez A, Gref R, et al. The effect of a PEG versus chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2003;20(1):73-81.

<sup>155</sup> Bourges J.L. et al. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Aug;44(8):3562-9.

<sup>156</sup> Aukunuru JV, Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Nanoparticle formulation enhances the delivery and activity of a vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human retinal pigment epithelial cells. J. Pharm. Pharmacol 2003;55(9):1199-1206.

<sup>157</sup> Ding S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. Pharmaceutical Science & Technology Today. 1998;1(8):328-35.

### 1.4.3 MICROPARTÍCULAS

Las micropartículas son portadores de fármacos sólidos con un diámetro de 1 a 1000  $\mu\text{m}$  formadas a partir de polímeros, generalmente biodegradables, capaz de proporcionar liberación sostenida y controlada de sustancias activas. Se dividen en microcápsulas y microesferas. Las microcápsulas son sistemas reservorio constituidas por un núcleo que está rodeado por una capa de polímero. Las microesferas son sistemas matriciales donde el fármaco se dispersa a través de la red polimérica<sup>158</sup>. Uno de los polímeros más utilizados para la microencapsulación de sustancias activas es el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) ya que es biodegradable, no es tóxico y es capaz de controlar la liberación. Un aspecto a tener en cuenta es el tamaño para aplicación tópica ocular, ya que partículas con un diámetro por encima de 25  $\mu\text{m}$  pueden producir daño e irritación en la córnea<sup>159 160</sup>.

La principal ventaja de las micropartículas sobre los sistemas convencionales de administración de fármacos oculares es que son capaces de aumentar la eficacia y también reducir la toxicidad del fármaco. Se emplean con mucha frecuencia a nivel intraocular para enfermedades del segmento posterior del ojo donde se acumulan en la cavidad vítrea, comportándose como un implante *in situ*, y van liberando la sustancia activa progresivamente. Pueden ser

---

<sup>158</sup> Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Wiedemann P, Honda Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* 2004;23(3):253-281.

<sup>159</sup> Zimmer A, Kreuter J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 1995;16:61-73.

<sup>160</sup> Gavini E, Chetoni P, Cossu M, et al. PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: *in vitro/in vivo* studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;57(2):207-12.

inyectadas en forma de suspensión utilizando agujas convencionales (27-34 G) sin necesidad de cirugía<sup>161</sup>.

#### 1.4.4 LENTES DE CONTACTO BLANDAS E INSERTOS OFTÁLMICOS

Los insertos oftálmicos se clasifican como solubles o insolubles. Los insertos solubles son dispositivos poliméricos que se someten a disolución gradual mientras se va liberando el fármaco. El proceso de disolución o erosión del inserto se realiza o por hinchamiento del polímero o por hidrólisis enzimática<sup>162</sup>  
<sup>163</sup>.

#### 1.4.5 DENDRÍMEROS

Los dendrímeros son nanotransportadores definidos como sistemas multifuncionales híbridos con tamaños que varían típicamente entre 1-200 nm que puede suministrar el agente bioactivo en el sitio de destino con una mejor actividad terapéutica respecto a la sustancia activa libre<sup>164</sup>.

A pesar de su gran tamaño molecular (5000-500000 g/mol), son estructuras bien definidas con una baja polidispersión. El dendrímero consta de 3 estructuras básicas: 1. Núcleo central multifuncional, 2. Ramificaciones y 3.

---

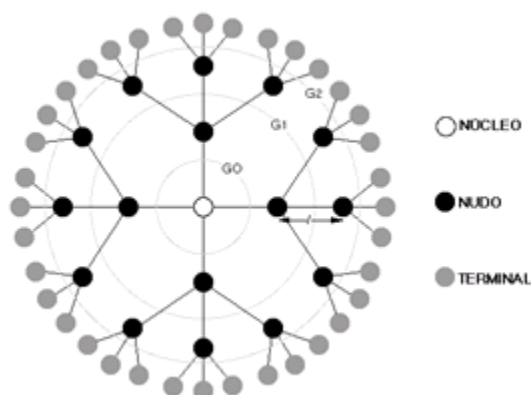
<sup>161</sup> Cardillo JA, Souza-Filho AA, Oliveira AG. Intravitreal bioerudivel sustained-release triamcinolone microspheres system (RETAAC). Preliminary report of its potential usefulness for the treatment of diabetic macular edema. Arch. Soc. Esp. Oftalmol. 2006;81(12):675-677,679-681.

<sup>162</sup> Heller J. Controlled drug release from monolithic systems. In: M.F. Saettone. G. Bucci and P. Speiser (Eds.). Ophthalmic Drug Delivery: Biopharmaceutical, Technological and Clinical Aspects, Fidia Research Sereis, Liviana Press, Padua, 1987;11:179-189.

<sup>163</sup> Heller J. Controlled release of biologically active compounds from bioerudible polymers, Biomaterials, 1980;1:51-57.

<sup>164</sup> Khandare J, Calderon M, Dagia NM, Haag R. Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges. Chem Soc Rev. 2012 Apr 7;41(7):2824-48.

Grupos de superficie<sup>165 166</sup>. Cada unidad ramificada se denomina *generaciones* y representan la unidad monomérica<sup>167</sup>. El número de generaciones está representado por un dígito y la letra en mayúscula “G” (ejem: 4 generaciones = 4G). La parte terminal del dendrímoro (grupos funcionales) puede ser modificado químicamente para funcionalizar el dendrímoro con ligandos capaces de orientarlo a tejidos deseados<sup>168 169 170</sup>. Aunque el uso de dendrímoros en como medio de administración de sustancias activas aun esta menos desarrollado que otras formas farmacéuticas, presentan un alto potencial de investigación.



**Figura 1.10.** *Arquitectura molecular de un dendrímoro: está conformado por un núcleo, región de amplificación y una superficie funcional de intercambio.*

<sup>165</sup> Boas U, Heegaard PM. Dendrimers in drug research. Chem. Soc. Rev 2004;33(1):43-63.

<sup>166</sup> Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications, Reflections on the field. Adv. Drug Deliv. Rev. 2005;57(15):2106-2129.

<sup>167</sup> Aulenta F, Hayes W, Rannard S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery device. - Eur. Pol. J. 2003;39:1741-1771.

<sup>168</sup> Boas U, Heegaard PM. Dendrimers in drug research. Chem. Soc. Rev., 2004;33(1):43-63.

<sup>169</sup> Thomas TP et al. Targeting and inhibition of cell growth by an engineered dendritic nanodevice. - J. Med. Chem. 2005;48(11):3729-3735.

<sup>170</sup> Patri AK, Majoros IJ, Baker JR. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. - Curr. Opin. Chem. Biol 2002;6(4):466-471.

#### 1.4.6 HIDROGELES Y SISTEMAS DE GELIFICACIÓN *IN SITU*

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales que son capaces de retener una gran cantidad de agua en su estado de hinchamiento<sup>171</sup>. Se clasifican como naturales, sintéticos e híbridos dependiendo de la fuente de los polímeros constituyentes. Los hidrogeles se pueden reticular químicamente por enlaces covalente, no covalentes o combinación de ambos<sup>172</sup>. Debido a su alto contenido en agua los hidrogeles se parecen a los tejidos biológicos y como consecuencia les confiere una excelente biocompatibilidad. Además su naturaleza blanda y elástica minimiza las reacciones inflamatorias de las células circundantes<sup>173</sup>.

#### 1.4.7 MICROEMULSIONES Y NIOSOMAS

Una microemulsión se define como una solución isotrópica y termodinámicamente estable de agua, aceite y un tensioactivo anfifílico o surfactante<sup>174</sup>. Su estabilidad se debe a la baja tensión interfacial entre la interfase agua-aceite y la entropía positiva de la mezcla de las gotas de la emulsión. Las microemulsiones son transparentes debido a los pequeños tamaños de partícula que varían entre 10 y 150 nm<sup>175</sup>. Dentro de las ventajas de esta forma farmacéutica están:

---

<sup>171</sup> Peppas NA, Khare AR. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1993;11:1–35.

<sup>172</sup> Roorda WE, Bodde HE, De Boer AG, Junginger HE. Synthetic hydrogels as drug delivery systems. *Pharm Weekbl Sci.* 1986 Jun 20;8(3):165-89.

<sup>173</sup> Kroschwitz JI, Mark HF. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, WileyInterscience, Hoboken, New Jersey, USA, 2003.

<sup>174</sup> Danielsson I, Lindman B. The definition of microemulsion. *Colloids Surf.* 1981;3:391-392.

<sup>175</sup> Kawakami K, Yoshikawa T, Moroto Y, Kanaoka E, Takahashi K, Nishihara Y, Masuda K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. I. Prescription Design. *J. Control. Release* 2002;81:65-74.

- las gotas de aceite permiten mantener el fármaco hidrófobo actuando como reservorio. La sustancia activa se libera a la película lagrimal para ser absorbido por el epitelio ocular<sup>176</sup>.
- El uso de tensioactivos catiónicos cargan las gotas de la microemulsión positivamente facilitando la unión con el epitelio corneal cargado negativamente, lo que aumenta el tiempo de residencia<sup>177</sup>.
- Los tensioactivos utilizados en las formulaciones permiten unirse a las células epiteliales de la córnea aumentando la permeabilidad. Sin embargo este mecanismo, unido a una alta concentración del tensioactivo, puede ser perjudicial causando toxicidad ocular<sup>178 179</sup>.
- Las microemulsiones pueden aumentar la viscosidad del fluido lagrimal lo que conduce a un aumento del tiempo de residencia la formulación en las lágrimas<sup>180</sup>.

## **1.5 BIBLIOGRAFÍA**

Abelson MB, Ousler GW III, Nally LA, et al. Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:121-5.

---

<sup>176</sup> Jousseaume AM, Rohrschneider K, Reichling J, Kirchhof J., Kruse FE. Treatment of corneal neovascularization with dietary isoflavonoids and flavonoids. *Exp. Eye Res* 2000;71:483-487.

<sup>177</sup> Klang S, Abdulrazik M, Benita S. Influence of emulsion droplet surface charge on indomethacin ocular tissue distribution. - *Pharm. Dev. Technol* 2000;5:521-532.

<sup>178</sup> Attwood D, Mallon C, Ktistis G, Taylor CJ. A study on factors influencing the droplet size in nonionic oil-in-water microemulsions. *Int. J. Pharm.* 1992;88:417-422.

<sup>179</sup> Liang H, Brignole-Baudouin F, Rabinovich-Guilatt L, Mao Z, Riancho L, Faure MO, Warnet JM, Lambert G, Baudouin C. Reduction of quaternary ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions: an in vivo study in rabbits. *Mol. Vis.* 2008;14:204-216.

<sup>180</sup> Le Boulvais C, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverge R. Ophthalmic drug delivery systems, Recent advances. *Prog. Retin. Eye Res.* 1998;17:33-58.

Agar A, Li S, Agarwal N, Coroneo, Hill. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. *Brain Res.* 2006;1086:191-200.

Aggarwal D, Pal D, Mitra AK, Kaur IP. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. *International Journal of Pharmaceutics.* 2007;338:21–26.

Ammar D, Noecker R, Kahook M. Effects of Benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved and sofzia preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Advences in Therapy.* 2010;27(11):837-45.

Aragona P, Bucolo C, Spinella R, et al. Systemic omega-6 Essential Fatty Acid Treatment and PGE1 Tear Content in Sjögren Syndrome Patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2005;46(12):4474-9.

Aragona P, Di Pietro R, Spinella R, Mobrìci M. Conjunctival epithelium improvement after systemic pilocarpine in patients with Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 2006;90:166-70.

Attwood D, Mallon C, Ktistis G, Taylor CJ. A study on factors influencing the droplet size in nonionic oil-in-water microemulsions. *Int. J. Pharm.* 1992;88:417-422.

Akunuru JV, Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Nanoparticle formulation enhances the delivery and activity of a vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human retinal pigment epithelial cells. *J. Pharm. Pharmacol* 2003;55(9):1199-1206.

Aulenta F, Hayes W, Rannard S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery device. - *Eur. Pol. J.* 2003;39:1741-1771.

Balado Vazquez M, Antolin Garcia DD. Oclusion de los puntos lagrimales. In: *Superficie Ocular.* Madrid: Sociedad Española de Oftalmología, 2004.

Barabino S, Labetoulle M, Rolando M, Messmer EM. Understanding Symptoms and Quality of Life in Patients With Dry Eye Syndrome. *The ocular Surface. Ocul Surf.* 2016 Jul;14(3):365-76.

Barber LD, Pflugfelder SC, Tauber J, Foulks GN. Phase III Safety Evaluation of Cyclosporine 0,1% Ophthalmic Emulsion Administered Twice Daily to Dry Eye Disease Patients for Up to 3 Years. *Ophthalmology.* 2005;112(10):1790-4.

Baudouin C. Conditions bordering on allergy. *J Fr Ophtalmol* 2007 Mar;30:306-13.

Baudouin C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmologica.* 2008;86(7):716-26.

Baudouin C, Labbé A, Liang H, et al. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2010;29(4):312-34.

Benvenuti D. Botox use in prevention of dry eyes. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:918.

Benitez del Castillo JM, Del Aguila C, Duran S, et al. Influence of Topically Applied Cyclosporine A in Olive Oil on Corneal Epithelium Permeability. *Cornea* 1994;13:136-40.

Benitez del Castillo JM, Vico E. Tratamiento del ojo seco. *Gaceta óptica* 2004;385:1-32.

Boas U, Heegaard PM. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev* 2004;33(1):43-63.

Bourges J.L. et al. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Aug;44(8):3562-9.

Broadway DC, Nicolela MT, Drance SM. Optic Disk Appearances in Primary Open-Angle Glaucoma. *Survey of ophthalmology.* 1999;43:223-243.

Brignole F, Pisella PJ, De Saint Jean M, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:90-5.

Bron AJ, Abelson MB, Ousler G, Pearce E, Tomlinson A, Yokoi N, Smith JA, et al. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007), *Ocul. Surf.* 2007;5(2):108–152.

Buchholz P, Steeds CS, Stern LS, Wiederkehr DP, Doyle JJ, Katz LM, Figueiredo FC. Utility assessment to measure the impact of dry eye disease. *Ocul Surf* 2006;4(3):155-61.

Calonge M, The treatment of Dry Eye. *Survey of Ophthalmology*. 2001;45(Supplement 2):S227-S39.

Cardillo JA, Souza-Filho AA, Oliveira AG. Intravitreal bioerudivel sustained-release triamcinolone microspheres system (RETAAC). Preliminary report of its potential usefulness for the treatment of diabetic macular edema. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2006;81(12):675-677,679-681.

Chang EJ, Im YS, Kay EP, et al. The role of nerve growth factor in hyperosmolar stress induced apoptosis. *J Cell Physiol* 2008;216(1):69–77.

Chen, C.F. et al. Controlled release of cyclosporine a from biodegradable amphiphilic diblock copolymer sol–gel drug delivery system. *J. Med. Biol. Eng.* 2011;31:177–184.

Coassin M, Lambiase A, Costa N, et al. Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243(2):151–5.

Coleman AL, Miglior S. Risk Factors for Glaucoma Onset and Progression. *Survey of Ophthalmology*. November 2008; 53(6):3–10.

Danielsson I, Lindman B. The definition of microemulsion. *Colloids Surf.* 1981;3:391-392.

De Campos AM, Sanchez A, Gref R, et al. The effect of a PEG versus chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003;20(1):73-81.

de Moraes CG, Liebmann JM, Medeiros FA, Weinreb RN. Management of advanced glaucoma: characterization and monitoring. *Surv Ophthalmol.* 2016;61(5):597-615.

De paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye síndrome. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.* 2008;71:89-95.

Diaz-Valle D, Benitez del Castillo JM. *Antiinflamatorios en superficie ocular.* Ed Madrid: Sociedad Española de Oftalmología. 2004.

Diebold Y, Jarrin M, Sáez V, et al. Ocular drug delivery by liposomes chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials* 2007;28(8):1553-64.

Ding S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today.* 1998;1(8):328-35.

Donnefeld E, Pflugfelder SC. Topical Ophthalmic Cyclosporine: Pharmacology and Clinical Uses. *Survey of Ophthalmology.* 2009;54(3):321-38.

Farmacopea española. Segunda edición. 2003. Madrid. Ministerio de sanidad y consumo. 632-633.

Ferreiro Lopez S, Ruiz navarro S. *Glaucoma. Servicio de oftalmología en atención primaria.* 2ª edición. Jaen. 2003. 199-224.

Finis D, Hayajneh J, König C, et al. Evaluation of an automated thermodynamic treatment (LipiFlow) system for meibomian gland dysfunction: a prospective, randomized, observer-masked trial. *Ocul Surf* 2014;12:146-54.

Foulks GN. Treatment of dry eye disease by the non-ophthalmologist. *Rheum Dis Clin N Am* 2008;34:987-1000.

Foulks GN, Forstot SL, Donshik PC, Forstot JZ, Goldstein MH, Lemp MA, Nelson JD, Nichols KK, Pflugfelder SC, Tanzer JM, Asbell P, Hammitt K, Jacobs DS. Clinical Guidelines for Management of Dry Eye Associated with Sjögren Disease. *Ocul Surf*. 2015 Apr;13(2):118-32.

Gagliano C, Caruso S, Napolitano G, et al. Low levels of 17-betaoestradiol, oestrone and testosterone correlate with severe evaporative dysfunctional tear syndrome in postmenopausal women: a case-control study. *Br J Ophthalmol* 2014;98(3):371–6.

Gao L, Chen X, Tang Y, Zhao J, Li Q, Fan X, Xu H, Yin ZQ. Neuroprotective effect of memantine on the retinal ganglion cells of APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DE9</sup> mice and its immunomodulatory mechanisms. *Exp Eye Res*. 2015 Jun;135:47-58.

García Sánchez J, García Feijoo J. Tratamiento médico del glaucoma. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2000;75:11-20.

Gavini E, Chetoni P, Cossu M, et al. PLGA microspheres for de ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: in vitro/in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004;57(2):207-12.

Glasson MJ, Stapleton F, Keay L, Willcox MDP. The effect of short term contact lens wear on the tear film and ocular surface characteristics of tolerant and intolerant wearers. *Contact Lens and Anterior Eye* 2006;29:41-47.

Gomes BA, Turiel P, Cavalcanti RS, Moraes HV Jr, Santhiago MR. The accuracy of Goldmann applanation tonometry over silicone hydrogel contact lenses in patients with glaucoma. *Cont Lens Anterior Eye*. 2014 Aug;37(4):297-9.

Gonzalez-Martinez A. Tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto. *JANO* 22-28. ABRIL 2005;66(1562);1380-1383.

Grayzel AI. What is Sjogren's? Chapter 2. In: Wallace DJ, ed. *The Sjogren's Book*, Fourth Ed. New York, Oxford University Press, 2012. pp. 7-10.

Greaves JL, Wilson CG. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993;11(3):349-83.

Guo, C. et al. Nanomicelle formulation for topical delivery of cyclosporine A into the cornea: in vitro mechanism and in vivo permeation evaluation. *Sci. Rep.* 2015;5: 12968.

Heller J. Controlled drug release from monolithic systems. In: M.F. Saettone. G. Bucci and P. Speiser (Eds.). *Ophthalmic Drug Delivery: Biopharmaceutical, Technological and Clinical Aspects*, Fidia Research Sereis, Liviana Press, Padua,1987;11:179-189.

Heller J. Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers, *Biomaterials*, 1980;1:51-57.

Hong S, Kim T, Chung SH, et al. Recurrence after topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjogren's syndrome. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23:78-82.

Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, et al. Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:114-22.

Jackson WB. Management of dysfunctional tear syndrome: a Canadian consensus. *Can J Ophthalmol* 2009;44:385-94.

Joussen AM, Rohrschneider K, Reichling J, Kirchhof ., Kruse FE. Treatment of corneal neovascularization with dietary isoflavonoids and flavonoids. *Exp. Eye Res* 2000;71:483-487.

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucomatherapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;248:1-14.

Kroschwitz JI, Mark HF. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, WileyInterscience, Hoboken, New Jersey, USA, 2003.

Kawakami K, Yoshikawa T, Moroto Y, Kanaoka E, Takahashi K, Nishihara Y, Masuda K. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. I. Prescription Design. *J. Control. Release* 2002;81:65-74.

Khandare J, Calderon M, Dagia NM, Haag R. Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges. *Chem Soc Rev.* 2012 Apr 7;41(7):2824-48.

Kim YY, Jung HR. Clarifying the Nomenclature for Primary Angle-Closure. *Survey of ophthalmology.* 1997;42(2):125-136.

Kingman S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. *Bull World Health Organ.* 2004;82:887-888.

Klang S, Abdulrazik M, Benita S. Influence of emulsion droplet surface charge on indomethacin ocular tissue distribution. - *Pharm. Dev. Technol* 2000;5:521-532.

Korb DR, Greiner JV. Increase in tear film lipid layer thickness following treatment of meibomian gland dysfunction. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:293-8.

Korb DR, Greiner JV, Herman JP, et al. Lid-wiper epitheliopathy and dry-eye symptoms in contact lens wearers. *CLAO J* 2002;28(4):211-6.

Kothuri M.K., Pinnamaneni S., Das N.G., Das S.K. - Microparticles and nanoparticles in ocular drug delivery - In: *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, M. Dekker, New York, 2003, p. 437-466.

Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1489-96.

Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Globet Cell Numbers and Epithelial Proliferation in the Conjunctiva of Patients With Dry Eye Syndrome Treated With Cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 2002;120(3):330-96.

Lajavardi L, Camelo S, Agnely F, et al. New formulations of vasoactive intestinal peptide using liposomes in hyaluronic acid gel for uveitis. *Journal of Control Release*. 2009;139(1):22-301.

Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, et al. Cyclosporine A delivery to the eye: A pharmaceutical challenge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003;56(3):307-18.

Lambiase A, Aloe L, Centofanti M, et al. Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: implications for glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(32):13469–74.

Lambiase A, Mantelli F, Sacchetti M, et al. Clinical applications of NGF in ocular diseases. *Archives Italiennes De Biologie* 2011;149(2):283–92.

Lane SS, Dubiner HB, Epstein RJ, et al. A new system, the LipiFlow, for the treatment of meibomian gland dysfunction (MGD). *Cornea* 2012;31:396-404.

Lawrence MS, Redmond DE Jr, Elsworth JD, et al. The D1 receptor antagonist, SCH23390, induces signs of Parkinsonism in African green monkeys. *Life Sci* 1991;49:PL229-34.

Le Boursais C, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverage R. Ophthalmic drug delivery systems, Recent advances. *Prog. Retin. Eye Res.* 1998;17:33-58.

Lee HK, Lee KS, Kim HC, et al. Nerve growth factor concentration and implications in photorefractive keratectomy vs laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2005;139(6):965–71.

Lemp MA. Surfacing abnormalities in the preocular tear film and dry eye syndromes. *Int Ophthalmol Clin* 1973;13:191-9.

Lemp MA, Baudouin C, Baum J, Dogru M, Foulks GN, Kinoshita S, Laibson P, et al. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf.* 2007 Apr;5(2):75-92.

Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery: corneal penetration and absorption. *Journal of Controlled Release.* 2000;63(1-2):135-40.

Lemp MA, Foulks GN. The Definition & Classification of Dry Eye Disease. Guidelines from the 2007 International Dry Eye Workshop. April 2008.

Liang H, Brignole-Baudouin F, Rabinovich-Guilatt L, Mao Z, Riancho L, Faure MO, Warnet JM, Lambert G, Baudouin C. Reduction of quaternary ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions: an in vivo study in rabbits. *Mol. Vis.* 2008;14:204-216.

Li N, He JC, Schwartz CE, et al. Resolvin E1 improves tear production and decreases inflammation in a dry eye mouse model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;26(5):431–9.

Li Y, Schlamp CL, Poulsen GL, Jackson MW, Griep AE, Nickells RW. p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by Nmethyl-D-aspartate. *Mol Vis.* 2002;8:341-350.

Liu L, Hartwig D, Harloff S, et al. An optimised protocol for the production of autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(11):1467-74.

Long K. Glaucoma an insight into disease and therapy. Canadian pharmacist association. 2006.

Luo L, Li D-Q, Doshi A, et al. Experimental Dry Eye Stimulates Production of Inflammatory Cytokines and MMP-9 and activates MAPK Signaling Pathways on the Ocular Surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2004;45(12):4293-301.

Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjogren Syndrome. *Ophthalmology* 1999;106:811-6.

Management and therapy of dry eye disease: report of the Subcommittee on Management and Therapy of Dry Eye Disease. *Ocul Surf* 2007;5:163-78.

McGinnigle S, Naroo SA, Eperjesi F. Evaluation of dry eye. *Surv. Ophthalmol.* 2012;57(4):293–316.

Mehanna MM, Elmaradny HA, Samaha MW. Ciprofloxacin liposomes as vesicular reservoirs for ocular delivery: formulation, optimization and in vitro characterization. *Drug Development & Industrial Pharmacy.* 2009;35(5):583-93.

Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery reviews.* 1995;16:75-93.

Migueli-Rodriguez M, Coba-Gonzalez MJ, Ortiz-Gonzalez E, Perez-Tamayo B. Actualidad en el tratamiento médico del glaucoma. *Rev Cubana Oftalmol.* 2004;17(1):0-0.

Mintzer J, Burns A. Anticholinergic Side-effects of Drugs in Elderly People. *J R Soc Med.* 2000;September;93:457-462.

Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv.* 2011;2011:863734.

Monem AS, Ali FM, Ismail MW. Prolonged effect of liposomes encapsulating pilocarpine HCL in normal and glaucomatous rabbits. *International Journal of Pharmaceutics.* 2000;198(1):29-38.

Moss SE, Klein R, Klein BEK. Long-term Incidence of Dry Eye in an Older Population. *Optometry & Vision Science* 2008;85:668-674.

Neil M. Schultz, William B. Wong, Anne L. Coleman, Daniel C. Malone. Predictors, Resource Utilization, and Short-term Costs of Laser Trabeculoplasty Versus Medication Management in Open-Angle Glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*. 2016;168:78-85.

Mainardes RM, Urban MCC, Cinto PO, et al. Colloidal carriers for ophthalmologic drug delivery. *Current Drug Targets*. 2005;6(3):363-71.

Nakamori K, Odawara M, Nakajima T, et al. Blinking is controlled primarily by ocular surface conditions. *Am J Ophthalmol* 1997;124:24-30.

Nguyen C, Peck A. Unraveling the Pathophysiology of Sjögren Syndrome-Associated Dry Eye Disease. *Ocul Surf*. 2009;7:11-27.

Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, et al. The international Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Executive Summary. *Investigative & Visual Science*. 2011;52(4):1922-9.

Nickells RW. The molecular biology of retinal ganglion cell death: caveats and controversies. *Brain Res Bull*. 2004;62:439-446.

Nucci C, Bari M, Spano A, et al. Potential roles of (endo)cannabinoids in the treatment of glaucoma: from intraocular pressure control to neuroprotection. *Prog Brain Res*. 2008;173:451-464.

Ofri R. Intraocular pressure and glaucoma. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2002; 5(2):391-406.

Optometric Clinical Practice Guideline: Care of the Patient with Ocular Surface Disorders, 2011. <http://www.aoa.org/documents/optometrists/CPG-10.pdf>. Accessed January 21, 2015.

Pache M and Flammer J. A Sick Eye in a Sick Body? Systemic Findings in Patients with Primary Open-angle Glaucoma. *Survey of ophthalmology*. 2006 May-Jun;51(3):179-212.

Patri AK, Majoros IJ, Baker JR. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. - *Curr. Opin. Chem. Biol* 2002;6(4):466-471.

Peng CC, Kim J, Chauhan A. Extended delivery of hydrophilic drugs from silicone-hydrogel contact lenses containing vitamin E diffusion barriers. *Biomaterials*. 2010 May;31(14):4032-47.

Peppas NA, Khare AR. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1993;11:1-35.

Petrone D, Condemni J, Fife R, et al. A double-blind, randomized placebo-controlled study of cevimeline in Sjögren's syndrome patients with xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 2002;46:748-54.

Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *American Journal of Ophthalmology*. 2004;137(2):337-42.

Pflugfelder SC. Prevalence, burden, and pharmacoeconomics of dry eye disease. *Am J Manag Care*. 2008 Apr;14(3 Suppl):S102-6.

Pflugfelder SC, Maskin SL, Anderson B, et al. A randomized doublemasked, placebo-controlled, multicenter comparison of loteprednol etabonate ophthalmic suspension, 0.5% and placebo for treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with delayed tear clearance. *Am J Ophthalmol* 2004;138:444-7.

Pippa C, Peter C, Harry B, Ken S, Bal D. Tear Production and Corneal Sensitivity in Diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2007;21:371-373.

Pisella PJ, Pouliquen P, Baudouin C. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br J Ophthalmol* 2002;86:418-23.

Preferred Practice Guidelines: Dry Eye. American Academy of Ophthalmology, 2012. <http://one.aao.org/summary-benchmark-detail/summarybenchmarks-complete-septeoctober-2012>. Accessed August 19, 2014.

Qiu W, Liu Z, Ao M, et al. Punctal plugs versus artificial tears for treating primary Sjogren's syndrome with keratoconjunctivitis sicca: a comparative observation of their effects on visual function. *Rheumatol Int* 2013;33:2543-8.

Quigley HA. Glaucoma. *The lancet*. 2011; 377:1367-77.

Ramamoorthy PN, Nichols JJ. Mucins in Contact Lens Wear and Dry Eye Conditions. *Optom Vis Sci* 2008;Aug;85:631-42.

Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, et al. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Arch Ophthalmol* 2008;126:219-25.

Rees TD, Jelks GW. Blepharoplasty and the dry eye syndrome: guidelines for surgery? *Plast Reconstr. Surg* 1981;68:249-52.

Report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye work shop. The definition and classification of dry eye disease. *The Ocular Surface* 2007; Apr;5;2.

Reynolds JEF. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 31ª Edicin. Londres. The Royal Pharmacopoeia, 1996.

Rieck J. The Pathogenesis of Glaucoma in the Interplay with the Immune System. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. March2013;54(3):2393-2409.

Robbins & Cotran. Patología estructural y funcional. 7ª ed. Vol.1. Madrid: S.A Elsevier España. 2007.

Roberts CW, Carniglia PE, Brazzo BG. Comparison of topical cyclosporine, punctal occlusion, and a combination for the treatment of dry eye. *Cornea* 2007;26(7):805-9.

Rolando M, Refojo MF, Kenyon KR. Tear water evaporation and eye surface diseases. *Ophthalmologica* 1985;190:147-9.

Roncone M, Bartlett H, Esperjesi F. Essential fatty acids for dry eye; A review. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2010;33(2):49-54.

Roorda WE, Bodde HE, De Boer AG, Junginger HE. Synthetic hydrogels as drug delivery systems. *Pharm Weekbl Sci*. 1986 Jun 20;8(3):165-89.

Rosenberg ES, Asbell PA. Essential fatty acids in the treatment of dry eye. *Ocul Surf* 2010;8:18-28.

Russo PA, Bouchard CS, Galasso JM. Extended-wear silicone hydrogel soft contact lenses in the management of moderate to severe dry eye signs and symptoms secondary to graft-versus-host disease. *Eye Contact Lens* 2007;33:144-7.

Russo R, Rotiroti D, Tassorelli C, et al. Identification of novel pharmacological targets to minimize excitotoxic retinal damage. *Int Rev Neurobiol*. 2009;85:407-423.

Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. *CsA Phase 3 Study Group. Ophthalmology* 2000;107:631-9.

Scheaffer HE, Krohn DL. Liposomes in topical drug delivery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1982;22(2):220-7.

Schiffman RM, Walt JG, Jacobsen G, Doyle JJ, Lebovics G, Sumner W. Utility assessment among patients with dry eye disease. *Ophthalmology* 2003;110(7):1412-9.

Scott G, Yiu SC, Wasilewski D, et al. Combined esterified estrogen and methyltestosterone treatment for dry eye syndrome in postmenopausal women. *Am J Ophthalmol* 2005;139(6):1109-10.

Shalaby U, Amin Heikal M. Unilateral surgically induced Necrotizing Scleritis after trabeculectomy with Ologen in a patient with pigmentary glaucoma. *American Journal of Ophthalmology Case Reports* 2016;3:47-49.

Sobotta J, Reinhard P. Sobotta: Atlas de Anatomía humana. Vol. 2. Madrid: Panamericana, 2006.

Sommer A, Emran N. Tear production in a vitamin A responsive xerophthalmia. *Am J Ophthalmol* 1982;93:84-7.

Stahl J, Cook E, Barney N, Graziano F. Pathophysiology of ocular allergy: the roles of conjunctival mast cells and epithelial cells. *Current Allergy and Asthma Reports*.2002;2:332-339.

Stevenson, D. et al. Efficacy and safety of cyclosporin a ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. *Ophthalmology* 2000;107:967-974.

Sullivan DA. Tearful relationships? Sex, hormones, the lacrimal gland, and aqueous-deficient dry eye. *Ocul Surf* 2004;2(2):92–123.

Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications, Reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005;57(15):2106-2129.

Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;Sep:75(9):4194-8.

Szoka F, Papahadjopoulos D. comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (Liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering.* 1980;9(1):467-508.

Tei M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Gipson IK. Vitamin A deficiency alters the expression of mucin genes by the rat ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:82-8.

Tezel G, Yang X, Cai J. Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:3177-3187.

Thomas TP et al. Targeting and inhibition of cell growth by an engineered dendritic nanodevice. - *J. Med. Chem.* 2005;48(11):3729-3735.

Tsifetaki N, Kitsos G, Pashides C, et al. Oral pilocarpine for the treatment of ocular symptoms in patients with Sjögren's syndrome: a randomized 12 week controlled study. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1204-7.

Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-5.

Varma R, Lee PP, Goldberg I, Kotak S. An assessment of the health and economic burdens of glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2011;152:515–22.

Vico Ruiz E, Benitez del Castillo JM. Tratamiento hormonal In: *Superficie ocular*. Madrid: Sociedad Española de Oftalmología, 2004.

Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, et al. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjogren syndrome. *Arch Intern Med* 1999;159:174-91.

Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, et al. Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem* 2003;10:1485-506.

Wander AH, Koffler BH. Extending the duration of tear film protection in dry eye syndrome: review and retrospective case series study of the hydroxypropyl cellulose ophthalmic insert. *Ocul Surf* 2009;7:154-62.

Wentz SM, Kim NJ, Wang J, Amireskandari A, Siesky B, Harris A. Novel therapies for open-angle glaucoma. *F1000Prime Rep.* 2014;6:102.

Worda C, Nepp J, Huber JC, Sator MO. Treatment of keratoconjunctivitis sicca with topical androgen. *Maturitas* 2001;37(3): 209–12.

Yang C, Sun WY. A clinical study of the efficacy of topical corticosteroids on dry eye. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;7:675-8.

Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Wiedemann P, Honda Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* 2004;23(3):253-281.

Yenice, I. et al. Hyaluronic acid coated poly-ε-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Exp. Eye Res.* 2008;87:162–167.

Zeri F, De Cusatis M, Lupelli L, Swannd PG. The measurement of intraocular pressure over positive soft contact lenses by rebound tonometry. *Journal of Optometry* 2016;9: 182-188.

Zimmer A, Kreuter J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 1995;16:61-73.



## **2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO**



Las preparaciones oftálmicas convencionales que se utilizan por vía tópica tienen una serie de inconvenientes. Entre estos cabe destacar el limitado tiempo de residencia de la formulación sobre la superficie ocular, la dilución del fármaco por el lagrimeo y la baja permeabilidad ocular. Estas limitaciones causan una baja biodisponibilidad ocular estimándose que, aproximadamente, sólo el 5% del fármaco instilado llegar al lugar de acción.

El uso de sistemas farmacéuticos capaces, bien de aumentar el tiempo de retención de los fármacos sobre la superficie ocular, o bien mejorar el transporte a través de la córnea, permiten ampliar la biodisponibilidad del fármaco después de su administración tópica y, por tanto, reducir el número de aplicaciones al día y mejorar la confortabilidad del paciente.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es desarrollar nuevos nanosistemas que permitan la administración tópica ocular de fármacos que en formas de dosificación clásicas presentan problemas de formulación.

Se trata de vehiculizar adecuadamente sustancias activas que al pertenecer a la clase IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) ven limitada su utilización como preparados convencionales de aplicación ocular. Como principios activos indicadores se han utilizado la acetazolamida que actualmente no se utiliza por vía tópica ocular y la ciclosporina A que en formulaciones convencionales se utiliza a dosis elevadas.

Los objetivos específicos de esta memoria responden a los siguientes apartados.

## **2.1 PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOTENSORA DE NANOSISTEMAS DE ACETAZOLAMIDA DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.**

En esta tesis se ha abordado el diseño de nuevos nanosistemas capaces de aumentar la penetración ocular de fármacos con baja hidrosolubilidad como la acetazolamida. Las formulaciones desarrolladas deberán tener tolerancias óptimas sobre la superficie ocular. Dentro los nanosistemas estudiados se encuentran las nanopartículas y los liposomas.

### **2.1.1 NANOPARTÍCULAS DE HEMA-Bayfit-MA CARGADAS CON ACETAZOLAMIDA**

En este estudio se evalúa la posibilidad de utilización de unos nuevos copolímeros de HEMA-Bayfit-MA obtenidos a partir de un poloxamero comercial (Bayfit® 10WF15) funcionalizado y de moléculas hidrofílicas de HEMA. Los copolímeros han sido sintetizados por el grupo del Dr. Julio San Román.

El objetivo ha sido preparar y optimizar una formulación de nanopartículas a partir de estos copolímeros que presente buena tolerancia sobre la superficie ocular, permitiendo su administración por vía tópica oftálmica.

Como fármaco modelo se ha utilizado la acetazolamida con baja biodisponibilidad ocular cuando se administra por vía tópica oftálmica.

El planteamiento se indica en los siguientes hitos:

- Desarrollo y caracterización de nanopartículas blanco a partir de diferentes copolímeros.
- Selección del copolímero para la preparación de las nanopartículas con acetazolamida a partir de los ensayos de tolerancia de las nanopartículas blanco *in vitro e in vivo*.
- Desarrollo y caracterización fisicoquímica de las partículas cargadas con acetazolamida.
- Ensayos de actividad hipotensora de las nanopartículas cargadas con acetazolamida utilizando el conejo como especie animal de experimentación.

### **2.1.2 FORMULACIÓN LIPOSOMAL CON ACETAZOLAMIDA**

La tolerancia de las formulaciones en los tratamientos a largo plazo es un factor crítico ya que la formulación va a estar en contacto con la superficie ocular de forma crónica.

Los tratamientos antiglaucomatosos son a largo plazo y requieren instilaciones diarias por lo que se asocian con alteraciones de la SO, bien porque el paciente ya padezca un cuadro de SOS cuando se somete a tratamiento con hipotensores o bien por aparición de ojo seco durante el tratamiento. Aunque los efectos adversos se han asociado fundamentalmente con la presencia de conservantes en las formulaciones oftálmicas, la ausencia de los mismos no evita el daño en la superficie ocular. Por estas razones, la innovación de las formulaciones de agentes antiglaucomatosos resulta de gran interés.

Por esta razón el objetivo de este estudio ha sido el desarrollo de una formulación híbrida de un agente hipotensor con un vehículo que contiene componentes capaces de preservar la integridad de la superficie ocular. Al igual

que en el caso anterior el agente hipotensor elegido ha sido la acetazolamida. Como los liposomas presentan ventajas tales como una alta compatibilidad ocular, un aumento de la penetración corneal y tiempos de eliminación ocular más largos, el estudio se orienta hacia formulaciones liposomales que mejoren la biodisponibilidad de la sustancia activa y preserve, al mismo tiempo, la SO y la funcionalidad de la película precorneal.

El planteamiento del estudio responde a los siguientes apartados:

- Desarrollo de dispersiones liposomales que permitan incorporar adecuadamente la acetazolamida.
- Caracterización fisicoquímica de las formulaciones liposomales desarrolladas.
- Estudios de tolerancia *in vitro* de la sustancia activa y de las formulaciones desarrolladas.
- Ensayos de tolerancia ocular en animales de experimentación.
- Ensayos de actividad hipotensora de las formulaciones liposomales con acetazolamida utilizando el conejo como especie animal de experimentación.

## **2.2 PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE GELIFICACIÓN *IN SITU* DE CICLOSPORINA A DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.**

La ciclosporina A (CsA) es un inmunomodulador y un agente antiinflamatorio. En oftalmología tiene diversas aplicaciones, incluyendo síndrome de ojo seco, prevención del rechazo de injerto corneal, blefaritis, rosácea y diferentes tipos de queratoconjuntivitis.

El objetivo de este trabajo fue en primer lugar la evaluación de la eficacia de una formulación liposomal de ciclosporina A con hialuronato sódico desarrollada por el grupo de investigación para el tratamiento del síndrome de ojo seco. En el segundo lugar, se propone el desarrollo de un nuevo preparado liposomal con Ciclosporina A capaz de gelificar *in situ* con el fin de aumentar el tiempo de contacto con la superficie ocular.

### **2.2.1 ESTUDIOS DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE CICLOSPORINA A CON HIALURONATO SÓDICO EN PERROS QUE PADECEN EL SÍNDROME DE OJO SECO**

La formulación liposomal de ciclosporina A (al 0,1%) desarrollada en el grupo de investigación, incluye componentes semejantes a los de la película precorneal. El preparado contiene fosfatidilcolina como componente lipídico, trehalosa como agente osmoprotector, vitamina E como antioxidante y hialuronato sódico como mucomimético.

El síndrome de ojo seco espontáneo en la especie canina se ha considerado un modelo idóneo para la evaluación de estos preparados farmacéuticos al no presentar los inconvenientes de los modelos animales de laboratorio.

### **2.2.2 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE GELIFICACIÓN *IN SITU* DE CICLOSPORINA A.**

Con el fin de aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular y por tanto aumentar su eficacia, así como disminuir el número de instilaciones, se planteó el desarrollo de un nuevo preparado liposomal con ciclosporina A capaz de gelificar *in situ*. Este preparado combinaría las características de una formulación líquida a la hora de la administración con las

de un gel en el lugar de administración, evitando los problemas de aplicación de este último.

El planteamiento se indica a continuación:

- Selección del agente de gelificación *in situ* y estudio de los factores que modifican la respuesta gelificante.
- Desarrollo y caracterización fisicoquímica de la formulación liposomal con ciclosporina A de gelificación *in situ*.
- Caracterización del gel formado por simulación *in situ*.
- Estudio de tolerancia ocular *in vivo* de la formulación desarrollada.
- Estudios de eficacia de la formulación de gelificación *in situ* de Ciclosporina A en perros que padecen el síndrome de ojo seco.

**3. CAPÍTULO 1: DESARROLLO Y  
CARACTERIZACIÓN DE  
NANOPARTÍCULAS DE HEMA-  
Bayfit-MA CARGADAS CON  
ACETAZOLAMIDA**



### **3.1 INTRODUCCIÓN**

Los sistemas nanoparticulares han sido ampliamente estudiados como sistemas de liberación de fármacos en el campo farmacéutico y médico<sup>1</sup>. A nivel ocular, las nanopartículas, han mostrado una capacidad de liberar fármacos en localizaciones diana y con ello proporcionar una alternativa en diferentes tratamientos de numerosas enfermedades<sup>2</sup>.

En un proyecto en colaboración con el grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) se han sintetizado copolímeros combinando el poloxámero comercial Bayfit®-10WF15 funcionalizado con grupos metacrilatos (Bayfit-MA) y moléculas hidrofílicas de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA). Estos

---

<sup>1</sup> Adibkia K, Barzegar-Jalali M, Nokhodchi A, Siah Shadbad MR, Omid Y, Javadzadeh Y, et al. A review on the methods of preparation of pharmaceutical nanoparticles. *Pharmaceutical Sciences*. 2009;15(4):303-14.

<sup>2</sup> Diebold Y, Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010;29(6):596-609.

copolímeros (HEMA-Bayfit-MA) han sido caracterizados por el grupo de investigación de Biomateriales del ICTP dirigido por el Dr. Julio San Román<sup>3</sup>.

Gracias a su naturaleza anfífilica estos copolímeros pueden ser empleados en la elaboración de nanosistemas medicamentosos en general y, en concreto, para nanosistemas de administración tópica ocular<sup>4</sup>.

El glaucoma es una neuropatía óptica progresiva y es la principal causa de ceguera en los países industrializados<sup>5</sup>. Esta patología está caracterizada por una pérdida de las células ganglionares de la retina (RGCs) y sus axones. En esta enfermedad, es frecuente el incremento de la presión intraocular (PIO >21mm Hg), produciendo un daño irreversible en el nervio óptico, seguido de una neuropatía ocular y pérdida de la visión<sup>6</sup>. Por esta razón, los agentes hipotensores oculares se han convertido en los componentes principales en el tratamiento de la enfermedad. Existen 5 clases principales de fármacos aprobados para el tratamiento tópico del glaucoma: análogos de la prostaglandinas, betabloqueantes, inhibidores de la anhidrasa carbónica, simpaticomiméticos y mióticos<sup>7</sup>.

---

<sup>3</sup> Parra FJ, Rodríguez-Alonso L, Marinich J, Herrero-Vanrell R, Fernández-Gutiérrez M, Vázquez B, Román JS. Random co-polymers based on the poloxamer Bayfit® 10WF15 for biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2011;22(14):1895-916.

<sup>4</sup> Parra FJ, Rodríguez-Alonso L, Marinich J, Herrero-Vanrell R, Fernández-Gutiérrez M, Vázquez B, Román JS. Random co-polymers based on the poloxamer Bayfit® 10WF15 for biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2011;22(14):1895-916.

<sup>5</sup> Arriola-Villalobos P, Martínez-de-la-Casa JM, Díaz-Valle D, Morales-Fernández L, Fernández-Pérez C, García-Feijoo J. Glaukos iStent inject® Trabecular Micro-Bypass Implantation Associated with Cataract Surgery in Patients with Coexisting Cataract and Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension: A Long-Term Study. *Journal of Ophthalmology.* 2016;2016: 1056573.

<sup>6</sup> Phatak NR, Stankowska DL, Krishnamoorthy RR. Bcl-2, Bcl-xL, and p-AKT are involved in neuroprotective effects of transcription factor Brn3b in an ocular hypertension rat model of glaucoma. *Mol Vis.* 2016;22:1048–1061.

<sup>7</sup> Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, de Vincentiis M. Emerging Concepts in Glaucoma and Review of the Literature. *Am J Med.* 2016 Sep;129(9):1000.e7-1000.e13.

La acetazolamida (ACZ) es una sustancia activa inhibidora de la anhidrasa carbónica estando aprobada su utilización por vía oral como reductor de la presión intraocular en el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, su prescripción está bastante limitada debido a los potenciales efectos adversos sistémicos que puede generar, siendo la diuresis, la acidosis sistémica, la pérdida de la libido, la diarrea y la pérdida de peso los más importantes<sup>8</sup>. Estos efectos secundarios descritos podrían evitarse si se recurriese a la administración por vía tópica ocular, que además conlleva ciertas ventajas como son: (i) una reducción en la dosis administrada, (ii) un comienzo de acción más rápido y (iii) un mejor cumplimiento por parte del paciente.

Sin embargo, la baja hidrosolubilidad de la ACZ (0,7-0,8 mg/mL)<sup>9</sup> limita la dosis que se puede administrar en solución acuosa y su baja permeabilidad ( $4,1 \times 10^{-6}$  cm/s) limita la penetración corneal, por lo que no se utiliza por vía ocular en la práctica clínica<sup>10</sup>.

---

<sup>8</sup> Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002 Nov 6;248(1-2):1-14.

<sup>9</sup> Pisal PB, Joshi MA, Padamwar MN, Patil SS, Pokharkar VB. Probing influence of methodological variation on active loading of acetazolamide into nanoliposomes: Biophysical, in vitro, ex vivo, in vivo and rheological investigation. *Int J Pharm.* 2014 Jan 30;461(1-2):82-88.

<sup>10</sup> Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002 Nov 6;248(1-2):1-14.

Entre las posibles estrategias para mejorar la biodisponibilidad ocular de fármacos con estas características biofarmacéuticas, se encuentra la encapsulación de la sustancia activa en nanopartículas poliméricas<sup>11 12 13 14</sup>.

En este sentido, el objetivo del presente estudio fue preparar y optimizar una formulación de nanopartículas utilizando un copolímero de HEMA-Bayfit-MA que además presente una buena tolerancia sobre la superficie ocular, permitiendo su administración por vía tópica oftálmica. Los ensayos de tolerancia *in vitro* permitieron seleccionar el copolímero más adecuado para la formulación.

Como fármaco modelo se ha utilizado la acetazolamida con baja biodisponibilidad ocular cuando se administra por vía tópica oftálmica (limitaciones comentadas anteriormente).

La caracterización de las nanopartículas incluye ensayos de distribución de tamaño de partícula, determinación del potencial Z, visualización por microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia de fuerza atómica (AFM), y estudios de tolerancia *in vitro* utilizando células de la córnea, células de la conjuntiva y macrófagos. Finalmente se ha realizado el estudio de eficacia de las nanopartículas cargadas con ACZ utilizando el conejo como animal de experimentación.

---

<sup>11</sup> Ibrahim MM, Abd-Elgawad AH, Soliman OA, Jablonski MM. Natural Bioadhesive Biodegradable Nanoparticle-Based Topical Ophthalmic Formulations for Management of Glaucoma. *Transl Vis Sci Technol.* 2015 Jun 30;4(3):12.

<sup>12</sup> Patel A, Patel M, Yang X, Mitra AK. Recent advances in protein and Peptide drug delivery: a special emphasis on polymeric nanoparticles. *Protein Pept Lett.* 2014;21(11):1102-20.

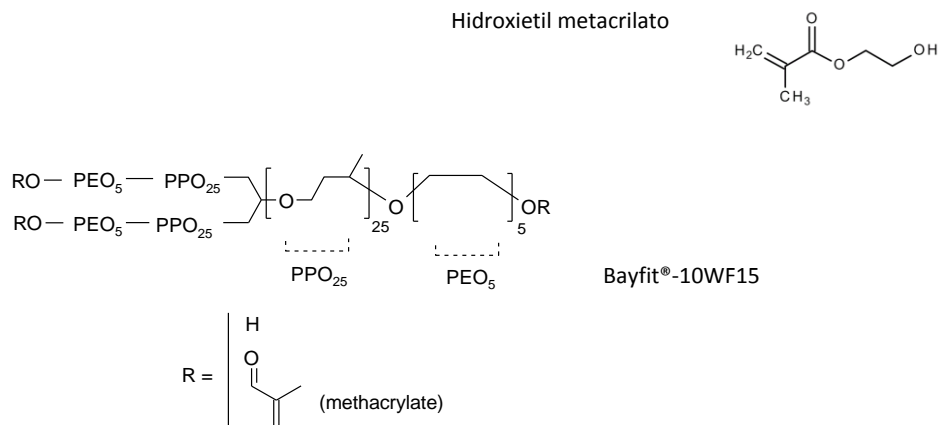
<sup>13</sup> Chaurasia SS, Lim RR, Lakshminarayanan R, Mohan RR. Nanomedicine approaches for corneal diseases. *J Funct Biomater.* 2015 Apr 30;6(2):277-98.

<sup>14</sup> Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for Ocular Drug Delivery. *Macromol Biosci.* 2012 May;12(5):608-20.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 MATERIALES

Los copolímeros HEMA-Bayfit-MA fueron suministrados por el grupo de investigación de Biomateriales del ICTP. La estructura química de los componentes iniciales utilizados en la elaboración de estos copolímeros se recoge en la Figura 3.1



**Figura 3.1.** Estructura química de los componentes básicos de los copolímeros HEMA-Bayfit-MA.

Se han utilizado copolímeros preparados con distinta proporción de componentes básicos HEMA y BAYFIT-MA: 1:99, 5:95 y 10:90 (m/m).

Los pesos moleculares de estos compuestos<sup>15</sup> se recogen en la Tabla 3.1.

<sup>15</sup> Parra FJ, Román JS, Rodríguez-Alonso L, Herrero-Vanrell, Vázquez B, inventors; CSIC, UCM, assignee. Hidrogeles basados en poloxámeros con estructura de estrella para liberación controlada de sustancias activas. Spanish patent ES 2352634. 2011 February 22. Spanish.

COMPOSICIÓN		MASA MOLECULAR (kDa)		
<i>Bayfit-MA</i>	<i>HEMA</i>	<i>Mn</i>	<i>Mw</i>	<i>Mw/Mn</i>
99	1	100	148	1,7
95	5	60	80	1,8
90	10	-	-	-

Mn: Peso molecular promedio en número  
Mw: Peso molecular promedio en masa  
Mw/Mn: Índice de polidispersión

**Tabla 3.1.** *Composición y masa molecular de los polímeros utilizados*

La Acetazolamida (ACZ) fue comprada en Sigma-Aldrich (Madrid, España). El Dimetilsulfoxido (DMSO), acetato de sodio, hidróxido sódico y diclorometano (DCM) fueron adquiridos en Panreac (Madrid, España). El acetonitrilo y el ácido acético glacial al 99,5% fueron comprados en Lab-Scan (Gliwice, Polonia). El Propilenglicol fue adquirido en Abaran Materias Primas S.L (Madrid, España). El Agua ultrapura milli-Q fue producida en el laboratorio por el equipo Milli-Q Water Purification System (Millipore Iberica SA, Madrid, España). Se utilizaron conejos blancos machos de Nueva Zelanda de 3 a 4 kg suministrados por la Granja San Bernardo (Navarra, España).

### 3.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LA ACZ POR HPLC

La cuantificación de la sustancia activa se llevó a cabo utilizando un equipo HPLC de Gilson (EEUU) con una bomba de suministro de disolvente 305, un detector

118 UV-vis , un controlador UniPoint™<sup>®</sup> y un inyector con un *loop* de 20 µL, 7125 Rheodyne (EEUU). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 de fase reversa Tracer Excel ODSA (25 cm x 4 mm, 5 µm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona, España). La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y una solución acuosa de acetato de sodio 0,1M en relación 1:5 y ajustada con acético glacial hasta pH 4,5. Se utilizó un flujo de 1 mL/min y un detector de absorbancia a 245 nm. Se procedió a la validación de la linealidad, la exactitud y la precisión del método en un intervalo de concentraciones entre 1 y 10 µg/mL.

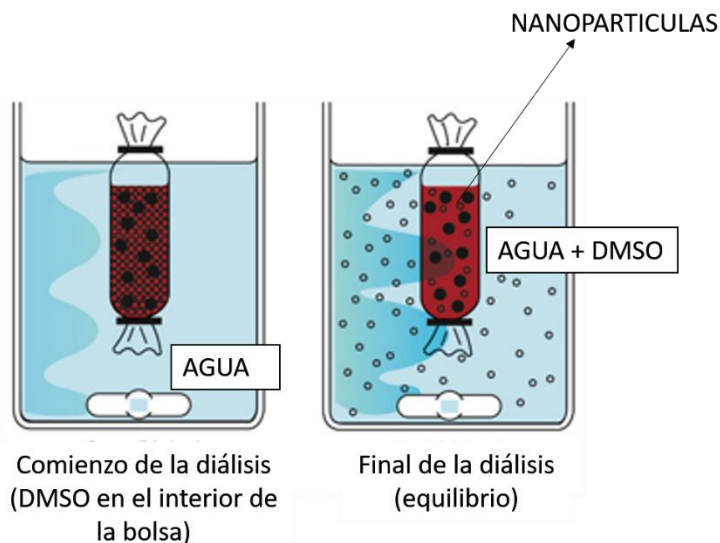
### **3.2.3 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS BLANCO**

#### **3.2.3.1 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS BLANCO**

Las nanopartículas fueron elaboradas utilizando los copolímeros suministrados por el grupo de Biomateriales del ICTP descritos en uno de los apartados anteriores (Tabla 3.1). Por tanto, se prepararon nanopartículas utilizando copolímeros preparados con distinta proporción de componentes básicos HEMA y BAYFIT-MA: 1:99, 5:95 y 10:90 (m/m) y que recibieron los nombres de NP1, NP5 y NP10 respectivamente.

En todos los casos el copolímero HEMA-Bayfit-MA se disolvió en DMSO a una concentración de 300 mg/250 mL, calentando a 100°C y agitando hasta su completa disolución. La solución final una vez enfriada a temperatura ambiente, se introdujo en una bolsa de diálisis (Spectra/Por<sup>®</sup> dialysis membrane, MWCO 3500, Spectrum Laboratories, Iberlabo, Madrid, España) y

se realizó un proceso de diálisis con agua ultrapura sin adición de surfactantes<sup>16</sup> bajo agitación moderada. De esta forma se van formando nanopartículas por precipitación del polímero en agua y se consigue eliminar el DMSO de la dispersión final (Figura 3.2). El agua se renovó cada 3 horas durante 3 días.



**Figura 3.2.** Proceso de diálisis para la formación de nanopartículas de HEMA-Bayfit-MA

Una vez finalizado el proceso, la dispersión de nanopartículas de la bolsa de diálisis fue filtrada por filtro de 0,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (0,8  $\mu\text{m}$ -25 mm Unidad de filtro accionado por jeringa Millex®-AA, Membrana MF-Millipore).

Una vez alicuotada la dispersión en eppendorfs de 1mL, estos fueron congelados durante 12 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y liofilizados (Flexi-Dry™, FTS Systems, NY, EE.UU.). Posteriormente, se pesaron las muestras (Mettler AG104, Mettler

---

<sup>16</sup> Jeon HJ, Jeong YI, Jang MK, Park YH, Nah JW. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. Int J Pharm. 2000 Oct 10;207(1-2):99-108.

Toledo, Barcelona, España) y se almacenaron hasta su uso. La concentración de nanopartículas (NP) en las dispersiones se determinó gravimétricamente.

Cabe resaltar que las NP se han obtenido sin la incorporación de tensioactivos, lo que se puede atribuir al comportamiento anfifílico del sistema HEMA-Bayfit-MA.

### 3.2.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS BLANCO

Las distribuciones de tamaño de partícula y el potencial zeta de las NP se determinaron por dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un instrumento Nano ZS de Malvern Nanosizer equipado con un láser He-Ne de 4 mW ( $\lambda = 633$  nm). La función de autocorrelación fue convertida en una distribución de tamaño volumétrica con la versión ZetaSizer Software 6.12 para obtener el diámetro aparente hidrodinámico ( $D_h$ ) y el índice de dispersión (ID) que puede tomar valores entre 0 (sistema monodisperso) y 1 (sistema altamente polidisperso) utilizando las ecuaciones de Stokes-Einstein. El potencial Z se determinó usando electroforesis láser Doppler (LDE) con 30 series por medida. La temperatura se mantuvo constante a 25°C durante las mediciones de tamaño y potencial zeta. Los potenciales zeta se calcularon automáticamente a partir de la movilidad electroforética utilizando la aproximación de Smoluchowski.

Todas las medidas se realizaron por triplicado.

La morfología de las nanopartículas se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El análisis SEM se realizó con un instrumento XL30 Philips trabajando con una tensión de aceleración de 3 KeV. Se prepararon muestras por deposición de la correspondiente dispersión de NP sobre

pequeños discos de vidrio (10 mm de diámetro y 1 mm de espesor) y posterior evaporación a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se recubrieron con una aleación de paladio y oro. Los experimentos de microscopía de fuerza atómica (AFM) se realizaron en modo de derivación utilizando un AFM multimodo (Veeco Instruments, Santa Bárbara, CA, EE.UU.) equipado con un sistema de control Nanoscope IVa (versión de software 6.14r1). Se utilizaron sondas de derivación de silicio (RTESP, Veeco) con una frecuencia de resonancia  $\sim 300$  KHz y una velocidad de exploración de 0,5 Hz. Se tomaron imágenes topográficas de  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ,  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  y  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  para cada muestra.

### **3.2.4 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NP CARGADAS CON ACZ**

#### **3.2.4.1 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON ACZ**

Las partículas cargadas con ACZ se prepararon con el copolímero HEMA-Bayfit-MA de proporción 5:95 (m/m). Como ya se indicó en la preparación de las nanopartículas blanco, el polímero HEMA-Bayfit-MA se disolvió en DMSO a una concentración de 2 mg/mL, calentando a 100°C y agitando durante la noche hasta su completa disolución. A continuación, se añadió la ACZ a la solución polimérica para obtener una concentración del fármaco de 0,8 mg/mL. Esta disolución se introdujo luego en una bolsa de diálisis y se dializó frente a una solución acuosa de ACZ al 0,8 mg/mL para evitar la pérdida de ACZ en la bolsa de diálisis.

Después de este proceso se recogieron las nanopartículas como se describe en la sección de preparación de nanopartículas blanco. La concentración de nanopartículas (NP) en las dispersiones se determinó gravimétricamente.

Finamente se ajustó la osmolaridad y el pH de las formulaciones con propilenglicol y NaOH 1M, respectivamente.

#### 3.2.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON ACZ

La morfología de las nanopartículas se observó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (JEOL, JEM1010, Seúl, Corea) en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (ICTS) de la Universidad Complutense de Madrid. Para la preparación de las muestras, se colocó una gota de dispersión de nanopartículas sobre la rejilla revestida con carbono (Spi<sup>®</sup>, Alpha Biotech Ltd, Glasgow, UK) y se visualizó en el microscopio. El tamaño de partícula se evaluó por la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (Zetatracc: Microtracc-Europe GmbH, Meerbusch, Alemania).

Se evaluó el contenido total de ACZ en la formulación. Para ello la dispersión de nanopartículas fue sometida a un ciclo de congelación/descongelación con el fin de aglomerar el polímero, separando el sobrenadante por centrifugación (8500 rpm, 15 min). El aglomerado resultante se liofilizó y se disolvió en una mezcla de DMSO: Agua (4:1). La cantidad de ACZ se determinó por HPLC en el sobrenadante y en el aglomerado disuelto como se describe en la sección de cuantificación de la ACZ por HPLC.

La osmolaridad de la formulación de nanopartículas cargadas con ACZ se analizó mediante con un osmómetro de vapor modelo k-7000 (Knauer, Berlín, Alemania). El osmómetro se calibró con una solución de NaCl 400 mOsm/L. La determinación del pH se llevó a cabo utilizando un pH-metro GLP 22 (Crison, Alella, Barcelona, España) equipado con un electrodo de vidrio combinado Ag/AgCl (Crison 52-02; Alella, Barcelona, España).

Todas las medidas se realizaron por triplicado a temperatura ambiente.

### **3.2.5 ENSAYO DE CESION *IN VITRO***

Se realizó utilizando un dispositivo de diálisis. La dispersión de nanopartículas cargadas con ACZ (0,8 mL) se colocó en el interior de una bolsa de diálisis (Spectra/Por Float-A-Lyzer G2, 20.000 MW cortado, Iberlabo, Madrid). Esta a su vez se introdujo en un matraz con 50 mL de una solución tamponada con fosfatos isotonizada con NaCl (PBS, pH 7,4) y se mantuvo a 33°C en un agitador a 100 rpm. Periódicamente se retiró 1 mL del medio de cesión (5 min, 15 min, 30 min y una vez cada hora durante un periodo de 8 y a las 24 horas) que fue repuesto con medio nuevo con el fin de mantener constante el volumen de medio de cesión. Las muestras fueron diluidas convenientemente y valoradas por HPLC siguiendo el método descrito en la sección de cuantificación de la ACZ por HPLC.

### **3.2.6 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR *IN VITRO***

Estos ensayos se han realizado para seleccionar el copolímero que se va a utilizar en el desarrollo de las nanopartículas medicamentosas. Fueron ensayadas las nanopartículas blanco preparadas con los copolímeros HEMA-Bayfit-MA de 1:99 (NP1), 5:95 (NP5) y 10:90 (NP10) (m/m). Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo con diferentes líneas celulares: (i) células corneales humanas (células HCLE, Schepens eye research institute, Harvard medical school, MA, EE.UU.), (ii) células conjuntivales humanas (IOBA-NHC; Valladolid,

España)<sup>17</sup> y (iii) macrófagos de ratón (RAW 264,7)<sup>18</sup>. Las líneas celulares HCLE e IOBA-NHC se cultivaron conforme el protocolo publicado previamente por Andrés-Guerrero y col.<sup>19</sup>

Los estudios de citotoxicidad se evaluaron mediante la reducción mitocondrial-dependiente de la sal de tetrazolio, bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich, Madrid, España) a formazán<sup>20 21</sup>. Se establecieron tiempos de exposición de 15 minutos, 1 hora y 4 horas con el fin de simular tratamientos a corto y largo plazo<sup>22</sup>. En administración tópica ocular se estima que el tiempo de residencia sobre la superficie ocular de una formulación convencional es inferior a 5 minutos por lo que tiempos de contacto cortos (15 minutos) serían suficientes para definir su tolerancia. Sin embargo, con el fin de simular terapias a largo plazo y/o teniendo en cuenta que los polímeros aumentan el tiempo de contacto de la formulación sobre la superficie ocular, se incluyen en el ensayo tiempos de contacto de 1 y 4 horas. Este método ha sido empleado anteriormente por otros autores en la

---

<sup>17</sup> Diebold Y Calonge M Enríquez de Salamanca A Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Visl Sci.* 2003;44:4263–4274.

<sup>18</sup> De Las Heras B, Abad MJ, Silván AM, Pascual R, Bermejo P, Rodríguez B, Villar AM. Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sciences.* 2001;70(3):269-78.

<sup>19</sup> Andrés-Guerrero V, Molina-Martínez IT, Peral A, de las Heras B, Pintor J, Herrero-Vanrell R. The Use of Mucoadhesive Polymers to Enhance the Hypotensive Effect of a Melatonin Analogue, 5-MCA-NAT, in Rabbit Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Mar 18;52(3):1507-15.

<sup>20</sup> Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research.* 1988;48(17):4827-33.

<sup>21</sup> Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry.* 1997;69(2):581-93.

<sup>22</sup> Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

caracterización de nanosistemas<sup>23 24</sup>. Como referencia se utilizaron células tratadas con medio de cultivo y como control positivo se usó una solución de cloruro de benzalconio al 0,005% en NaCl al 0,9%<sup>25 26 27 28</sup> (BAK, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.2.7 ESTUDIOS *IN VIVO* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los experimentos se llevaron a cabo en conejos macho con valores normales de PIO de Nueva Zelanda (3-4 kg) procedentes de la granja de San Bernardo (Navarra, España). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con alimento y agua “*ad libitum*” bajo ciclos controlados de luz/oscuridad (12h/12h). Los estudios en animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid. Las

---

<sup>23</sup> Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

<sup>24</sup> I. Bravo-Osuna, M. Vicario-de-la-Torre, V. Andres-Guerrero, J. Sanchez-Nieves, M. Guzman-Navarro, F.J. de la Mata, R. Gomez, B. de las Heras, P. Argüeso, G. Ponchel, R. Herrero-Vanrell, and I. T. Molina-Martínez. Novel Water-Soluble Mucoadhesive Carbosilane Dendrimers for Ocular Administration. *Mol. Pharmaceutics* 2016;13: 2966–2976.

<sup>25</sup> Aguayo Bonniard A, Yeung JY, Chan CC, Birt CM. Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK). *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016 Jul 18:1-11.

<sup>26</sup> Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative study of in vitro ocular surface cytotoxicity of a fixed combination of 0.5% timolol/1% dorzolamide eyedrop and its components with 0.005% benzalkonium chloride. *Biocontrol Sci*. 2012;17(3):115-20.

<sup>27</sup> Pellinen P Huhtala A Tolonen A Lokkila J Maenpaa J Uusitalo H. The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium in vitro and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues in vivo. *Curr Eye Res*. 2012;37:145–154.

<sup>28</sup> Seibold LK Ammar DA Kahook MY. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity in vitro. *Curr Eye Res*. 2012;38:70–74.

manipulaciones de los animales siguieron la normativa establecida por ARVO para el uso de animales de experimentación (ARVO Statement for the use of Animals in Ophthalmology and Vision Research<sup>29</sup>) y con la directiva correspondiente de la comunidad europea (European Communities Council Directive (86/609/EEC)).

### 3.2.7.1 ENSAYO DE TOLERANCIA *IN VIVO*

Se realizaron con nanopartículas blanco NP5 y NP10 ya que las nanopartículas NP1 presentaron valores inferiores de viabilidad celular. Cada conejo recibió 25  $\mu$ L de las formulaciones a ensayar en el ojo derecho cada 30 min durante 6 horas. El ojo contralateral recibió el mismo volumen de solución de NaCl al 0,9% y se utilizó como control. A las tres, seis y veinticuatro horas después de la primera instilación se evaluaron macroscópicamente el disconfort de los animales, los síntomas y signos en la conjuntiva, la córnea y los párpados (Tabla 3.2) usando una modificación del sistema de puntuación establecido en las directrices de 2002 de la Organización de Cooperación y Desarrollo<sup>30</sup> y a protocolos descritos por Enriquez y col<sup>31</sup>.

---

<sup>29</sup> www.arvo.org[internet] EEUU; ARVO. [actualizado 2016; citado 10 feb 2017]. Disponible:

[http://www.arvo.org/about\\_arvo/policies/statement\\_for\\_the\\_use\\_of\\_animals\\_in\\_ophthalmic\\_and\\_visual\\_research/](http://www.arvo.org/about_arvo/policies/statement_for_the_use_of_animals_in_ophthalmic_and_visual_research/)

<sup>30</sup> Organization for Economic Co-operation and Development. Test guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Available on-line at <http://www.oecd.org2002> [7 jul 2016].

<sup>31</sup> Enriquez de Salamanca A, Calonge M, García Vazquez C, Callejo vila A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular Surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Apr;47(4):1416-25.

Grado	Disconfort	Córnea	Conjuntiva	Secreción	Párpados
0	No reacción	No alteración	No alteración	No secreción	No inflamación
1	Parpadeo	Opacidad moderada	Hiperemia moderada; edema moderado.	Secreción leve sin pelo humedecido	Inflamación moderada
2	Parpadeo aumentado; lagrimeo intenso; vocalización	Opacidad intensa	Hiperemia intensa; edema intenso; hemorragia	Secreción intensas con pelo humedecido	Inflamación intensa

**Tabla 3.2.** Sistema de graduación de la evaluación macroscópica de los signos y síntomas para el estudio de tolerancia in vivo.

### 3.2.7.2 ACTIVIDAD HIPOTENSORA

La presión intraocular (PIO) se midió con un tonómetro de rebote Tonovet (Tiolat, Helsinki, Finlandia). Con esta técnica se evaluó la PIO sin necesidad de anestesia tópica. El filamento central del tonómetro de rebote se mantuvo en una posición horizontal y la distancia se mantuvo a 4-8 mm entre la punta del filamento y la córnea. El ensayo fue realizado tras entrenamiento usando un conjunto de procedimientos bien definidos para asegurar mediciones más precisas. Los conejos se mantuvieron en calma durante al menos 3 minutos antes de la medición de la PIO. En el caso de la presencia de cualquier signo de

estrés, las mediciones de la PIO se pospusieron durante al menos otros 3 minutos<sup>32 33</sup>.

Se realizaron ensayos con la dispersión de nanopartículas con ACZ utilizando como referencia o comparador activo una solución isotónica de ACZ con la misma concentración de fármaco que la dispersión. Como controles o placebos, los conejos recibieron formulaciones sin el agente hipotensor.

A continuación, se aplicó una dosis única de la formulación test, del comparador o de los placebos (25  $\mu$ L) en ambos ojos (n=20 para las formulaciones y n=10 para los controles). Las mediciones se realizaron una vez cada hora durante un periodo de 8 horas comenzando a las 10 de la mañana. Con el fin de reducir el número de conejos, los mismos animales se usaron múltiples veces. Por ello, se introdujo en los protocolos un período de lavado de al menos 48 horas entre los experimentos debido a que la semivida plasmática de la ACZ es de 3-6 h<sup>34</sup>.

La actividad hipotensora de cada formulación fue evaluada en términos de reducción de la presión intraocular ( $\Delta$ PIO). Este dato fue calculado para cada ojo, fijando el 100% de PIO con dos lecturas basales tomadas 30 minutos antes e inmediatamente antes de la instilación de las formulaciones. A partir de estos datos se calculó el área bajo la curva  $\Delta$ PIO-tiempo (AUC, %-hora) utilizando la regla trapezoidal. También se valoró el descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta$ PIO<sub>max</sub>).

---

<sup>32</sup> Millar JC, Pang IH. Non-continuous measurement of intraocular pressure in laboratory animals. *Exp Eye Res.* 2015 Dec;141:74-90.

<sup>33</sup> Ma D, Chen CB, Liang J, Lu Z, Chen H, Zhang M. Repeatability, reproducibility and agreement of intraocular pressure measurement in rabbits by the TonoVet and Tono-Pen. *Sci Rep.* 2016 Oct 12;6:35187.

<sup>34</sup> Lehmann B, Linner E, Wistrand PJ. The pharmacokinetics of acetazolamide in relation to its use in the treatment to glaucoma and to its effects as an inhibitor of carbonic anhydrases. *Adv Biosci.* 1969;5;197-217.

### **3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.3.1 CUANTIFICACIÓN DE LA ACZ POR HPLC**

El método de HPLC resultó lineal y proporcional en el intervalo de concentraciones entre 1 y 10 µg/mL (Tabla 3.3). La exactitud se situó entre el 99,5% y el 100,4% ( $\alpha=0,05$ ), y la repetibilidad y precisión intermedia expresadas como coeficientes de variación porcentuales fueron inferiores al 2% en ambos casos. El tiempo de retención fue de 5 min.

	<b>Serie 1</b>	<b>Serie 2</b>	<b>Serie 3</b>
Pendiente	165871	150899	163913
Ordenada	3845,7	6650,9	-340,5
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0,998	0,999	0,993
Comparación de la ordenada al origen con cero (Test t)	p=0,852 N.S.	p=0,209 N.S.	p=0,973 N.S.
Existencia de pendiente (Test de Fisher)	p<0,001 A.S.	p<0,001 A.S.	p<0,001 A.S.

**Tabla 3.3.** *Parámetros de regresión lineal.*

### 3.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS BLANCO

Las nanopartículas blanco fueron preparadas con 3 copolímeros de HEMA-Bayfit-MA (Tabla 3.4), con el fin de seleccionar el material más adecuado para la formulación de acetazolamida.

Nanosistemas	Proporción HEMA-Bayfit-MA
NP1	1:99
NP5	5:95
NP10	10:90

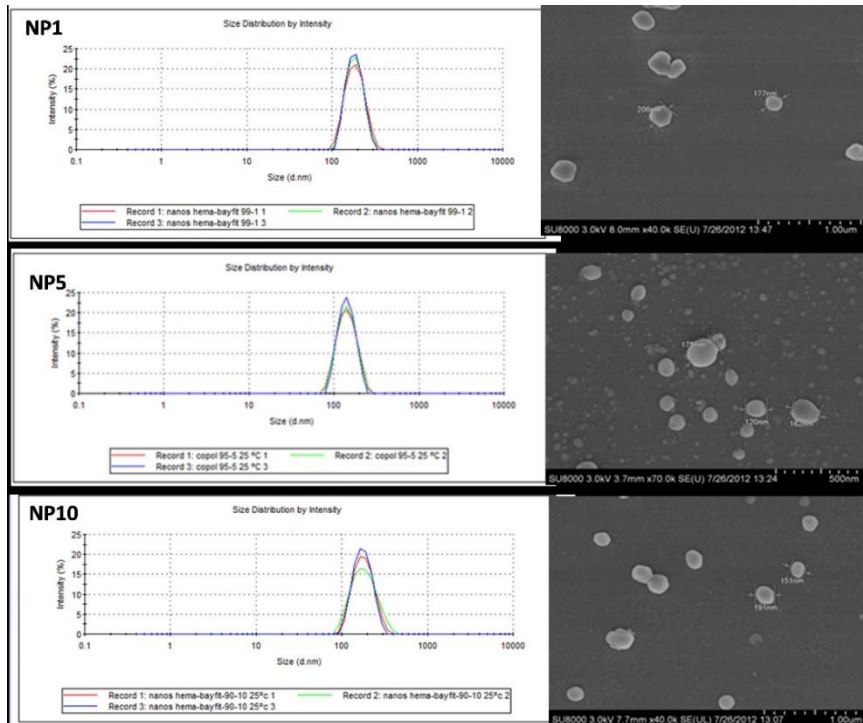
**Tabla 3.4.** *Dispersiones de nanopartículas blanco ensayadas.*

#### 3.3.2.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

La concentración de nanopartículas en las dispersiones preparadas se ajustó un valor de 0,8 mg/mL en todos los casos.

El tamaño de las nanopartículas se evaluó por dispersión dinámica de la luz a 25°C. Las distribuciones de tamaño obtenidas fueron unimodales (Figura 3.3) y los resultados de diámetros aparentes hidrodinámicos y de índices de dispersión obtenidos se recogen en la Tabla 3.5.

Aunque el tamaño de partícula no resulta crítico para la formulación, si puede reflejar la estabilidad del sistema y originar visión borrosa en el momento de la instilación.



**Figura 3.3.** Distribuciones de tamaño de las nanopartículas NP1, NP5 y NP10 medidas por dispersión de luz láser y sus correspondientes micrografías electrónicas de barrido (longitud de las barras de escala 500 nm y 1  $\mu$ m).

Nanosistemas	Dh (nm) $\pm$ DE	ID
NP1	179,1 $\pm$ 0,4	0,027
NP5	137,0 $\pm$ 0,8	0,024
NP10	170,2 $\pm$ 0,3	0,062

**Tabla 3.5.** Valores promedios de diámetro aparente hidrodinámico ( $D_h$ ) e índices de dispersión (ID) obtenidos para las nanopartículas blanco. DE: desviación estándar.

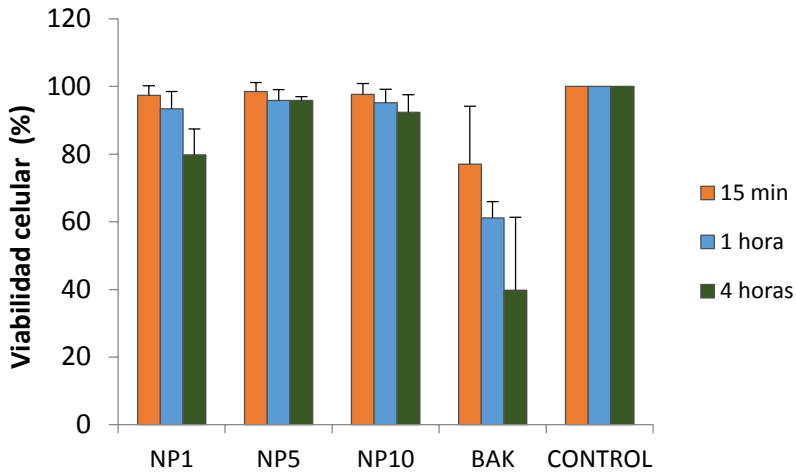
Las nanopartículas NP5 son las que presentan un menor tamaño medio de partícula, lo que indica que posiblemente la interacción entre las unidades del copolímero es mayor.

Cuando se visualizaron las nanopartículas mediante SEM, se observó que la forma era prácticamente esférica e independiente de la composición del copolímero. La Figura 3.3 muestra algunas imágenes representativas de las NP de cada composición. Las nanopartículas también fueron examinadas por AFM confirmándose la morfología esférica.

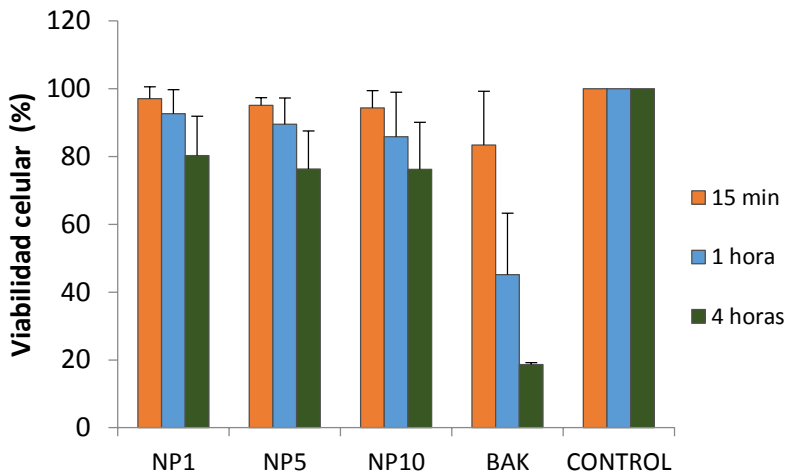
El promedio de potencial zeta medido a 25°C fue de  $-34,8 \pm 0,1$ ,  $-30,2 \pm 0,9$  y  $-28,8 \pm 0,2$  mV para NP1, NP5 y NP10 respectivamente. A medida que aumenta la proporción de HEMA, se va neutralizando la carga negativa del Bayfit-MA. Los fármacos con carácter básico serían los más adecuados para su incorporación en las nanopartículas por las atracciones electrostáticas que se pueden generar.

### 3.3.2.2 ESTUDIOS DE TOLERANCIA EN CULTIVOS CELULARES

Estos ensayos permitieron estimar la tolerancia de las nanopartículas y poder seleccionar un copolímero que inicialmente fuese bien tolerado a nivel ocular. En las Figuras 3.4 y 3.5 se recogen los valores de viabilidad celular obtenidos en las líneas de córnea y conjuntiva respectivamente.



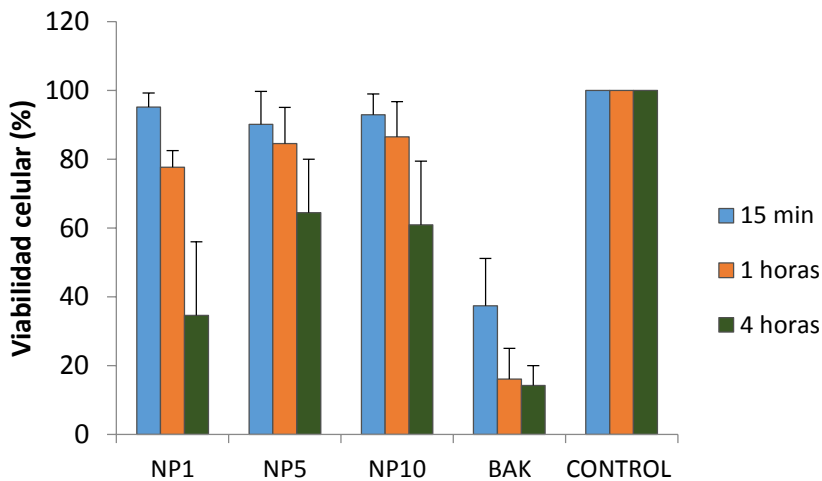
**Figura 3.4.** Resultados de viabilidad celular (+DE) obtenidos en la línea celular HCLE con las nanopartículas blanco: NP1, NP5 y NP10. Control positivo: cloruro de benzalconio al 0,005% (BAK).



**Figura 3.5.** Resultados de viabilidad celular (+DE) obtenidos en la línea celular IOBA-NHC con las nanopartículas blanco: NP1, NP5 y NP10. Control positivo: cloruro de benzalconio al 0,005% (BAK).

En ambas líneas celulares se obtuvieron valores de viabilidad celular no inferiores al 80% ( $p > 0,05$ ) para todas las NP ensayadas y para los tres tiempos de contacto. Por tanto, de acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009<sup>35</sup> las dispersiones NP1, NP5 y NP10 presentan buena viabilidad celular.

En cualquier caso, las nanopartículas NP5 y NP10 fueron las mejor toleradas en las líneas celulares de tejidos oculares. Los mismos resultados se obtienen en la línea celular de macrófagos (Figura 3.6). Esta línea es la que se utiliza habitualmente en los ensayos de citotoxicidad de materiales por su alta sensibilidad.



**Figura 3.6.** Resultados de viabilidad celular (+DE) obtenidos en la línea celular de macrófagos de ratón con las nanopartículas blanco: NP1, NP5 y NP10. Control positivo: cloruro de benzalconio al 0,005% (BAK).

---

<sup>35</sup> ISO10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity 2009

En este caso, la viabilidad celular resultó no inferior al 100% a los 15 minutos de contacto ( $p > 0,05$ ) y no inferior al 80% ( $p > 0,05$ ) después de 1 hora de incubación para todas las dispersiones estudiadas. Esto indica una buena biocompatibilidad de los materiales a tiempos de exposición corto e intermedio. A tiempos de exposición largos (4 horas), la dispersión NP1 muestra una viabilidad baja ( $35 \pm 21\%$ ) incluso inferior al 60%, lo que indica un efecto citotóxico importante.

### 3.3.2.3 ESTUDIO DE TOLERANCIA *IN VIVO*

Antes de comenzar el ensayo de tolerancia *in vivo* con la formulación de nanopartículas blanco, se realizó un estudio macroscópico de la superficie ocular de los conejos para confirmar que no sufrían daño o alteraciones en la misma. En el análisis previo se observó que todos los animales ( $n=6$ ) mostraron una superficie ocular normal y se les asignó un valor inicial de cero para todos los parámetros estudiados.

Las administraciones de las dispersiones se realizaron de acuerdo al protocolo indicado en materiales y métodos.

Los conejos no mostraron signos de molestias durante el ensayo, ni a las 24 horas después de haber comenzado el mismo. La córnea se mantuvo transparente a lo largo del ensayo y la conjuntiva mantuvo su coloración normal. Ningún animal presentó secreción mucosa durante las 24 horas de la realización del estudio (Tabla 3.6).

SINTOMA	RESULTADO DEL ENSAYO
DISCONFORT	No hay reacción (Grado 0)
CÓRNEA	No se presentan alteraciones (Grado 0)
CONJUNTIVA	No se presentan alteraciones (Grado 0)
SECRECIONES	No hay presencia de secreciones (Grado 0)
PÁRPADOS	No hay inflamación (Grado 0)

**Tabla 3.6.** Evaluación macroscópica de los signos y síntomas en el estudio de tolerancia *in vivo* para las dispersiones de nanopartículas blanco NP5 y NP10.

Estos resultados demuestran la buena tolerancia *in vivo* de las nanopartículas blanco ensayadas sobre la superficie ocular.

Teniendo en cuenta los resultados de tolerancia *in vitro* e *in vivo* se seleccionó el copolímero HEMA-Bayfit-MA de composición 5:95 para la preparación de las nanopartículas con principio activo.

### 3.3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON ACZ

Una vez seleccionado el copolímero más adecuado para la utilización *in vivo* (HEMA-Bayfit-MA, 5:95) se prepararon las nanopartículas cargadas con el principio activo (NP5-ACZ). El rendimiento del proceso determinado gravimétricamente fue del  $71,8 \pm 4,8$  %.

La dispersión NP5-ACZ fue isotonizada con una solución acuosa de propilenglicol (PPG) al 20%. Los datos de osmolaridad obtenidos en los ensayos realizados se recogen en la Tabla 3.7.

Nanosistemas	Osmolaridad $\pm$ DE (mOsm/L)
NP5-ACZ	8,1 $\pm$ 1,2
NP5-ACZ con un 1% de solución de PPG (20%)	147,1 $\pm$ 1,4
NP5-ACZ con un 2% de solución de PPG (20%)	292,3 $\pm$ 1,5

**Tabla 3.7.** Resultados de osmolaridad de los sistemas nanoparticulares con acetazolamida.

Se seleccionó el nanosistema que contenía un 2% de la solución de PPG con una osmolaridad de 292,3 mOsm/L valor que se encuentra dentro del intervalo tolerado por el humano<sup>36</sup>. El pH inicial del nanosistema fue de 5,6, neutralizándose hasta pH 7 con una solución de NaOH 1M para evitar posibles efectos adversos en su administración tópica ocular<sup>37</sup>. El volumen necesario para la neutralización del nanosistema se considera despreciable con respecto a un posible aumento de la osmolaridad. Con esta dispersión isotonizada y neutralizada (FOR-ACZ) se realizaron los ensayos de caracterización fisicoquímica y los ensayos en animales de experimentación.

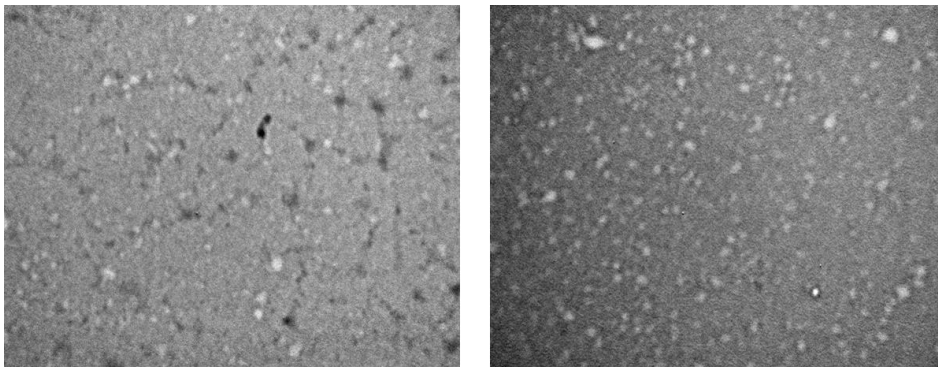
---

<sup>36</sup> Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: Determination of a referent for dry eye diagnosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:4039-4315.

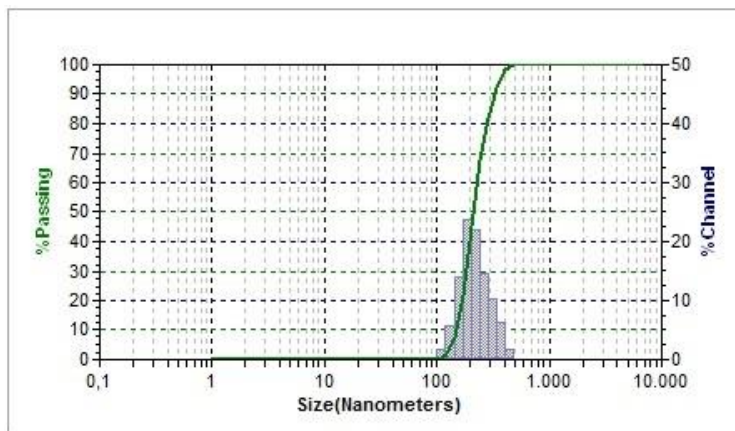
<sup>37</sup> Carney LG, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;Apr;30:747-54.

La concentración de fármaco en la formulación FOR-ACZ fue de  $0,77 \pm 0,05$  mg/mL. La concentración de nanopartículas estimada gravimétricamente fue de  $0,60 \pm 0,09$  mg/mL.

En la caracterización morfológica de las nanopartículas con acetazolamida se puede observar que se mantiene la forma esférica, como en el caso de las partículas blanco (Figura 3.7). Así mismo en la determinación del tamaño, se sigue manifestando una distribución unimodal (Figura 3.8), pero con un valor promedio de diámetro mayor,  $240 \pm 11$  nm frente a  $137,0 \pm 0,8$  nm. Es previsible que la incorporación del principio activo entre las cadenas poliméricas conlleve un aumento del tamaño de las estructuras nanométricas.



**Figura 3.7.** *Micrografía electrónica de barrido correspondiente a la formulación de ACZ.*



**Figura 3.8.** Distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas de la formulación FOR-ACZ.

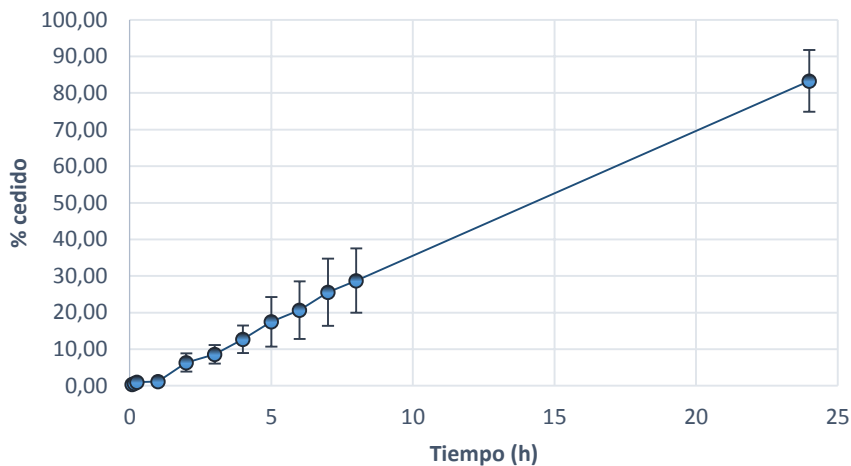
El potencial zeta promedio fue de  $-17,24 \pm 0,38$  mV, valor inferior al de las partículas NP5 ( $-30,2 \pm 0,9$  mV). Parte de la carga inicial de las nanopartículas es neutralizada por el carácter básico de la acetazolamida.

### 3.3.4 ESTUDIO DE CESIÓN *IN VITRO* DE LA FORMULACIÓN DE ACETAZOLAMIDA (FOR-ACZ)

Como se indicó anteriormente este ensayo de cesión se ha realizado utilizando un dispositivo de diálisis a 33°C en PBS (pH 7,4).

Los resultados medios obtenidos a los diferentes tiempos de ensayo se recogen en la Figura 3.9. La liberación responde a una cinética de orden cero a partir de la muestra correspondiente a 1 hora de ensayo. Para calcular la constante de velocidad de liberación se ha utilizado los datos experimentales entre 1 y 8 horas. De esta forma, se obtiene un valor de velocidad de cesión de 22,4 µg/h y un periodo de latencia (tiempo necesario para establecerse la cinética de

orden cero) de 40 min. Durante todo el ensayo se mantienen las condiciones *sink*. En el ajuste se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,99.



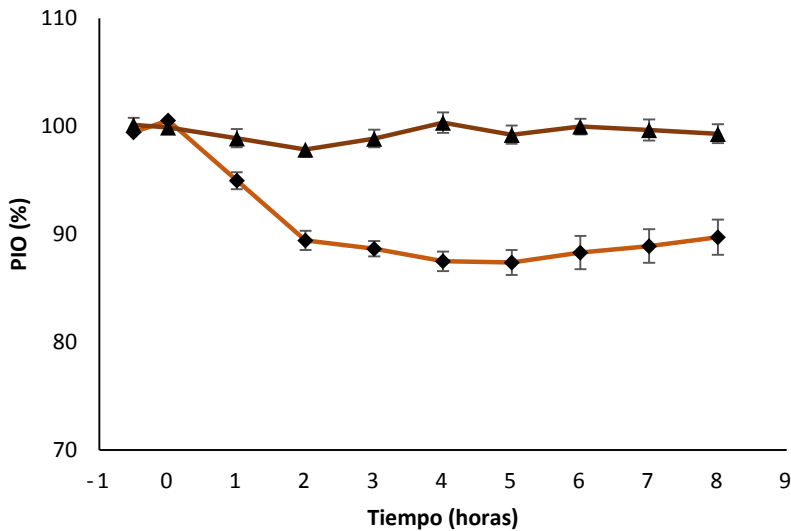
**Figura 3.9.** Porcentaje de acetazolamida cedido ( $\pm$  DE) a los diferentes tiempos de ensayo obtenidos con la formulación FOR-ACZ.

Aunque desde el punto de vista *in vivo* no tiene interés el muestreo a las 24 horas de ensayo, desde el punto de vista *in vitro* nos permite confirmar el mantenimiento de la cinética hasta porcentajes próximos al agotamiento del fármaco.

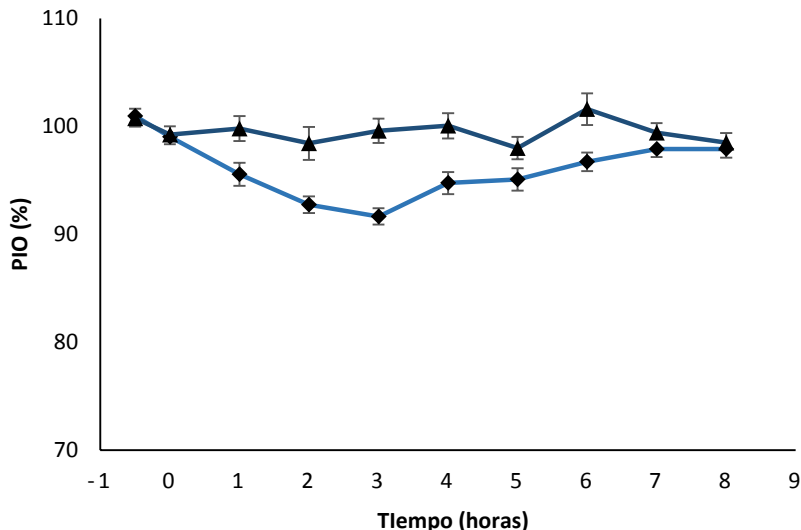
A las 8 horas de ensayo se ha liberado el  $28,8 \pm 8,8\%$  de la cantidad total y a las 24 horas el  $83,3 \pm 8,4\%$ .

### 3.3.5 ESTUDIO DE ACTIVIDAD HIPOTENSORA DE LA FORMULACIÓN DE ACETAZOLAMIDA (FOR-ACZ)

En las Figuras 3.10 y 3.11 se representan las presiones intraoculares (PIO) obtenidas con la formulación de nanopartículas FOR-ACZ y una solución de acetazolamida en PBS que contenía la misma concentración en principio activo. En ambas figuras también se representan los resultados correspondientes a los controles o placebos: dispersión de nanopartículas blanco y PBS, respectivamente.



**Figura 3.10.** Presiones intraoculares (%) obtenidas tras la administración de la FOR-ACZ (◆) y de la dispersión de nanopartículas blanco (▲) (utilizada como control o placebo). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.



**Figura 3.11.** Presiones intraoculares (%) obtenidas tras la administración de la solución de ACZ (◆) en PBS y de PBS (▲) (utilizado como control o placebo). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.

Como se puede observar, tanto la FOR-ACZ como la solución acuosa de ACZ redujeron la PIO, aunque ya las representaciones gráficas muestran que la intensidad de la actividad es distinta.

Para evaluar la actividad hipotensora de cada formulación se utilizó la reducción de la presión intraocular ( $\Delta$ PIO). A partir de estos datos se calculó el área bajo la curva  $\Delta$ PIO-tiempo ( $AUC_0^{8h}$ , %-hora) utilizando la regla trapezoidal. También se valoró el descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta$ PIO<sub>max</sub>).

En la Tabla 3.8 se indican los valores promedios de  $AUC_0^{8h}$  obtenido en las diferentes situaciones ensayadas.

PREPARADO ADMINISTRADO	AUC <sub>0</sub> <sup>8h</sup> (%·h)	LÍMITES DE CONFIANZA 95%
Formulación FOR-ACZ	79,8	66,3 – 93,3
Solución de ACZ en PBS	39,2	30,7 – 47,7
Dispersión nanopartículas blanco	5,7	(-6,6) – 17,8
PBS	4,2	(-6,5) – 14,9

**Tabla 3.8.** Valores promedios de área bajo la curva  $\Delta$ PIO-tiempo obtenidos en las diferentes situaciones ensayadas.

Como era de esperar los valores de AUC<sub>0</sub><sup>8h</sup> de los preparados utilizados como control no difieren significativamente de cero. También se puede observar que existen diferencias significativas entre la formulación FOR-ACZ y la solución de ACZ en PBS (contraste de medidas,  $p < 0,001$ ).

Se calculó la diferencia entre las áreas bajo las curvas de los tratamientos:

$$AUC_0^{8h} (FOR - ACZ) - AUC_0^{8h} (ACZ \text{ en PBS})$$

y sus límites de confianza para un 95% obteniéndose un valor de 40,6 %·h con límites entre 27,7 y 53,5 %·h (95% de confianza). Este intervalo no contiene el cero por lo que se puede aceptar la superioridad de la formulación FOR-ACZ frente a la solución de ACZ<sup>38</sup>.

Respecto al descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta$ PIO<sub>max</sub>) también se encuentran diferencias significativas (contraste de medias,  $p < 0,001$ ). En la Tabla 3.9 se recogen estos resultados para las dos formulaciones ensayadas.

<sup>38</sup> Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Points to consider on switching between superiority and non-inferiority. the European agency for the evaluation of medicinal products (EMA); [updated 2000 Jul 27; cited 2017 feb 23]

PREPARADO ADMINISTRADO	$\Delta PIO_{max}$ (%)	LÍMITES DE CONFIANZA 95%
Formulación FOR-ACZ	16,4	14,1 – 18,7
Solución de ACZ en PBS	9,6	8,0 – 11,2

**Tabla 3.9.** Valores promedios de descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta PIO_{max}$ ) obtenidos en los preparados ensayados.

La diferencia entre los valores de descenso máximo de la formulación FOR-ACZ y de la solución es de 6,9%, con límites de confianza para el 95% entre 4,6 y 9,1%. Este parámetro también confirma la superioridad de la formulación FOR-ACZ al no incluir el valor 0.

Además tal y como se observa en la Figura 3.10, para las nanopartículas cargadas con ACZ (FOR-ACZ), la actividad hipotensora promedio se mantuvo hasta el final del estudio (8 horas, LC ( $\alpha=0,05$ ): 85,9 – 93,5%) frente al de la solución de ACZ (Figura 3.11) que ya a las 7 horas el descenso máximo de PIO es inferior al 4% (LC de PIO ( $\alpha=0,05$ ): 96,1 – 99,2%).

Como la biodisponibilidad representa la cantidad de fármaco que es capaz de llegar al lugar de acción, y esta condiciona la actividad hipotensora, podemos establecer una biodisponibilidad relativa (BR) comparando las AUCs de FOR-ACZ y de ACZ en PBS (FOR-ACZ:ACZ en PBS). De esta forma la BR calculada a partir de los datos promedio es de 2. Este valor sirve como una aproximación del aumento de la biodisponibilidad que se consigue al incluir la ACZ en las nanopartículas.

### **3.4 BIBLIOGRAFÍA**

Adibkia K, Barzegar-Jalali M, Nokhodchi A, Siahi Shadbad MR, Omid Y, Javadzadeh Y, et al. A review on the methods of preparation of pharmaceutical nanoparticles. *Pharmaceutical Sciences*. 2009;15(4):303-14.

Aguayo Bonniard A, Yeung JY, Chan CC, Birt CM. Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK). *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016 Jul 18:1-11.

Andrés-Guerrero V, Molina-Martínez IT, Peral A, de las Heras B, Pintor J, Herrero-Vanrell R. The Use of Mucoadhesive Polymers to Enhance the Hypotensive Effect of a Melatonin Analogue, 5-MCA-NAT, in Rabbit Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Mar 18;52(3):1507-15.

Arriola-Villalobos P, Martínez-de-la-Casa JM, Díaz-Valle D, Morales-Fernandez L, Fernández-Perez C, García-Feijoo J. Glaukos iStent inject® Trabecular Micro-Bypass Implantation Associated with Cataract Surgery in Patients with Coexisting Cataract and Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension: A Long-Term Study. *Journal of Ophthalmology*. 2016;2016: 1056573.

Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative study of in vitro ocular surface cytotoxicity of a fixed combination of 0.5% timolol/1% dorzolamide eyedrop and its components with 0.005% benzalkonium chloride. *Biocontrol Sci*. 2012;17(3):115-20.

Bravo-Osuna I, Vicario-de-la-Torre M, Andrés-Guerrero V, Sánchez-Nieves J, Guzmán-Navarro M, de la Mata FJ, Gómez R, de las Heras B, Argüeso P, Ponchel G, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Novel Water-Soluble Mucoadhesive Carbosilane Dendrimers for Ocular Administration. *Mol. Pharmaceutics* 2016;13: 2966–2976.

Chaurasia SS, Lim RR, Lakshminarayanan R, Mohan RR. Nanomedicine approaches for corneal diseases. *J Funct Biomater*. 2015 Apr 30;6(2):277-98.

De-las-Heras B, Abad MJ, Silván AM, Pascual R, Bermejo P, Rodríguez B, Villar AM. Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sciences*. 2001;70(3):269-78.

Diebold Y, Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010;29(6):596-609.

Diebold Y, Calonge M, Enríquez de Salamanca A Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Visl Sci*. 2003;44:4263–4274.

Enriquez-de-Salamanca A, Calonge M, García-Vazquez C, Callejo-Vila A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular Surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Apr;47(4):1416-25.

Carney LG, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;Apr;30:747-54.

Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Points to consider on switching between superiority and non-inferiority. the European agency for the evaluation of medicinal products (EMA); [updated 2000 Jul 27; cited 2017 feb 23]

Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, de Vincentiis M. Emerging Concepts in Glaucoma and Review of the Literature. *Am J Med*. 2016 Sep;129(9):1000.e7-1000.e13.

Ibrahim MM, Abd-Elgawad AH, Soliman OA, Jablonski MM. Natural Bioadhesive Biodegradable Nanoparticle-Based Topical Ophthalmic Formulations for Management of Glaucoma. *Transl Vis Sci Technol.* 2015 Jun 30;4(3):12.

ISO10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity 2009.

Jeon HJ, Jeong YI, Jang MK, Park YH, Nah JW. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *Int J Pharm.* 2000 Oct 10;207(1-2):99-108.

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002 Nov 6;248(1-2):1-14.

Lehmann B, Linner E, Wistrand PJ. The pharmacokinetics of acetazolamide in relation to its use in the treatment to glaucoma and to its effects as an inhibitor of carbonic anhydrases. *Adv Biosci.* 1969;5;197-217.

Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for Ocular Drug Delivery. *Macromol Biosci.* 2012 May;12(5):608-20.

Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry.* 1997;69(2):581-93.

Ma D, Chen CB, Liang J, Lu Z, Chen H, Zhang M. Repeatability, reproducibility and agreement of intraocular pressure measurement in rabbits by the TonoVet and Tono-Pen. *Sci Rep.* 2016 Oct 12;6:35187.

Millar JC, Pang IH. Non-continuous measurement of intraocular pressure in laboratory animals. *Exp Eye Res.* 2015 Dec;141:74-90.

Organization for Economic Co-operation and Development. Test guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Available on-line at <http://www.oecd.org/2002> [7 jul 2016].

Parra FJ, Rodríguez-Alonso L, Marinich J, Herrero-Vanrell R, Fernández-Gutiérrez M, Vázquez B, Román JS. Random co-polymers based on the poloxamer Bayfit® 10WF15 for biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2011;22(14):1895-916.

Parra FJ, Román JS, Rodríguez-Alonso L, Herrero-Vanrell, Vázquez B, inventors; CSIC, UCM, assignee. Hidrogeles basados en poloxámeros con estructura de estrella para liberación controlada de sustancias activas. Spanish patent ES 2352634. 2011 february 22. Spanish.

Patel A, Patel M, Yang X, Mitra AK. Recent advances in protein and Peptide drug delivery: a special emphasis on polymeric nanoparticles. *Protein Pept Lett.* 2014;21(11):1102-20.

Pellinen P Huhtala A Tolonen A Lökkilä J Maenpää J Uusitalo H. The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium in vitro and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues in vivo. *Curr Eye Res.* 2012;37:145–154.

Phatak NR, Stankowska DL, Krishnamoorthy RR. Bcl-2, Bcl-xL, and p-AKT are involved in neuroprotective effects of transcription factor Brn3b in an ocular hypertension rat model of glaucoma. *Mol Vis.* 2016;22:1048–1061.

Pisal PB, Joshi MA, Padamwar MN, Patil SS, Pokharkar VB. Probing influence of methodological variation on active loading of acetazolamide into nanoliposomes: Biophysical, in vitro, ex vivo, in vivo and rheological investigation. *Int J Pharm.* 2014 Jan 30;461(1-2):82-88.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 1988;48(17):4827-33.

Seibold LK Ammar DA Kahook MY. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity in vitro. *Curr Eye Res*. 2012;38:70-74.

Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: Determination of a referent for dry eye diagnosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:4039-4315.

Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

www.arvo.org[internet] EEUU; ARVO. [actualizado 2016; citado 10 feb 2017]. Disponible en: [http://www.arvo.org/about\\_arvo/policies/statement\\_for\\_the\\_use\\_of\\_animals\\_in\\_opthalmic\\_and\\_visual\\_research/](http://www.arvo.org/about_arvo/policies/statement_for_the_use_of_animals_in_opthalmic_and_visual_research/)

**4. CAPÍTULO 2: DESARROLLO Y  
CARACTERIZACIÓN DE UNA  
FORMULACIÓN LIPOSOMAL  
CON ACETAZOLAMIDA**



## **4.1 INTRODUCCIÓN**

El glaucoma está considerada la segunda causa de ceguera en el mundo después de las cataratas y la principal causa de ceguera irreversible. Recientes estudios afirman que en 2013 la prevalencia global de la enfermedad fue de 3,54% en personas con un rango de edad situado entre los 40 y 80 años, siendo la estimación de 63,4 millones de individuos afectados por la enfermedad. Se prevé que este número aumente a 76,0 y 111,8 millones en 2020 y 2040, respectivamente<sup>1 2</sup>. Uno de los principales factores de riesgo en el glaucoma es la presión intraocular (PIO) elevada. Por esta razón, la mayoría de las investigaciones para el tratamiento del glaucoma van dirigidas a controlar este parámetro, ya sea con terapia farmacológica o quirúrgica<sup>3</sup>. En las últimas décadas, el tratamiento frente al glaucoma ha evolucionado desde moduladores de la PIO (pilocarpina y timolol) hasta nuevas terapias

---

<sup>1</sup> Tham YC, Li X, Wong TY, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040 a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014;121:2081–90.

<sup>2</sup> WHO Global initiative for the elimination of avoidable blindness 2000. WHO/PBL/97.61 Rev.2.

<sup>3</sup> Maier PC, Funk J, Schwarzer G, Antes G, Falck-Ytter YT: Treatment of ocular hypertension and open angle glaucoma: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2005;331:134.

emergentes<sup>4</sup>. En el caso de los tratamientos que tienen como objetivo el control de la PIO, existen limitaciones en las que se incluyen efectos adversos importantes, una proporción significativa de pacientes no-respondedores y la necesidad de terapias combinadas para poder alcanzar y controlar la PIO objetivo<sup>5</sup>.

Por su parte, el síndrome de ojo seco (SOS) es una enfermedad ocular presente en el 14-33% de la población mundial. Se considera una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular (SO) que origina inestabilidad de la película lagrimal y se acompaña de un aumento de osmolaridad de la lagrime e inflamación de la SO<sup>6</sup>. Aunque, en general, no se considera una enfermedad grave, sí disminuye la calidad de vida del paciente, su estado de salud y bienestar ya que, además de dolor e irritación ocular, produce alteración de la función visual. La aparición de ojo seco está ligada a la alteración de la película lagrimal que favorece la evaporación del agua de la lagrime<sup>7</sup>.

Los tratamientos antiglaucomatosos a largo plazo con instilaciones diarias se asocian con alteraciones de la SO, bien porque el paciente ya padezca un cuadro de SOS cuando se somete a tratamiento con hipotensores o bien por aparición de ojo seco durante el tratamiento. Aunque los efectos adversos se han asociado fundamentalmente con la presencia de conservantes en las formulaciones oftálmicas, la ausencia de los mismos no evita el daño en la

---

<sup>4</sup> 4. Wentz SM, Kim NJ, Wang J, Amireskandari A, Siesky B, Harris A: Novel therapies for open-angle glaucoma. *F1000Prime Re.* 2014;6:102.

<sup>5</sup> Reardon G, Kotak S, Schwartz GF: Objective assessment of compliance and persistence among patients treated for glaucoma and ocular hypertension: a systematic review. *Patient Prefer Adherence.* 2011;5:441-463.

<sup>6</sup> Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Work Shop. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. *The Ocular Surface* 2007;5:2.

<sup>7</sup> Moss SE, Klein R, Klein BEK. Long-term incidence of Dry Eye in an older population. *Optometry & Vision Science.* 2008;85:668-674.

superficie ocular. Por estas razones, la innovación de las formulaciones de agentes antiglaucomatosos resulta de gran interés.

La nueva formulación propuesta en este trabajo incluye en su composición excipientes capaces de proteger la superficie del ojo (osmoprotectores, antioxidantes y fosfolípidos). Se trata de una formulación híbrida de un agente hipotensor en un vehículo que contiene componentes que preservan la integridad de la superficie ocular.

La acetazolamida (ACZ) se utiliza por vía oral para la reducción de la PIO en pacientes que sufren glaucoma. También se emplea en el tratamiento prequirúrgico del glaucoma de ángulo cerrado o como tratamiento complementario en el glaucoma de ángulo abierto<sup>8 9 10 11</sup>. De acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), la acetazolamida es un fármaco de clase IV (baja solubilidad y baja permeabilidad) por lo que su administración tópica ocular no es efectiva<sup>12 13 14</sup>. Actualmente se están investigando diferentes formulaciones para encapsular la acetazolamida (liposomas, niosomas y

---

<sup>8</sup> Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002;248:1–14.

<sup>9</sup> Sabri K, Levin AV. The additive effect of topical dorzolamide and systemic acetazolamide in pediatric glaucoma. *J Am Assoc Ped Ophth Strab.* 2006;10:464–8.

<sup>10</sup> Costa VP, Braga MEM, Duarte CMM, et al. Anti-glaucoma drug-loaded contact lenses prepared using supercritical solvent impregnation. *J Supercrit Fluids.* 2010;53:165–73.

<sup>11</sup> Sharan S, Dupuis A, Hebert D, Levin AV. The effect of oral acetazolamide on weight gain in children. *Can J Ophthalmol.* 2010;45: 41–5.

<sup>12</sup> Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58:265–78.

<sup>13</sup> Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Azimi M, Valizadeh H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;73:102–6.

<sup>14</sup> Mora MJ, Longhi MR, Granero GE. Synthesis and characterization of binary and ternary complexes of diclofenac with a methylb-CD and monoethanolamine and in vitro transdermal evaluation. *Eur J Med Chem* 2010;45:4079–88.

ciclodextrinas entre otras) para aumentar su biodisponibilidad tópica ocular<sup>15 16</sup>  
<sup>17 18</sup>. Estos nanosistemas favorecen su penetración a nivel ocular y por tanto su  
biodisponibilidad.

Los liposomas han sido investigados en la administración de fármacos  
oftálmicos desde 1980. Las primeras aplicaciones fueron para administración  
tópica ocular<sup>19</sup> e inyecciones intravítreas<sup>20</sup>. Desde entonces, estos sistemas han  
sido utilizados en un gran número de investigaciones debido a sus ventajas tales  
como una alta compatibilidad ocular, un aumento de la penetración corneal,  
tiempos de eliminación ocular más largos, falta de inmunogenicidad y baja  
toxicidad<sup>21</sup>. Además, la simplicidad de las formulaciones y la versatilidad de sus  
características físicas hacen que los liposomas sean sistemas adecuados para la  
administración ocular de fármacos<sup>22</sup>.

El propósito de este trabajo fue el desarrollo y caracterización (*in vitro* e *in vivo*)  
de una formulación liposomal de acetazolamida con el objetivo de mejorar su  
biodisponibilidad y por tanto su actividad hipotensora tras su administración

---

<sup>15</sup> Quinteros DA, Ferreira LM, Schaffazick SR, Palma SD, Allemandi DA, Cruz L. Novel Polymeric Nanoparticles Intended for Ophthalmic Administration of Acetazolamide. *J Pharm Sci.* 2016 Oct;105(10):3183-90

<sup>16</sup> Hathout RM, Mansour S, Mortada ND, Guinedi AS. Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. *AAPS PharmSciTech.* 2007 Jan 5;8(1):1

<sup>17</sup> Guinedi AS, Mortada ND, Mansour S, Hathout RM. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. *Int J Pharm.* 2005 Dec 8;306(1-2):71-82.

<sup>18</sup> Palma SD, Tartara LI, Quinteros D, Allemandi DA, Longhi MR, Granero GE. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP-ss-CD and TEA for topical ocular administration. *J Control Release.* 2009 Aug 19;138(1):24-31.

<sup>19</sup> Lee VH, Urrea PT, Smith RE, Schanzlin DJ. Ocular drug bioavailability from topically applied liposomes. *Surv. Ophthalmol.* 1985;29:335-348.

<sup>20</sup> Tremblay C, Barza M, Szoka F, Lahav M, Baum J. Reduced toxicity of liposome-associated amphotericin B injected intravitreally in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1985;26:711-718.

<sup>21</sup> Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ. Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2005 Mar-Apr;50(2):167-82.

<sup>22</sup> Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995;95:75-93.

tópica ocular, preservando, al mismo tiempo, la SO y la funcionalidad de la película precorneal.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 MATERIALES**

La fosfatidilcolina (FC) utilizada para la elaboración de los liposomas proviene de lecitina de soja. Se comercializa bajo la marca de Phospholipon 90G® y contiene una riqueza superior al 95% (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemania). La trehalosa y el eritritol se adquirieron a Cymit Química S.L. (Barcelona, España). La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) fue suministrada por Abarán Materias Primas (Madrid, España). El colesterol (Ch) y la vitamina E (Vit-E) se adquirió en Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, España). Se utilizó etanol absoluto de Panreac Química S.A. (Madrid, España). La acetazolamida (ACZ) se compró a Fagron Ibérica S.A.U (Barcelona, España). ). Se utilizaron conejos blancos machos de Nueva Zelanda de 3 a 4 kg suministrados por la Granja San Bernardo (Navarra, España).

#### 4.2.2 PREPARACIÓN DE LOS LIPOSOMAS CARGADOS CON ACZ

Los liposomas se prepararon de acuerdo con la técnica descrita por Bangham<sup>23</sup> y modificada por nuestro grupo de investigación<sup>24</sup>. Para esto, se disolvieron 15 mg de acetazolamida en etanol mediante agitación durante 24 horas. A continuación se añadió la FC, el Ch y la vitamina E. La proporción de componentes FC:Ch:Vit-E:ACZ en la solución orgánica fue de 8:1:0,08:0,3 respectivamente. El disolvente se evaporó a presión reducida (50 mbar) en un rotavapor (Buchi R-205, Massó Analítica S.A., España) a 33°C. En este proceso (90 min), dentro del matraz, se forma una fina película lipídica que posteriormente se dispersa con una solución acuosa de boratos, trehalosa y eritritol.

La composición de la solución acuosa utilizada (vehículo base, VB) para la dispersión ha sido la siguiente: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 8,38‰, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> al 0,755‰, trehalosa al 29,8‰ y eritritol al 6,1‰.

La dispersión se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir la imbibición completa de la película de lípidos. A continuación, la dispersión de liposomas fue sometida a sonicación en un baño de ultrasonidos (Ultrasons-H, Madrid, España) durante 15 minutos para facilitar la dispersión del sistema. Para homogenizar el tamaño y la estructura de las vesículas formadas, los liposomas se sometieron a un proceso de extrusión, pasando la formulación 10 veces por una membrana de tamaño de poro de 0,8 µm (Nucleopore Lipex Biomembrane, Vancouver, Canadá) y 10 veces por otra

---

<sup>23</sup> Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 1965:238-252.

<sup>24</sup> Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ . Esta dispersión se dejó en reposo durante 24 h a una temperatura de 2-8 °C. Las formulaciones finales se prepararon por dilución 1:2 con las correspondientes soluciones. Para la formulación liposomal de ACZ (L-ACZ) la dilución se realizó con el vehículo base (VB) y para la formulación liposomal que además contiene polímero (L-ACZ-P) con una solución de HPMC al 0,6% en el vehículo base.

Para asegurar la esterilidad, la preparación se realizó en condiciones asépticas. Las soluciones acuosas de vehículo base y de polímero se esterilizan por calor húmedo en autoclave (Autester ST DRY PV-III 25, J. P. Selecta. Barcelona, España). En todos los casos, las formulaciones finales se filtraron a través de membranas con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (filtro de jeringa Minisart, Sartorius Spain S.A. Madrid, España).

### **4.2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS CARGADOS CON ACZ**

#### **4.2.3.1 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LAS VESÍCULAS LIPÍDICAS**

El tamaño de los liposomas cargados con acetazolamida se evaluó por la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (Zetatrac: Microtrac-Europe GmbH, Meerbusch, Alemania). Esta técnica analiza la dependencia de las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada con el tiempo, cuando un haz de luz monocromático procedente de un láser incide sobre las partículas. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente (25°C) y al menos por triplicado.

#### 4.2.3.2 DETERMINACIÓN DEL pH DE LOS PREPARADOS

El pH se determinó a temperatura ambiente utilizando un pHmetro (Mettler GLP22, CRISON, Barcelona, España) calibrado previamente con soluciones tamponadas a pHs 4 y 7.

#### 4.2.3.3 DETERMINACIÓN DE LA OSMOLARIDAD DE LAS FORMULACIONES

La osmolaridad se realizó mediante medidas de presión de vapor con un osmómetro de vapor Knauer k-7000 (Knauer GmbH, Berlín, Alemania) a 33°C, temperatura de la superficie ocular<sup>25</sup>. La medida se basa en las temperaturas registradas por dos termo-resistencias donde se añaden gotas de la disolución estudiada y del disolvente puro. Al ser la presión de vapor de la disolución menor que la del disolvente, se genera una diferencia de temperatura entre ambas termo-resistencias que es proporcional a la concentración de soluto en la muestra ensayada. Como referencia se ha utilizado una solución estándar de cloruro de sodio de 400 mOsm/L de concentración.

#### 4.2.3.4 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD DE LAS FORMULACIONES

La viscosidad se evaluó con un reómetro (Rheostress R1, Haake, Alemania) usando un sistema de placas paralelas (60 mm de diámetro y 0,5 mm de separación). Las velocidades de cizallamiento se incrementaron gradualmente

---

<sup>25</sup> Akhter S, Anwar M, Siddiqui MA, Ahmad I, Ahmad J, Ahmad MZ, Bhatnagar A, Ahmad FJ. Improving the topical ocular pharmacokinetics of an immunosuppressant agent with mucoadhesive nanoemulsions: Formulation development, in-vitro and in-vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;148:19–29.

de 0 a 1000 s<sup>-1</sup> en 20 pasos. En cada una de las etapas se determina la viscosidad de la muestra una vez se ha alcanzado el estado de equilibrio correspondiente. La determinación se realizó a 33°C.

#### 4.2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL DE LAS FORMULACIONES

La tensión superficial se midió con un tensiómetro (K-11, Kruss, Hamburgo Alemania) utilizando el método de placa de Wilhelmy. Este método determina la fuerza mínima necesaria para desprender una placa rectangular de platino de la superficie del líquido en la que se encuentra parcialmente sumergida. Las condiciones utilizadas en las medidas son las siguientes: (i) la placa se sumerge a una profundidad de 3 mm en el líquido a ensayar, (ii) la placa se levanta con una fuerza equivalente al 90% de la necesaria para romper el menisco que se forma entre la placa y la superficie del líquido y (iii) la placa se sumerge y se eleva, hasta que con las últimas 10 medidas se logra una desviación estándar igual o inferior a 0,5%.

Los ensayos se realizan a 33°C y por triplicado.

El equipo se verifica midiendo por triplicado la tensión superficial del agua purificada. El valor promedio obtenido debe hallarse entre 68 – 72 mN/m y los valores individuales no deben oscilar en un intervalo superior a 2 unidades.

#### 4.2.3.6 CONTENIDO EN ACETAZOLAMIDA

Se ha utilizado el HPLC como técnica de valoración del principio activo. Las condiciones y los parámetros de validación del método se han descrito en el

capítulo anterior. Para la cuantificación de la acetazolamida se procedió a la liofilización de la formulación liposomas (L-ACZ) y a su redisolución posterior en etanol.

#### **4.2.4 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR *IN VITRO***

Los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo en líneas celulares de macrófagos de ratón J774 y células HeLa. Estas líneas se encuentran dentro de las que habitualmente se utilizan para evaluar la toxicidad de nuevos preparados. Se trata de líneas de elevada sensibilidad<sup>26</sup>.

Los estudios de citotoxicidad se evaluaron mediante la reducción mitocondrial-dependiente de la sal de tetrazolio, bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio de color amarillo (MTT, Sigma-Aldrich, Madrid, España) a formazán (de color azul oscuro) por la enzima succinato deshidrogenasa<sup>27</sup>. Este método se ha detallado en el capítulo anterior.

Las condiciones del ensayo son las siguientes: 15.000 células/pocillo, 1 mL de medio por pocillo (proporción 1:1 entre el medio de cultivo y el preparado a ensayar) y 2 horas de tiempo de exposición (se simula tratamientos a largo plazo).

Como patrón (control negativo) se usaron las células con medio de cultivo. Como control positivo se utilizó una solución de cloruro de benzalconio al 0,005% en NaCl al 0,9% por su elevada toxicidad (alto estrés oxidativo,

---

<sup>26</sup> Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 1988;48(17):4827-33.

<sup>27</sup> Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;69(2):581-93.

apoptosis y muerte celular en la superficie corneal)<sup>28 29 30 31</sup> y como comparador no tóxico una solución de NaCl al 9%.

Se han realizado ensayos de viabilidad celular con las formulaciones que se van administrar en el ensayo de actividad hipotensora *in vivo* y además se ha evaluado la posible citotoxicidad del principio activo (ACZ en NaCl al 9%).

#### 4.2.5 ENSAYO DE TOLERANCIA *IN VIVO*

Se realizaron con la formulación liposomal de ACZ (L-ACZ-P) que incluye polímero. Cada conejo recibió 25 µL de las formulaciones a ensayar en el ojo derecho cada 30 min durante 6 horas. El ojo contralateral recibió el mismo volumen de solución salina (solución de NaCl al 0,9%) y se utilizó como control. A las tres, seis y veinticuatro horas después de la primera instilación se evaluaron macroscópicamente el malestar de los animales, los síntomas y signos en la conjuntiva, la córnea y las secreciones (Tabla 4.1) usando una modificación del sistema de puntuación establecido en las directrices de la

---

<sup>28</sup> Aguayo Bonniard A, Yeung JY, Chan CC, Birt CM. Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK). *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016 Jul 18:1-11.

<sup>29</sup> Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative study of *in vitro* ocular surface cytotoxicity of a fixed combination of 0.5% timolol/1% dorzolamide eyedrop and its components with 0.005% benzalkonium chloride. *Biocontrol Sci.* 2012;17(3):115-20.

<sup>30</sup> Pellinen P, Huhtala A, Tolonen A, Lökkilä J, Maenpää J, Uusitalo H. The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium *in vitro* and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues *in vivo*. *Curr Eye Res.* 2012;37:145–154.

<sup>31</sup> Seibold LK, Ammar DA, Kahook MY. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity *in vitro*. *Curr Eye Res.* 2012;38:70–74.

Organización de Cooperación y Desarrollo<sup>32</sup> del año 2002 y los protocolos descritos por Enriquez y col<sup>33</sup>.

Grado	Disconfort	Córnea	Conjuntiva	Secreción	Párpados
0	No reacción	No alteración	No alteración	No secreción	No inflamación
1	Parpadeo	Opacidad moderada	Hiperemia moderada; edema moderado.	Secreción leve sin pelo humedecido	Inflamación moderada
2	Parpadeo aumentado; lagrimeo intenso; vocalización	Opacidad intensa	Hiperemia intensa; edema intenso; hemorragia	Secreción intensas con pelo humedecido	Inflamación intensa

**Tabla 4.1.** Sistema de graduación de la evaluación macroscópica de los signos y síntomas para el estudio de tolerancia *in vivo*.

#### 4.2.6 MEDIDAS DE PRESIÓN INTRAOCULAR

Los experimentos se llevaron a cabo en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, de acuerdo con el protocolo autorizado por el Comité de Experimentación Animal de la UCM y por la Comunidad de Madrid (Ref PROEX 316/16).

<sup>32</sup> Organization for Economic Co-operation and Development. Test guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Available on-line at <http://www.oecd.org2002> [7 jul 2016].

<sup>33</sup> Enriquez de Salamanca A, Calonge M, García Vazquez C, Callejo vila A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular Surface: toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2006:1416-25.

Los animales utilizados en el ensayo fueron seis conejos de raza Nueva Zelanda, machos, normotensos, sin sedación y con aproximadamente un peso de  $3,5 \pm 0,5$  kg. Se mantuvieron en cajas individuales con alimentos y agua *ad libitum* bajo ciclos controlados de luz/obscuridad (12/12 horas) y en una sala con una temperatura y humedad controlada (22°C y 50% de humedad relativa). Los animales fueron manipulados siguiendo la declaración de ARVO (ARVO Statement for the use of Animals in Ophthalmology and Vision Research<sup>34</sup>) para el uso de animales en oftalmología e investigación de la visión y la normativa de la Comunidad Europea (EU Council Directive (86/609/EEC).

La presión intraocular (PIO) se midió con un tonómetro de rebote Tonovet (Tiolat, Helsinki, Finlandia). El ensayo fue realizado tras entrenamiento usando un conjunto de procedimientos definidos por el grupo de investigación para asegurar mediciones más precisas. Los conejos se mantuvieron en calma durante al menos 3 minutos antes de la medición de la PIO. En el caso de la presencia de cualquier signo de estrés, las mediciones de la PIO se pospusieron durante al menos otros 3 minutos<sup>35 36</sup>. Los ensayos comenzaron regularmente a las 10 de la mañana.

Se realizaron 2 medidas de PIO basales: 30 minutos antes e inmediatamente antes de la instilación de la formulación para fijar el valor de referencia (100%). Acto seguido se aplicó 25 µL de la correspondiente formulación a cada ojo del mismo conejo. Las mediciones de la PIO se realizaron cada hora en un periodo de 8 horas.

---

<sup>34</sup> [www.arvo.org](http://www.arvo.org)[internet] EEUU; ARVO. [actualizado 2016; citado 10 feb 2017]. Disponible en: [http://www.arvo.org/about\\_arvo/policies/statement\\_for\\_the\\_use\\_of\\_animals\\_in\\_ophthalmic\\_and\\_visual\\_research/](http://www.arvo.org/about_arvo/policies/statement_for_the_use_of_animals_in_ophthalmic_and_visual_research/)

<sup>35</sup> Millar JC, Pang IH. Non-continuous measurement of intraocular pressure in laboratory animals. *Experimental Eye Research* 2015;141:74-90.

<sup>36</sup> Ma D, Chen CB, Liang J, Lu Z, Chen H, Zhang M. Repeatability, reproducibility and agreement of intraocular pressure measurement in rabbits by the TonoVet and TonoPen. *Sci Rep.* 2016 Oct 12;6:35187.

Los estudios se llevaron a cabo en 2 etapas de acuerdo a diseños de ensayos cruzados en los que se evalúa como fuentes de variación: el animal, el periodo y el tratamiento. En la primera etapa se estudiaron 3 tratamientos en tres periodos consecutivos (diseño cuadrado latino 3X3) y en la segunda etapa 2 tratamientos (cuadrado latino 2x2) (Figuras 4.1 y 4.2). El tiempo mínimo de lavado entre tratamientos consecutivos fue de 48 horas.

Periodo de administración			
Grupo de animales	I	II	III
1	A	B	C
2	B	C	A
3	C	A	B

**Figura 4.1.** Diseño del estudio utilizado en la primera etapa del ensayo de actividad hipotensora. Tratamientos ensayados: A, B y C. Cada grupo incluye 2 animales de experimentación.

Periodo de administración		
Grupo de animales	I	II
1	A	B
2	B	A

**Figura 4.2.** Diseño del estudio utilizado en la segunda etapa del ensayo de actividad hipotensora. Tratamientos ensayados: A y B. Cada grupo incluye 3 animales de experimentación.

Entre las realización de las dos etapas del estudio transcurrió un periodo mínimo de 72 horas.

La actividad hipotensora de cada formulación fue evaluada en términos de reducción de la presión intraocular ( $\Delta$ PIO). Este dato fue calculado para cada ojo, fijando el 100% de PIO con dos lecturas basales tomadas 30 minutos antes e inmediatamente antes de la instilación de las formulaciones. A partir de estos datos se calculó el área bajo la curva  $\Delta$ PIO-tiempo (AUC, %-hora) utilizando la regla trapezoidal. También se valoró el descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta$ PIO<sub>max</sub>).

### **4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES DE ACETAZOLAMIDA**

Se han desarrollado dos formulaciones liposomales de acetazolamida. Se cuantificó la concentración del fármaco en la dispersión liposomal intermedia (1,4 mg/mL de acetazolamida). A partir de este preparado intermedio se elaboraron las formulaciones finales a ensayar (Tabla 4.2).

Preparado	Composición
L-ACZ	Acetazolamida (0,7 mg/mL) y liposomas (expresados en FC 20 mg/mL) en vehículo base
L-ACZ-P	Acetazolamida (0,7 mg/mL), liposomas (expresados en FC 20 mg/mL) y HPMC (0,3%) en vehículo base
Vehículo base (VB)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (8,38‰), Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> (0,755‰), trehalosa (29,8‰) y eritritol (6,1‰)

**Tabla 4.2.** Composición de las formulaciones liposomales elaboradas.

La primera, L-ACZ, corresponde a una formulación liposomal que incorpora trehalosa y eritritol como agentes osmoprotectores de la superficie ocular. La segunda supone una mejora de la primera al añadir un polímero bioadhesivo (L-ACZ-P) que aumenta el tiempo de permanencia<sup>37 38</sup> y potencia la protección de la superficie ocular por sus efectos antioxidantes y citoprotectores<sup>39</sup>.

En la Tabla 4.3 se recogen los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de ambas formulaciones.

<sup>37</sup> Andrés-Guerrero V, Vicario-de-la-Torre M, Molina-Martínez IT, Benítez-del-Castillo JM, García-Feijoo J, Herrero-Vanrell R. Comparison of the in vitro tolerance and in vivo efficacy of traditional timolol maleate eye drops versus new formulations with bioadhesive polymers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Jun 1;52(6):3548-56.

<sup>38</sup> Quinteros D, Vicario-de-la-Torre M, Andrés-Guerrero V, Palma S, Allemandi D, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Hybrid formulations of liposomes and bioadhesive polymers improve the hypotensive effect of the melatonin analogue 5-MCA-NAT in rabbit eyes. *PLoS One.* 2014 Oct 20;9(10):e110344.

<sup>39</sup> Ye J, Zhang H, Wu H, Wang C, Shi X, Xie J, He J, Yang J. Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012 Oct;250(10):1459-66.

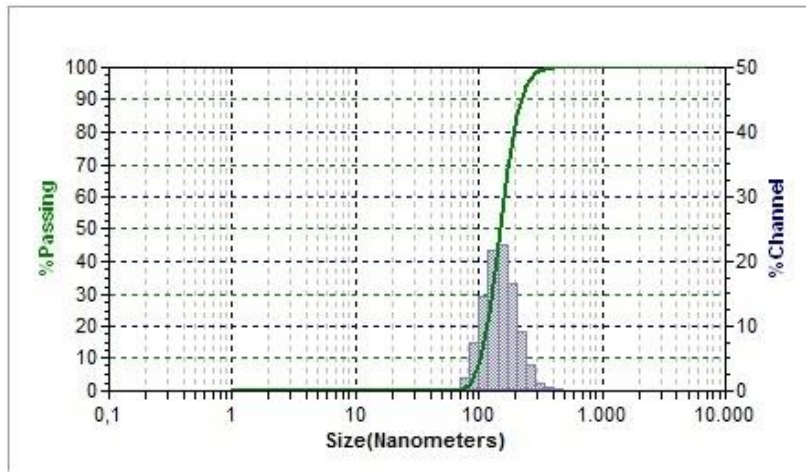
	L-ACZ	L-ACZ-P
Tamaño de las vesículas lipídicas (nm)	155,9 ± 4,9	160,9 ± 4,38
pH	6,5 ± 0,1	7,0 ± 0,1
Viscosidad (mPa·s)	0,88 ± 0,1	4,7 ± 0,1
Tensión superficial (mN/m)	30,6 ± 0,9	47,6 ± 0,5
Osmolaridad (mOsm/L)	297,7 ± 1,9	295,5 ± 1,5

**Tabla 4.3.** *Características fisicoquímicas de las formulaciones elaboradas.*

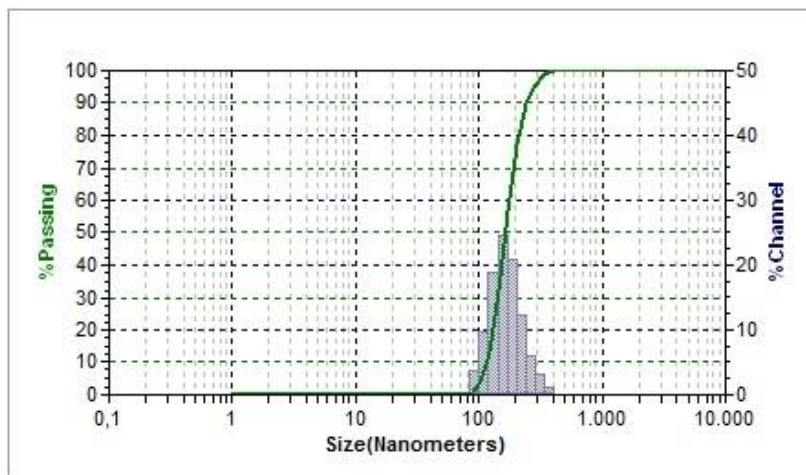
El análisis de tamaño de las vesículas lipídicas dispersas en las formulaciones elaboradas muestra distribuciones unimodales para ambos casos (Figuras 4.3 y 4.4) con valores de diámetro medio de volumen muy similares (Tabla 4.3). La adición de HPMC apenas modifica el tamaño de las vesículas lipídicas. En trabajos previos<sup>40 41</sup> realizados por el grupo de investigación con dispersiones de liposomas en hialuronato sódico (HNa) se observó que el tamaño de las vesículas aumentaba tras la adición del polímero. Este fenómeno apunta a una posible interacción entre el HNa y la superficie de la vesícula lipídica al actuar como coloide protector. Este proceso no parece tener lugar con la HPMC.

<sup>40</sup> Vicario-de-la-Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome del ojo seco [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

<sup>41</sup> Quinteros D, Vicario-de-la-Torre M, Andrés-Guerrero V, Palma S, Allemandi D, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Hybrid formulations of liposomes and bioadhesive polymers improve the hypotensive effect of the melatonin analogue 5-MCA-NAT in rabbit eyes. PLoS One. 2014 Oct 20;9(10):e110344.



**Figura 4.3.** Distribución de tamaño obtenida con la formulación L-ACZ.



**Figura 4.4.** Distribución de tamaño obtenida con la formulación L-ACZ-P.

Los valores de pH de las formulaciones liposomales (L-ACZ y L-ACZ-P) se recogen en la Tabla 4.3. El pH fisiológico de la lágrima natural se encuentra entre 7 y 7,4 manteniéndose este valor relativamente estable debido a su capacidad

tampón<sup>42</sup>. Esta capacidad tampón que se consigue principalmente con el sistema de bicarbonatos, la contribución de proteínas, de fosfatos, de amoniaco y de otros componentes, evita que las formulaciones con valores de pH entre 6,5 y 9,0, intervalo que incluye a estas formulaciones, evitando molestias en el momento de la aplicación<sup>43</sup>.

Se ha ajustado la osmolaridad de las formulaciones a valores próximos a 280 mOsm/L con el fin de obtener buenas tolerancias. Ambas formulaciones liposomales presentaron valores de osmolaridad dentro del rango de isotonicidad (280 – 300 mOsm/L)<sup>44</sup>.

En la evaluación reológica de las formulaciones elaboradas se manifiesta una relación lineal esfuerzo-velocidad de deformación lo que indica un comportamiento newtoniano (Figura 4.5 y 4.6). Los valores promedios de viscosidad obtenidos en ambas formulaciones se recogen la Tabla 4.3. Se puede observar que en la formulación L-ACZ la viscosidad es muy similar a la de agua (0,7 mPa·s) pero cuando se añade la HPMC aumenta ligeramente hasta 4,7 mPa·s. En cualquier caso, estos valores son similares a la viscosidad de la lagrима humana (0,3 a 8,3 mPa·s)<sup>45 46</sup>.

---

<sup>42</sup> Yamada M, Mochikuzi H, Hata Y, Mashima Y. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. *Current eye research* 1998;17:1005-1009.

<sup>43</sup> Carney LG, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:747-54.

<sup>44</sup> Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: Determination of a referent for dry eye diagnosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:4039-4315.

<sup>45</sup> Yamaguchi M Ueda K Isowaki A Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32: 1266–1271

<sup>46</sup> Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991; 15: 371–376

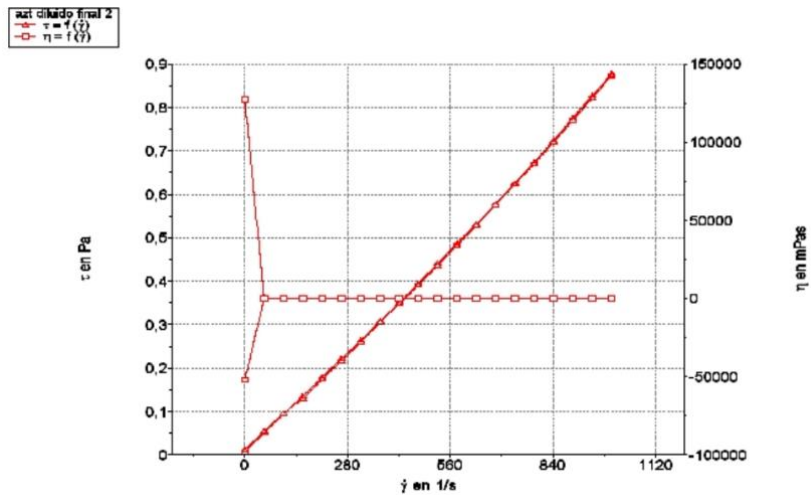


Figura 4.5. Reograma de la formulación liposomal L-ACZ.

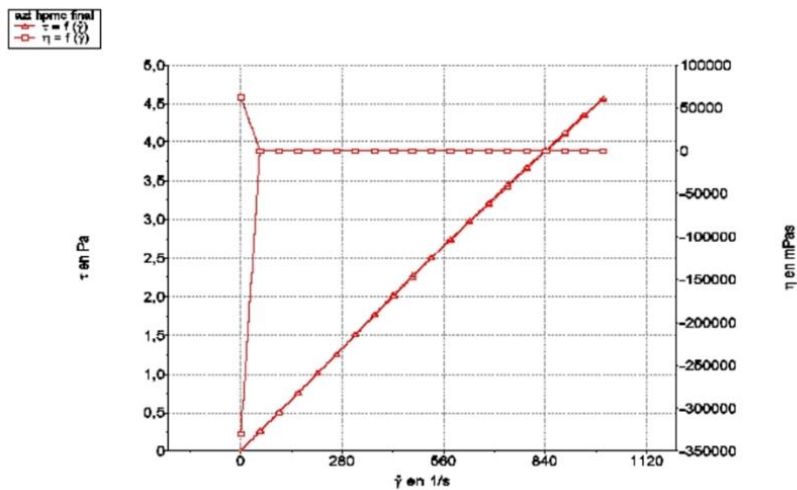


Figura 4.6. Reograma de la formulación liposomal con polímero L-ACZ-P.

Los resultados de tensión superficial ( $T_s$ ) obtenidos en las formulaciones se recogen en la Tabla 4.3. El valor de la formulación liposomal L-ACZ, 30,6 mN/m, resulta inferior a la tensión superficial crítica de la superficie ocular (38

mN/m)<sup>47</sup>, lo que asegura una situación de excelente mojabilidad. En el caso de la formulación con HPMC, el valor de  $T_s$  es próximo a los que presenta la película lagrimal (44-46 mN/m<sup>48 49 50</sup>), y además, el polímero va a actuar como agente humectante favoreciendo la estabilidad de la película precorneal<sup>51</sup>.

#### 4.3.2 ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR *IN VITRO*

Los estudios de viabilidad celular se han realizado con las formulaciones que se han desarrollado L-ACZ y L-ACZ-P y con soluciones del principio activo en dos vehículos diferentes: vehículo base de las formulaciones y solución de cloruro sódico isotónico.

En los ensayos realizados con la acetazolamida se trata de estudiar la posible toxicidad del principio activo tanto en el vehículo base como en cloruro sódico, utilizando como comparador la solución de cloruro sódico.

En la Tabla 4.4 se recogen la composición de los diferentes preparados ensayados.

---

<sup>47</sup> Murube J. Tratamiento sustitutivo del ojo seco: lágrimas artificiales. Ojo seco-Dry-Eye. Madrid. Editorial Tecnimedia.1997;189-206.

<sup>48</sup> Nagyova B, Tiffany JM. Components for responsible Surface tension of human tears. Current Eye Research. 1999;19:4-11.

<sup>49</sup> Tiffany JM. Tears in health and disease. Eye 2003;17:1-4

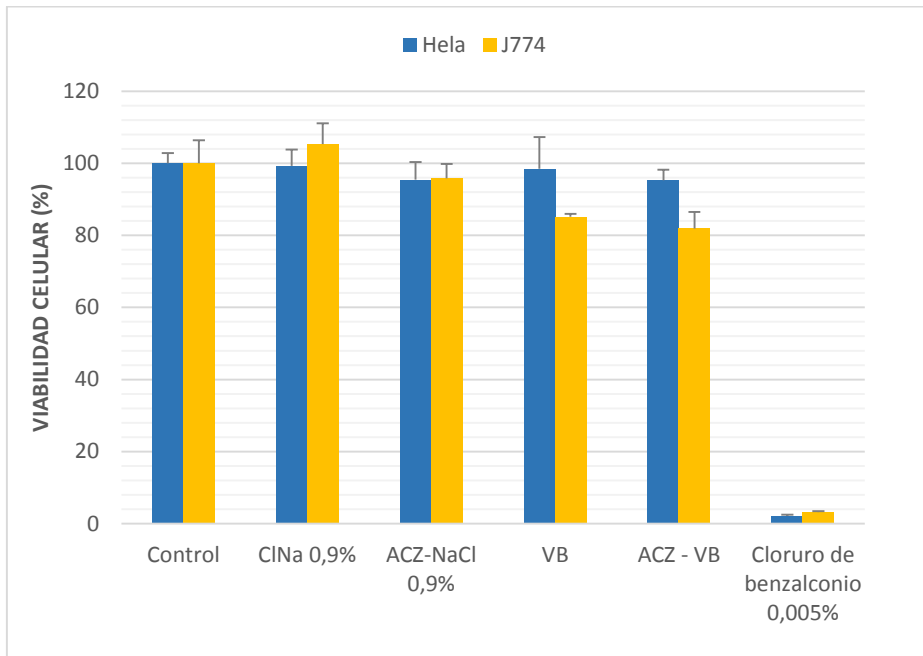
<sup>50</sup> Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. Experimental Eye Research 2004;78:347-36

<sup>51</sup> Lemp MA, holly FJ. Ophthalmic polymers as ocular wetting agents. Annals of Ophthalmology 1972;4:15-20.

Preparado	Composición
L-ACZ	Acetazolamida (0,7 mg/mL) y liposomas (expresados en concentración de FC 20 mg/mL) en vehículo base
L-ACZ-P	Acetazolamida (0,7 mg/mL), liposomas (expresados en concentración de FC 20 mg/mL) y HPMC al 0,3% en vehículo base
ACZ en vehículo base (ACZ-VB)	Acetazolamida (0,7 mg/mL) en vehículo base
ACZ en sol. NaCl 0,9% (ACZ-NaCl)	Acetazolamida (0,7 mg/mL) en solución de NaCl 0,9%
Vehículo base (VB)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> al 8,38‰, Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> al 0,755‰, trehalosa al 29,8‰ y eritritol al 6,1‰.
NaCl-isotónico	Solución de NaCl al 0,9%

**Tabla 4.4.** Composición de los preparados ensayados en los estudios de tolerancia *in vitro*.

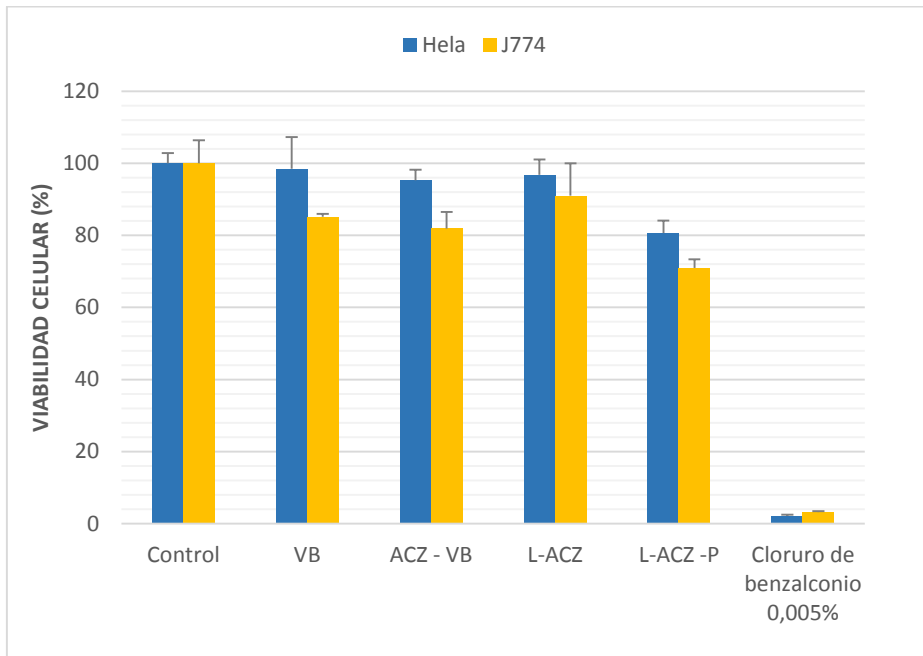
En la figura 4.7 se representan los valores de viabilidad celular (%) obtenidos con los preparados que contenían la ACZ disuelta en medio acuoso (ACZ-VB y ACZ-NaCl) junto con sus vehículos.



**Figura 4.7.** Resultados de viabilidad celular (+DE) obtenidos en las líneas celular HeLa y macrófagos J774 con los preparados ACZ-NaCl y ACZ-VB y sus vehiculos correspondientes. Control positivo: cloruro de benzalconio al 0,005% (BAK).

Se puede observar como en ninguno de los preparados ensayados la viabilidad es inferior al 80%, por lo que lo preparados serán bien tolerados. También se puede apreciar en la línea de macrófagos de ratón, que los preparados que contienen el vehículo base tienen menor viabilidad celular que los correspondientes a la solución de NaCl.

En la Figura 4.8 se representan los resultados correspondientes a las formulaciones liposomales elaboradas, incluyéndose también los datos de la solución de ACZ-VB y el vehículo base con el fin de facilitar la comparación.



**Figura 4.8.** Resultados de viabilidad celular (+DE) obtenidos en las líneas celular HeLa y macrófagos J774 con las formulaciones liposomales (L- ACZ y L-ACZ-P), la solución de ACZ-VB y el vehículo base. Control positivo: cloruro de benzalconio al 0,005% (BAK).

Todas las formulaciones ensayadas muestran una baja toxicidad *in vitro* presentando una supervivencia celular mayor al 80% exceptuando la formulación L-ACZ-P (LC: 67,1-74,8;  $\alpha=0,05$ ).

La comparación de los resultados obtenidos en las dos formulaciones liposomales indica que la utilización de la HMPC al 0,3% sería la responsable de la disminución en la viabilidad celular por debajo del 80% en la línea de macrófagos de ratón. Los resultados obtenidos podrían hacer pensar en una baja tolerancia de esta formulación tras su instilación. Sin embargo, en estudios de viabilidad celular realizados en líneas de córnea (HCLE) y de conjuntiva

(IOBA-NHC) humana<sup>52</sup>, la viabilidad de la HPMC al 0,3% tras tiempos largos de exposición resultó no ser inferior al 90%. Las células utilizadas en este trabajo son más sensibles que las líneas representativas de la superficie ocular, lo que justifica su utilización en los estudios generales de citotoxicidad.

Por lo indicado anteriormente se consideró que la formulación L-ACZ-P no resulta tóxica para la superficie ocular. No obstante y antes de su administración se realizó el ensayo de tolerancia *in vivo*.

#### **4.3.3 ESTUDIOS DE TOLERANCIA OCULAR *IN VIVO***

Previamente al ensayo de tolerancia *in vivo* con la formulación L-ACZ-P, se realizó un estudio macroscópico de la superficie ocular de los conejos para confirmar que no sufrían daño o alteraciones en la misma. En el análisis se observó una superficie ocular normal para todos los animales (n=6), asignándoles a todos los conejos un valor inicial de cero para todos los parámetros estudiados.

Las administraciones de la formulación L-ACZ-P se realizaron de acuerdo al protocolo previamente descrito en materiales y métodos. Los conejos no mostraron signos de molestias durante el estudio, ni a las 24 horas después de haber comenzado el mismo (Tabla 4.5).

---

<sup>52</sup> Andrés-Guerrero V. New strategies for the vehiculization of hypotensive drugs for the treatment of glaucoma [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

<b>SÍNTOMA</b>	<b>RESULTADO DEL ENSAYO</b>
DISCONFORT	No hay reacción (Grado 0)
CÓRNEA	No se presentan alteraciones (Grado 0)
CONJUNTIVA	No se presentan alteraciones (Grado 0)
SECRECIONES	No hay presencia de secreciones (Grado 0)
PÁRPADOS	No hay inflamación (Grado 0)

**Tabla 4.5.** *Evaluación macroscópica de los signos y síntomas en el estudio de tolerancia in vivo para formulación L-ACZ-P.*

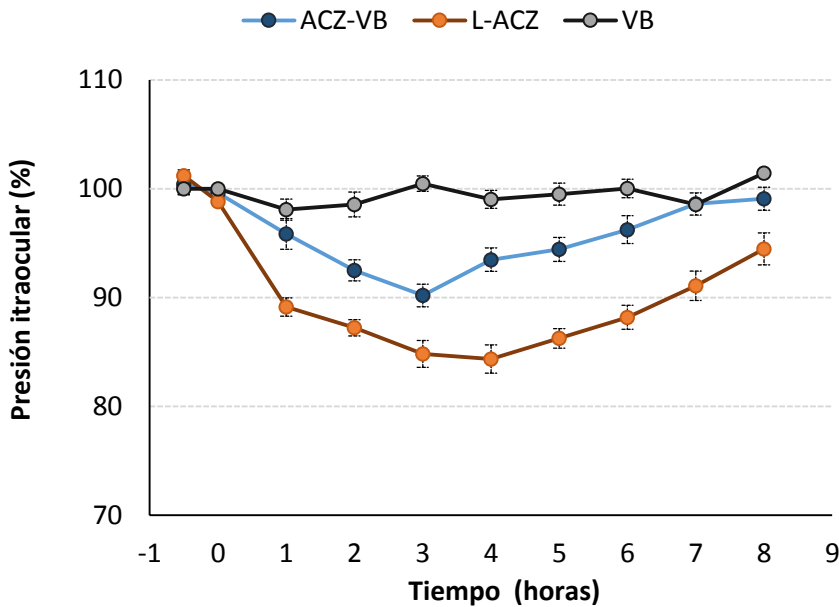
La córnea se mantuvo transparente a lo largo del ensayo y la conjuntiva mantuvo su coloración normal. Ningún animal presentó secreción mucosa durante las 24 horas de la realización del estudio. Los resultados descritos muestran una buena tolerancia ocular *in vivo* a la formulación L-ACZ-P.

#### **4.3.4 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD HIPOTENSORA EN CONEJOS**

##### **4.3.4.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOTENSORA DE LA FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE ACZ (L-ACZ)**

Como se indicó anteriormente en una primera etapa se evaluó la actividad hipotensora de la formulación liposomal de acetazolamida (L-ACZ) frente a una disolución de ACZ en vehículo base (ACZ-VB). En el estudio se incluyó un tratamiento con vehículo como placebo. El diseño del estudio respondió a un cuadrado latino 3x3.

En la Figura 4.9 se representan las presiones intraoculares (PIO) obtenidas con la formulación liposomal L-ACZ, la solución de ACZ como comparador activo y el vehículo base. Estos resultados han sido obtenidos utilizando 6 conejos (12 ojos) por tratamiento.

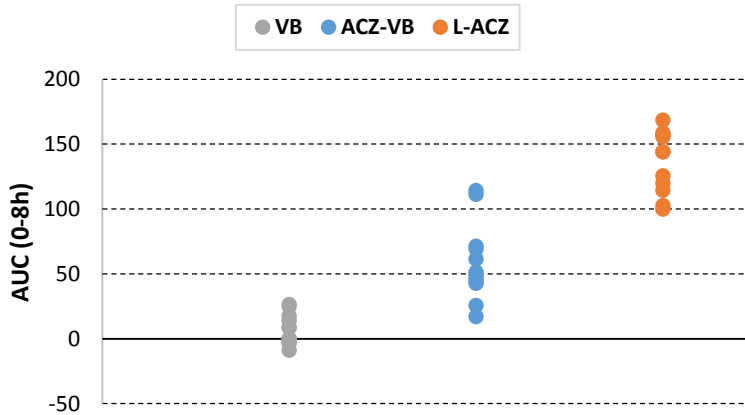


**Figura 4.9.** Presiones intraoculares (%) obtenidas tras la administración de los preparados L-ACZ, ACZ-VB y VB (utilizado como control o placebo). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.

En la Figura anterior se puede observar como los preparados que contienen ACZ disminuyen la PIO, pero la intensidad de esta acción es diferente.

Para evaluar la actividad hipotensora de cada formulación se utilizó la variable reducción de la presión intraocular ( $\Delta$ PIO), calculando el área bajo la curva  $\Delta$ PIO-tiempo ( $AUC_{0-8h}$ , %·hora) por el método trapezoidal. También se valoró el descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta$ PIO<sub>max</sub>).

En la Figura 4.10 se representan los valores individuales de  $AUC_0^{8h}$  obtenidos con los diferentes preparados ensayados, y en la Tabla 4.6 se muestran los valores promedios.



**Figura 4.10.** Representación gráfica de los valores individuales de área bajo las curvas  $\Delta$ PIO-tiempo obtenidos en las diferentes situaciones ensayadas.

PREPARADO ADMINISTRADO	$AUC_0^{8h}$ (%·h)	LÍMITES DE CONFIANZA 95%
Formulación L-ACZ	137,4	122,4 – 152,5
Solución de ACZ en VB	58,9	40,1 – 77,8
VB	7,2	(-0,2) – 14,6

**Tabla 4.6:** Valores promedios de área bajo la curva  $\Delta$ PIO-tiempo obtenidos en las diferentes situaciones ensayadas.

Como cabría esperar el  $AUC_0^{8h}$  del vehículo base no presenta diferencias significativas con cero.

Al realizar el tratamiento estadístico de estos datos, se obtienen los resultados indicados en la Tabla 4.7. Se consideran como factores independientes de variación: el tratamiento, el animal y el periodo, mientras que el factor ojo (derecho o izquierdo) se considera anidado en el factor animal.

FUENTE DE VARIACIÓN	P-VALOR
Tratamiento	<0,001
Periodo	0,900
Animal	0,550
Ojo (Animal)	0,432
Variabilidad explicada por el modelo (%)	90,5
Grados de libertad residual	20

**Tabla 4.7:** Valores de probabilidad obtenidos para las diferentes fuentes de variación del modelo estadístico planteado (Variable estudiada:  $AUC_0^{8h}$ ).

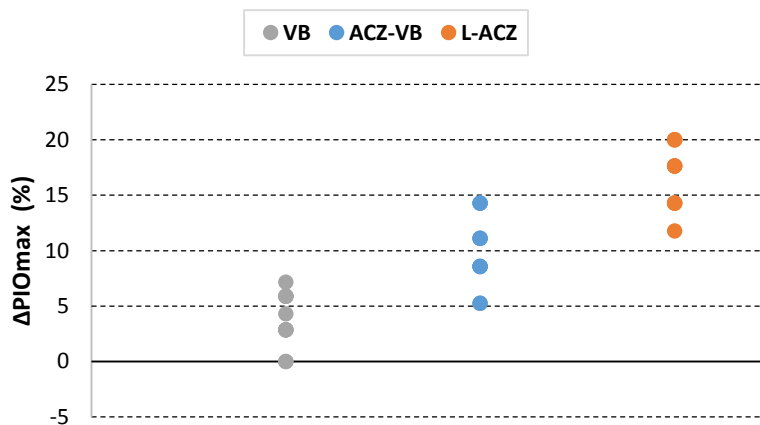
Los resultados indican diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. Al aplicar el análisis de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) a los tratamientos se encuentran diferencias entre los tres tratamientos aplicados. Sin embargo, no se manifiestan diferencias significativas entre animales, ni entre ojos del mismo animal. Tampoco existen diferencias entre periodos. La variabilidad explicada por el modelo es el 90,5%.

Se calculó la diferencia entre las áreas bajo las curvas promedio de los tratamientos:

$$AUC_0^{8h}(L - ACZ) - AUC_0^{8h}(ACZ - VB)$$

y sus límites de confianza para un 95%, obteniéndose un valor de 78,5 %-h con límites entre 58,2 y 98,8 %-h (95% de confianza). Este intervalo no contiene el valor de cero por lo que se puede aceptar la superioridad de la formulación L-ACZ frente a la solución de ACZ en vehículo base<sup>53</sup>.

En el caso de la actividad máxima o descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$ ) los resultados se encuentran representados en la Figura 4.11 y los valores promedios en la Tabla 4.8.



**Figura 4.11.** Representación gráfica de los valores individuales de  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$  obtenidos en las diferentes situaciones ensayadas.

---

<sup>53</sup> Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Points to consider on switching between superiority and non-inferiority. the European agency for the evaluation of medicinal products (EMA); [updated 2000 Jul 27; cited 2017 feb 23]

PREPARADO ADMINISTRADO	$\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$ (%)	LÍMITES DE CONFIANZA 95%
Formulación L-ACZ	16,6	14,9 – 18,4
Solución de ACZ en VB	10,1	8,6 – 12,1
VB	3,9	2,4 – 5,4

**Tabla 4.8:** Valores promedios de  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$  obtenidos en las diferentes situaciones ensayadas.

En el tratamiento estadístico de los datos individuales de  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$  se obtienen los resultados indicados en la Tabla 4.9.

FUENTE DE VARIACIÓN	P-VALOR (MODELO-2)
Tratamiento	<0,001
Periodo	0,414
Animal	0,744
Ojo (Animal)	0,260
Variabilidad explicada por el modelo (%)	87,4
Grados de libertad residual	20

**Tabla 4.9:** Valores de probabilidad obtenidos para las diferentes fuentes de variación en el modelo estadístico planteado (Variable estudiada:  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$ ).

Como en el caso de la variable  $AUC_0^{8h}$ , se manifiestan diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. Mediante el análisis de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) se puede corroborar que las diferencias significativas afectan a los 3 tratamientos aplicados. Por el contrario, no se encuentran diferencias en el resto de los factores estudiados. En este caso, el modelo explica un 87,4% de la variabilidad de los datos.

Al calcular la diferencia entre los valores promedios de descenso máximo de la formulación L-ACZ y de la solución ACZ-VB se obtuvo un valor del 8%, con límites de confianza para el 95% entre 5,6 y 10,4%. Este parámetro también confirma la superioridad de la formulación FOR-ACZ al no incluir el valor de cero<sup>54</sup>.

En cuanto a la duración de los efectos (Figura 4.9), en la formulación liposomal (L-ACZ) la actividad hipotensora (PIO) se mantuvo hasta el final del estudio (8 horas, LC ( $\alpha=0,05$ ): 91,2 – 97,7%) mientras que con la disolución de ACZ (ACZ-VB) a las 8 horas no se encuentran diferencias con el valor de 100 (LC de PIO ( $\alpha=0,05$ ): 96,7 – 101,4%).

Como la biodisponibilidad representa la cantidad de fármaco que es capaz de llegar al lugar de acción, y esta condiciona la actividad hipotensora, podemos establecer una biodisponibilidad relativa (BR) comparando las AUCs de las formulaciones con y sin liposomas. De esta forma la BR (L-ACZ:ACZ-VB) calculada a partir de los datos promedio es de 2,3. Este valor sirve como una aproximación del aumento en la biodisponibilidad que se consigue al incluir la ACZ en una formulación liposomal.

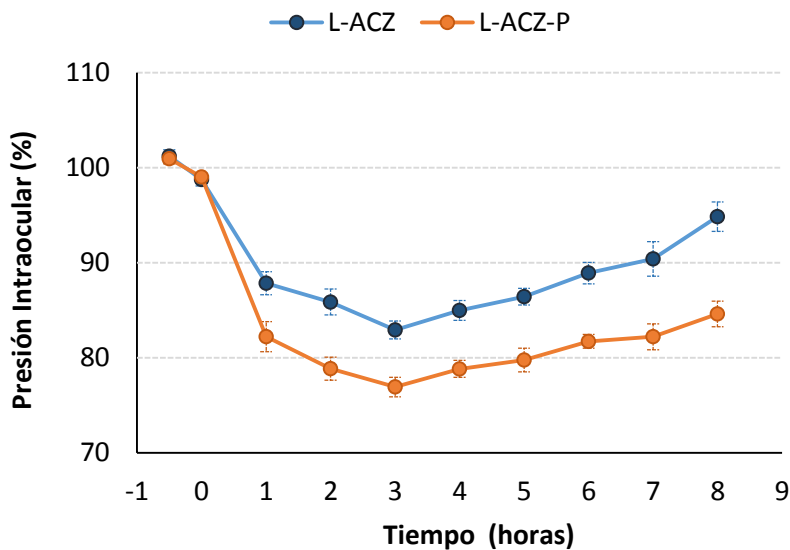
---

<sup>54</sup> Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Points to consider on switching between superiority and non-inferiority. the European agency for the evaluation of medicinal products (EMA); [updated 2000 Jul 27; cited 2017 feb 23]

#### 4.3.4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOTENSORA DE LA FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE ACZ CON POLÍMERO BIOADHESIVO (L-ACZ-P)

En esta segunda etapa se determinó la actividad hipotensora de la formulación liposomal mejorada (L-ACZ-P). En esta formulación se incluye un polímero bioadhesivo, la HPMC, con el fin de aumentar la duración de la actividad y proteger la superficie ocular. En el estudio se compara la formulación liposomal con polímero (L-ACZ-P) con la formulación liposomal sin polímero (L-ACZ) evaluándose la influencia del polímero. El diseño del estudio respondió a un cuadrado latino 2x2.

En la figura 4.12 se representan las presiones intraoculares (PIO) obtenidas con ambas formulaciones. Estos resultados han sido obtenidos utilizando 6 conejos (12 ojos) por tratamiento.

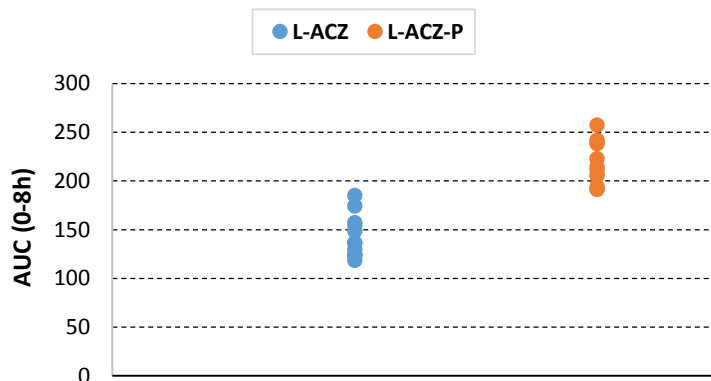


**Figura 4.12.** Presiones intraoculares (%) obtenidas tras la administración de los preparados L-ACZ y L-ACZ-P. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EE.

En esta figura se puede observar que la adición de polímero produce una bajada considerable de la PIO comparada con la formulación sin polímero.

Como ya se ha indicado la actividad hipotensora de cada formulación se evalúa utilizando la reducción de la presión intraocular ( $\Delta$ PIO). A partir de estos datos se calculó el área bajo la curva  $\Delta$ PIO-tiempo ( $AUC_0^{8h}$ , %·hora) siguiendo la regla trapezoidal. También se valoró el descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta$ PIO<sub>max</sub>).

En la Figura 4.13 se muestran los valores individuales y en la Tabla 4.10 los valores promedios de  $AUC_0^{8h}$  obtenidos con ambos preparados.



**Figura 4.13.** Representación gráfica de los valores individuales de  $AUC_0^{8h}$  obtenidos con las formulaciones ensayadas.

PREPARADO ADMINISTRADO	$AUC_0^{8h}$ (%·h)	LÍMITES DE CONFIANZA 95%
Formulación L-ACZ	142,6	128,9 – 156,3
Formulación L-ACZ-P	217,8	203,8 – 231,8

**Tabla 4.10.** Valores promedios de  $AUC_0^{8h}$  obtenidos en ambas formulaciones ensayadas.

Al realizar el tratamiento estadístico de este diseño con los datos individuales de  $AUC_0^{8h}$  se obtienen los resultados indicados en la Tabla 4.11. Las fuentes de variación son las mismas indicadas en el diseño anterior.

FUENTE DE VARIACIÓN	P-VALOR
Tratamiento	<0,001
Periodo	0,147
Animal	0,083
Ojo (Animal)	0,147
Variabilidad explicada por el modelo (%)	93,9
Grados de libertad residual	10

**Tabla 4.11:** Valores de probabilidad obtenidos para las diferentes fuentes de variación en el modelo estadístico planteado (Variable estudiada:  $AUC_0^{8h}$ ).

Se observan diferencias significativas entre ambos tratamientos. El modelo es capaz de explicar el 93,9% de la variabilidad que presentan los datos.

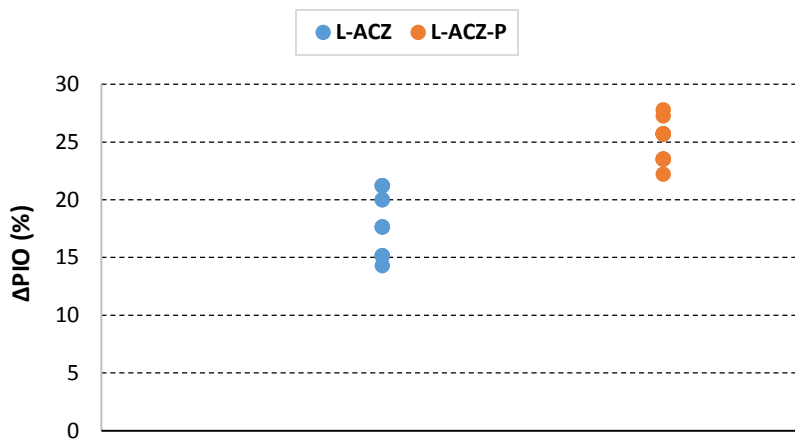
Se calculó la diferencia entre las áreas bajo las curvas de los tratamientos:

$$AUC_0^{8h}(L - ACZ) - AUC_0^{8h}(L - ACZ - P)$$

y sus límites de confianza para un 95% obteniéndose un valor de 75,2 %·h con límites entre 60,3 y 90,2 %·h (95% de confianza). Este intervalo no contiene el valor de cero por lo que se puede aceptar la superioridad de la formulación

liposomal con polímero (L-ACZ-P) frente a la formulación liposomal (L-ACZ) en vehículo base<sup>55</sup>.

Los resultados de actividad máxima o descenso máximo de presión intraocular ( $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$ ) se encuentran en la Figura 4.14 y la Tabla 4.12.



**Figura 4.14.** Representación gráfica de los valores individuales de  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$  obtenidos en las en las formulaciones ensayadas.

PREPARADO ADMINISTRADO	$\Delta\text{PIO}_{\text{MAX}}$ (%)	LÍMITES DE CONFIANZA 95%
Formulación L-ACZ	18,0	16,3 – 19,7
Formulación L-ACZ-P	25,0	23,9 – 26,1

**Tabla 4.12:** Valores promedios de  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$  obtenidos en las formulaciones ensayadas.

<sup>55</sup> Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Points to consider on switching between superiority and non-inferiority. the European agency for the evaluation of medicinal products (EMA); [updated 2000 Jul 27; cited 2017 feb 23]

Al realizar el tratamiento estadístico de este diseño con los datos individuales de  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$ , se obtienen los resultados indicados en la Tabla 4.13.

FUENTE DE VARIACIÓN	P-VALOR
Tratamiento	<0,001
Periodo	0,992
Animal	0,496
Ojo (Animal)	0,641
Variabilidad explicada por el modelo (%)	85,7
Grados de libertad residual	10

**Tabla 4.13:** Valores de probabilidad obtenidos para las diferentes fuentes de variación en el modelo estadístico planteado (Variable estudiada:  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$ ).

Existen diferencias significativas entre ambos tratamientos. El modelo es capaz de explicar el 87,7% de la variabilidad que presentan los datos.

Se calculó la diferencia entre los valores de descenso máximo de la formulación L-ACZ-P y de la formulación L-ACZ obteniéndose un valor del 7%, con límites de confianza para el 95% entre 4,8 y 9,2%. Este parámetro también confirma la superioridad de la formulación liposomal con polímero frente a la de sin polímero<sup>56</sup>.

---

<sup>56</sup> Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Points to consider on switching between superiority and non-inferiority. the European agency for the evaluation of medicinal products (EMA); [updated 2000 Jul 27; cited 2017 feb 23]

Si se utilizan los resultados de  $AUC_0^{8h}$  promedio, representativos de las concentraciones en el lugar de acción, para calcular la biodisponibilidad relativa entre las formulaciones liposomales (BR(L-ACZ-P:L-ACZ)) se obtiene un valor de 1,5. Si la formulación con polímero (L-ACZ-P) se compara con la solución de ACZ (ACZ-VB) la biodisponibilidad relativa aumenta a 3,7. Estos valores sirven de aproximación del aumento en la biodisponibilidad que se consigue al incluir la ACZ en una formulación liposomal con un vehículo polimérico.

#### **4.4 BIBLIOGRAFÍA**

Aguayo Bonniard A, Yeung JY, Chan CC, Birt CM. Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK). *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016 Jul 18:1-11.

Andrés-Guerrero V. New estrategias for the vehiculization of hypotensive drugs for the treatment of glaucoma [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

Andrés-Guerrero V, Vicario-de-la-Torre M, Molina-Martínez IT, Benítez-del-Castillo JM, García-Feijoo J, Herrero-Vanrell R. Comparison of the in vitro tolerance and in vivo efficacy of traditional timolol maleate eye drops versus new formulations with bioadhesive polymers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jun 1;52(6):3548-56.

Akhter S, Anwar M, Siddiqui MA, Ahmad I, Ahmad J, Ahmad MZ, Bhatnagar A, Ahmad FJ. Improving the topical ocular pharmacokinetics of an immunosuppressant agent with mucoadhesive nanoemulsions: Formulation development, in-vitro and in-vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;148:19–29.

Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative study of in vitro ocular surface cytotoxicity of a fixed combination of 0.5% timolol/1% dorzolamide eyedrop and its components with 0.005% benzalkonium chloride. *Biocontrol Sci.* 2012;17(3):115-20.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 1965:238-252.

Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Experimental Eye Research* 2004;78:347-36.

Carney LG, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:747-54.

Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Points to consider on switching between superiority and non-inferiority. the European agency for the evaluation of medicinal products (EMA); [updated 2000 Jul 27; cited 2017 feb 23]

Costa VP, Braga MEM, Duarte CMM, et al. Anti-glaucoma drug-loaded contact lenses prepared using supercritical solvent impregnation. *J Supercrit Fluids*. 2010;53:165–73.

Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ. Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2005 Mar-Apr;50(2):167-82.

Enriquez-de-Salamanca A, Calonge M, García Vazquez C, Callejo vila A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular Surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2006:1416-25.

Guinedi AS, Mortada ND, Mansour S, Hathout RM. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide.. *Int J Pharm*. 2005 Dec 8;306(1-2):71-82.

Hathout RM, Mansour S, Mortada ND, Guinedi AS. Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. *AAPS PharmSciTech*. 2007 Jan 5;8(1):1.

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm*. 2002;248:1–14.

Lee VH, Urrea PT, Smith RE, Schanzlin DJ Ocular drug bioavailability from topically applied liposomes. *Surv. Ophthalmol*. 1985;29:335–348.

Lemp MA, holly FJ. Ophthalmic polymers as ocular wetting agents. *Annals of Ophthalmology* 1972;4:15-20.

Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58:265–78.

Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;69(2):581-93.

Ma D, Chen CB, Liang J, Lu Z, Chen H, Zhang M. Repeatability, reproducibility and agreement of intraocular pressure measurement in rabbits by the TonoVet and Tono-Pen. *Sci Rep*. 2016 Oct 12;6:35187.

Maier PC, Funk J, Schwarzer G, Antes G, Falck-Ytter YT: Treatment of ocular hypertension and open angle glaucoma: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2005;331:134.

Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 1995;95:75–93.

Millar JC, Pang IH. Non-continuous measurement of intraocular pressure in laboratory animals. *Experimental Eye Research* 2015;141:74-90.

Mora MJ, Longhi MR, Granero GE. Synthesis and characterization of binary and ternary complexes of diclofenac with a methyl- $\beta$ -CD and monoethanolamine and in vitro transdermal evaluation. *Eur J Med Chem* 2010;45:4079-88.

Moss SE, Klein R, Klein BEK. Long-term incidence of Dry Eye in an older population. *Optometry & Vision Science*. 2008;85:668-674.

Murube J. Tratamiento sustitutivo del ojo seco: lágrimas artificiales. *Ojo seco-Dry-Eye*. Madrid. Editorial Tecnimedia.1997;189-206.

Nagyova B, Tiffany JM. Components for responsible Surface tension of human tears. *Current Eye Research*. 1999;19:4-11.

Organization for Economic Co-operation and Development. Test guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Available on-line at <http://www.oecd.org>2002 [7 jul 2016].

Palma SD, Tartara LI, Quinteros D, Allemandi DA, Longhi MR, Granero GE. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- $\beta$ -CD and TEA for topical ocular administration. *J Control Release*. 2009 Aug 19;138(1):24-31.

Pellinen P, Huhtala A, Tolonen A, Lökkilä J, Maenpää J, Uusitalo H. The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium in vitro and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues in vivo. *Curr Eye Res*. 2012;37:145-154.

Quinteros DA, Ferreira LM, Schaffazick SR, Palma SD, Allemandi DA, Cruz L. Novel Polymeric Nanoparticles Intended for Ophthalmic Administration of Acetazolamide. *J Pharm Sci*. 2016 Oct;105(10):3183-90.

Quinteros D, Vicario-de-la-Torre M, Andrés-Guerrero V, Palma S, Allemandi D, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Hybrid formulations of liposomes and bioadhesive polymers improve the hypotensive effect of the melatonin analogue 5-MCA-NAT in rabbit eyes. *PLoS One*. 2014 Oct 20;9(10):e110344.

Reardon G, Kotak S, Schwartz GF: Objective assessment of compliance and persistence among patients treated for glaucoma and ocular hypertension: a systematic review. *Patient Prefer Adherence*. 2011;5:441-463.

Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Work Shop. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. *The Ocular Surface* 2007;5:2.

Sabri K, Levin AV. The additive effect of topical dorzolamide and systemic acetazolamide in pediatric glaucoma. *J Am Assoc Ped Ophth Strab*. 2006;10:464–8.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 1988;48(17):4827-33.

Seibold LK, Ammar DA, Kahook MY. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity in vitro. *Curr Eye Res*. 2012;38:70–74.

Sharan S, Dupuis A, Hebert D, Levin AV. The effect of oral acetazolamide on weight gain in children. *Can J Ophthalmol*. 2010;45: 41-5.

Tham YC, Li X, Wong TY, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040 a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014;121:2081-90.

Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye* 2003;17:1-4.

Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol*. 1991; 15: 371–376.

Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: Determination of a referent for dry eye diagnosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:4039-4315.

Tremblay C, Barza M, Szoka F, Lahav M, Baum J. Reduced toxicity of liposome-associated amphotericin B injected intravitreally in rabbits Baum. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1985;26:711–718.

Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

Vicario-de-la-Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome del ojo seco [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

Wentz SM, Kim NJ, Wang J, Amireskandari A, Siesky B, Harris A: Novel therapies for open-angle glaucoma. *F1000Prime Re*. 2014;6:102.

WHO Global initiative for the elimination of avoidable blindness 2000. WHO/PBL/97.61 Rev.2

www.arvo.org[internet] EEUU; ARVO. [actualizado 2016; citado 10 feb 2017]. Disponible en: [http://www.arvo.org/about\\_arvo/policies/statement\\_for\\_the\\_use\\_of\\_animals\\_in\\_ophthalmic\\_and\\_visual\\_research/](http://www.arvo.org/about_arvo/policies/statement_for_the_use_of_animals_in_ophthalmic_and_visual_research/)

Yamada M, Mochikuzi H, Hata Y, Mashima Y. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. *Current eye research* 1998;17:1005-1009.

Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A. Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32: 1266–1271.

Ye J, Zhang H, Wu H, Wang C, Shi X, Xie J, He J, Yang J. Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012 Oct;250(10):1459-66.

Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Azimi M, Valizadeh H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;73:102–6.

**5. CAPÍTULO 3: DESARROLLO Y  
CARACTERIZACIÓN DE UNA  
FORMULACIÓN LIPOSOMAL  
DE GELIFICACIÓN *IN SITU* DE  
CICLOSPORINA A**



## **5.1 INTRODUCCIÓN**

El síndrome de ojo seco (SOS) es una patología ocular presente en el 14-33% de la población mundial. Se considera una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular (SO) que origina inestabilidad de la película lagrimal y se acompaña de un aumento de osmolaridad de la lagrime e inflamación de la SO<sup>1</sup>. Aunque en general no se considera una enfermedad grave, si disminuye la calidad de vida del paciente, su estado de salud y bienestar ya que, además de dolor e irritación ocular, produce alteración de la función visual. Las lágrimas artificiales se consideran el tratamiento de elección para los síntomas de la enfermedad, sin embargo la instilación frecuente de las mismas puede afectar la interacción social y laboral de los pacientes que sufren esta patología<sup>2</sup>.

La aparición de ojo seco está ligada a la alteración de la película lagrimal que favorece la evaporación del agua de la lágrima<sup>3</sup>. Sin embargo la etiología de la

---

<sup>1</sup> Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Work Shop. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. The Ocular Surface 2007 Apr;5:2.

<sup>2</sup> Lemp, M.A. The definition and classification of dry eye disease: Report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop 2007. Ocul Surf 2007;5:75-92.

<sup>3</sup> Moss SE, Klein R, Klein BEK. Long-term Incidence of Dry Eye in an Older Population. Optometry & Vision Science 2008;85:668-674.

enfermedad presenta una gran controversia. Algunos autores establecen el SOS como un problema de base inflamatoria inmune debido a la presencia de infiltrados inflamatorios en la SO<sup>4</sup>. Otros autores lo relacionan con alteraciones hormonales debido a la alta incidencia de ojo seco en mujeres postmenopáusicas<sup>5</sup>.

Independientemente del origen de la enfermedad, la terapia del SOS se centra, fundamentalmente, en mejorar los síntomas de la patología. Dentro de los tratamientos empleados se incluyen: sustitución de la lágrima natural (por medio de lágrimas artificiales), preservación de la lágrima existente (mediante oclusión del sistema de drenaje o por medios que disminuyan su evaporación) y estimulación de una mayor producción de lágrima natural (a través de fármacos secretagogos o lacrimomiméticos).

Las lágrimas artificiales se utilizan en el tratamiento de cualquier estadio de la enfermedad tanto solas como en combinación con otros tratamientos. El número de lágrimas artificiales ha aumentado mucho en los últimos años y hoy en día hay muchos de estos preparados en el mercado. Aunque existen ya lágrimas artificiales que contienen componentes capaces de mejorar las condiciones de la película precorneal desestabilizada, no existe todavía ninguna formulación comercializada cuyos componentes se asemejen a los de la película precorneal y que sean capaces, al mismo tiempo, de permanecer en contacto con la superficie corneal durante un periodo prolongado de tiempo.

Ante el aumento en el número de pacientes cuya sintomatología no revierte mediante el empleo de formulaciones convencionales, se están introduciendo agentes con actividad antiinflamatoria (ciclosporina A, inmunomodulador)<sup>6</sup> u

---

<sup>4</sup> Barabino S, Chen Y, Chauhan S, R. D. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2012 May;31:271-285.

<sup>5</sup> Rocha EM, Mantelli F, Nominato LF, Bonini S. Hormones and dry eye syndrome: an update on what we do and don't know. *Curr Opin Ophthalmol* 2013 Jul;24:348-355.

<sup>6</sup> De Paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2008;71:89-95.

hormonal (andrógenos)<sup>7</sup> capaces de generar un alivio de los síntomas que acompañan esta enfermedad<sup>8</sup>. La sustitución de la lágrima natural mediante colirios de suero autólogo o de membrana amniótica<sup>9 10</sup> para el tratamiento del ojo seco grave y la terapia nutricional en ojo seco leve-moderado (ácidos grasos omega-3 y omega-6) constituyen nuevas estrategias eficaces en la terapia de esta patología<sup>11</sup>.

La ciclosporina A (CsA) es un inmunomodulador y agente antiinflamatorio. Se ha demostrado que bloquean la proliferación de células T y la transducción de la señal del receptor. Las respuestas inflamatorias mediadas por células son moduladas a través de la regulación negativa de la expresión del receptor de IL-2 y la transcripción génica<sup>12 13</sup>. Debido a las propiedades mencionadas anteriormente, la CsA tiene diversas aplicaciones en oftalmología, incluyendo síndrome de ojo seco, prevención del rechazo de injerto corneal, blefaritis, rosácea y diferentes tipos de queratoconjuntivitis<sup>14 15</sup>.

---

<sup>7</sup> Sullivan DA, Wickham L, Toda I, Gao J. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat, rabbit, and human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;35:S651.

<sup>8</sup> Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye. A twenty-five-year review. *Cornea* 2000;19:644-649.

<sup>9</sup> Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: A prospective randomized case-control study. *American Journal of Ophthalmology* 2005;139(2):242-6.

<sup>10</sup> Tseng SG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic Membrane Transplantation With or Without Limbal Allografts for Corneal Surface Reconstruction in Patients With Limbal Stem Cell Deficiency. *Arch Ophthalmol*.1998;116(4):431-441.

<sup>11</sup> Miljanovic B, Trivedi KA, Dana MR, Gilbard JP, Buring JE, Schaumberg DA. Relation between dietary n -3 and n -6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82:887-893.

<sup>12</sup> el-Asrar AM, Tabbara KF, Geboes K, et al. An immunohistochemical study of topical cyclosporine in vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121:156-61.

<sup>13</sup> Power WJ, Mullaney P, Farrell M, Collum LM. Effect of topical cyclosporin A on conjunctival T cells in patients with secondary Sjogren's syndrome. *Cornea* 1993;12:507-11.

<sup>14</sup> Utine CA, Stern M, Akpek EK. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporin A, *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2010;18:352-361

<sup>15</sup> Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses, *Surv. Ophthalmol.* 2009;54:321-338.

La hidrofobicidad y la solubilidad acuosa extremadamente baja de la CsA da lugar a bajas concentraciones en la película lagrimal y si además se considera su baja permeabilidad<sup>16</sup>, se explica fácilmente la baja biodisponibilidad ocular que presenta<sup>17</sup>. Se ha estudiado el efecto de varios potenciadores de la permeación transcorneal de la CsA, pero a pesar de mostrar resultados prometedores, su baja tolerancia corneal limita su uso<sup>18</sup>. Para superar los problemas asociados de la CsA a los sistemas de administración convencionales y mejorar su eficacia, se han utilizado liposomas como sistema de administración del agente inmunomodulador.

Los liposomas son nanosistemas con una o más capas lipídicas capaces de mejorar la penetración de fármacos a través de las membranas y que presentan una alta biodisponibilidad y biodegradabilidad<sup>19 20</sup>. Debido a la naturaleza bifásica de los liposomas, se pueden encapsular fármacos hidrófilos y lipófilos dependiendo de la solubilidad en los componentes liposómicos. Los fármacos ideales para la encapsulación liposómica son aquellos que tienen potente actividad farmacológica y son altamente lipídicos.

En el grupo de investigación se ha desarrollado una formulación liposomal de CsA al 0,1% que incluye componentes semejantes a los de la película precorneal. Este preparado contiene fosfatidilcolina como componente lipídico, trehalosa como agente osmoprotector, vitamina E como antioxidante e hialuronato sódico como mucomimético. El estudio de la eficacia de esta

---

<sup>16</sup> Lallemand F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: a comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 Mar 14. pii: S0939-6411(16)30908-0.

<sup>17</sup> Lallemand, F., Felt-Bayens, O., Besseghir, K., et al. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013;56:307–318.

<sup>18</sup> Tang-Liu D, Richman J, Weinkam R, Takruri H. Effects of four penetration enhancers on corneal permeability of drugs in vitro, *J. Pharm. Sci.* 1994;83:85–90.

<sup>19</sup> Shen Y, Tu J. Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes, *AAPS J.* 2007;9:E371–377.

<sup>20</sup> Dai Y, Zhou R, Liu L, Lu Y, Qi J, Wu W. Liposomes containing bile salts as novel ocular delivery systems for tacrolimus (FK506): in vitro characterization and improved corneal permeation, *Int. J. Nanomed.* 2013;8:1921–1933.

formulación en perros que padecen el síndrome de ojo seco es el primer objetivo de este capítulo.

Como segundo objetivo de este capítulo, se pretende desarrollar, un nuevo preparado liposomal con CsA capaz de gelificar *in situ* que combinaría las características de una formulación líquida a la hora de la administración con las de un gel en el lugar de administración, evitando los problemas de aplicación de este último.

Con esta formulación gelificante se trata de aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular y por tanto aumentar su eficacia, así como disminuir el número de instilaciones.

## **5.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.1 MATERIALES**

El Phospholipon 90G que contiene más de un 95% de fosfatidilcolina (FC) purificada de la lecitina de soja se adquirió de Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemania). La trehalosa se adquirió en Cymit Química S.L. (Barcelona, España) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), goma xantana y el alginato sódico en Abarán Materias Primas (Madrid, España). El cloruro sódico (NaCl), el cloruro potásico (KCl) y el cloruro magnésico (MgCl<sub>2</sub>) fue adquirido en Merck (Darmstadt, Alemania). El colesterol (Ch), la ciclosporina A (CsA), la Vitamina E (Vit-E), el ascorbil fosfato sódico (SAP), la goma gelano (GG), el tetraborato de sodio anhidro, el ácido bórico, el bicarbonato sódico y el cloruro de calcio dihidrato (CaCl<sub>2</sub>) fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, España). El cloroformo se adquirió en Panreac Química S.A. (Madrid, España). Se utilizaron conejos blancos machos de Nueva Zelanda de 3 a 4 kg suministrados por la Granja San Bernardo (Navarra, España).

La goma gelano (GG) es un polisacárido aniónico soluble en agua que se obtiene de la fermentación aeróbica de la glucosa mediante la bacteria *Sphingomonas Elodea*<sup>21</sup>. Se emplea en la industria alimentaria con la codificación E 418. Su estructura molecular es lineal compuesta por uniones de monómeros de glucosa, ácido glucurónico y ramnosa (proporción 2:1:1). Es biodegradable y no presenta toxicidad. Tiene la propiedad de formar geles en presencia de cationes<sup>22 23 24 25</sup>.

### 5.2.2 PREPARACIÓN DE LOS LIPOSOMAS CARGADOS CON CICLOSPORINA A

La preparación liposomal de ciclosporina A (CsA) se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Bangham<sup>26</sup> y modificada por nuestro grupo de investigación<sup>27</sup>. Inicialmente, la concentración de ciclosporina A fue variable con el fin de determinar la encapsulación máxima. Una vez establecida la formulación final la proporción de componentes se mantuvo constante. Se disolvieron FC, Ch, CsA y Vit-E en cloroformo en una proporción de 8:1:0,64:0,08. A continuación, se eliminó el disolvente orgánico en un

---

<sup>21</sup> Osmatek T, Froelich A, Tasarek S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int J Pharm.* 2014 May 15;466(1-2):328-40.

<sup>22</sup> Osmatek T, Froelich A, Tasarek S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int J Pharm.* 2014 May 15;466(1-2):328-40.

<sup>23</sup> Mahdi MH, Conway BR, Smith AM. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. *Int J Pharm.* 2015 Jul 5;488(1-2):12-9.

<sup>24</sup> Fernández-Ferreiro A, Silva-Rodríguez J, Otero-Espinar FJ, González-Barcia M, Lamas MJ, Ruibal A, Luaces-Rodríguez A et al. In vivo eye surface residence determination by high-resolution scintigraphy of a novel ion-sensitive hydrogel based on gellan gum and kappa-carrageenan. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 May;114:317-323.

<sup>25</sup> Mahdi MH, Conway BR, Mills T, Smith AM. Gellan gum fluid gels for topical administration of diclofenac. *Int J Pharm.* 2016 Dec 30;515(1-2):535-542.

<sup>26</sup> Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965;13:238-252.

<sup>27</sup> Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:7839-7847

evaporador rotatorio (Buchi R-205, Massó Analítica S.A. Barcelona, España) a 33°C. En este proceso, dentro del matraz, se formó una fina película lipídica que se redispersó con una solución acuosa de trehalosa (1,6%), tetraborato sódico (0,076%) y ácido bórico (0,838%). La dispersión se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir el hinchado completo de la película de lípidos. A continuación, se procedió a la sonicación de la dispersión en baño de ultrasonidos (Ultrasons-H, Madrid, España) durante 15 minutos. Para homogeneizar el tamaño y la estructura de las vesículas formadas, la dispersión fue sometida a procesos de extrusión. Los liposomas se pasaron 10 veces a través de una membrana de tamaño de poro de 0,8  $\mu\text{m}$  (Nucleopore Lipex Biomembrane, Vancouver, Canadá) y otras 10 veces por otra membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ . Esta dispersión se dejó en reposo un mínimo de 12 horas a 4°C. Para asegurar la esterilidad, la preparación se realizó bajo condiciones asépticas y la solución de dispersión fue esterilizada en autoclave.

La formulación final gelificante que contiene CsA se preparó por mezcla de los componentes a las concentraciones iniciales indicadas en la Tabla 5.1. Todas las soluciones fueron preparadas en el medio acuoso de trehalosa (1,6%), tetraborato sódico (0,076%) y ácido bórico (0,838%).

CONCENTRACIÓN EN LAS SOLUCIONES INICIALES	COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA FORMULACIÓN
CsA 0,4% FC 5%	Liposomas de ciclosporina A	CsA 0,1% FC 1,25%
0,6%	Goma gelano	0,25%
0,6%	Hidroxipropilmetilcelulosa	0,12%
Na Cl 0,4% KCl 0,8% SAP 0,176%	Cloruro sódico	0,05%
	Cloruro potásico	0,1%
	Ascorbil fosfato sódico	0,022%

**Tabla 5.1.** Concentraciones iniciales y finales de los componentes de la formulación de gelificación *in situ* de CsA.

El matraz y el resto de artículos se esterilizaron por calor seco y las soluciones acuosas se autoclavaron. La formulación final se filtró a través de membranas de poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (filtro de jeringa Minisart, Sartorius Spain S.A. Madrid, España).

### 5.2.3 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LOS PREPARADOS

#### 5.2.3.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS LIPOSOMAS

La técnica y el equipo utilizado se describen detalladamente en el capítulo anterior.

Se determinó el tamaño de las vesículas lipídicas tanto en las dispersiones iniciales como en la formulación gelificante. Los estudios se realizaron con

muestras diluidas 1:20 (v/v) en agua milliQ a temperatura ambiente (25°C). Todas las mediciones se realizaron al menos por triplicado.

#### 5.2.3.2 DETERMINACION DEL PH

El pH se determinó utilizando un medidor de pH calibrado (Mettler Toledo, Barcelona, España) a 25°C. El medidor fue previamente calibrado con soluciones de pH 4 y 7.

#### 5.2.3.3 DETERMINACIÓN DE LA OSMOLARIDAD

La técnica y el equipo utilizado se describen con detalle en el capítulo anterior. Se determinaron las osmolaridades de la dispersión de liposomas y de la formulación gelificante de CsA.

Se utilizaron soluciones estándar de cloruro sódico (400 mOsm/L) como referencia.

#### 5.2.3.4 ENSAYOS REOLÓGICOS

Para los estudios reológicos de la dispersión liposomal, de la formulación gelificante y del gel formado *in situ* se utilizó un reómetro (Rheostress R1, Haake, Düsseldorf, Alemania) a 33°C usando el método de placas paralelas (60 mm de diámetro y 0,5 mm de separación). Se utilizaron distintos métodos en función del objetivo que se buscaba. Para la caracterización de las soluciones se utilizó la modalidad rotacional (CR) y para la caracterización del gel las medidas fueron tanto realizadas en modo CR como en modo CS (oscilatorio).

Con los ensayos oscilatorios se determina la evolución de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) en función de la amplitud y de la frecuencia de deformación. También se puede calcular la tangente de ángulo de pérdida ( $\delta$ ) como la relación entre  $G''$  y  $G'$  ( $\text{tg } \delta = G'' / G'$ )

#### 5.2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

La técnica y el equipo fueron detallados en el capítulo anterior.

Los ensayos se realizaron a 33°C y por triplicado. El equipo se verifica midiendo por triplicado la tensión superficial del agua purificada. El valor promedio obtenido debe hallarse entre 68 – 72 mN /m y los valores individuales no deben oscilar en un intervalo superior a 2 unidades.

#### 5.2.4 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR *IN VITRO*

Estos ensayos se han realizado para seleccionar el agente gelificante que se va a utilizar en el desarrollo de los preparados de gelificación *in situ*. Los ensayos de viabilidad se llevaron a cabo en una línea de células conjuntivales humanas (IOBA-NHC; Valladolid, España)<sup>28</sup>. La línea celular se cultivó conforme el protocolo publicado previamente por Andrés-Guerrero et al.<sup>29</sup>

---

<sup>28</sup> Diebold Y Calonge M Enríquez de Salamanca A Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. Invest Ophthalmol Visl Sci. 2003;44:4263–4274.

<sup>29</sup> Andrés-Guerrero V, Molina-Martínez IT, Peral A, de las Heras B, Pintor J, Herrero-Vanrell R. The Use of Mucoadhesive Polymers to Enhance the Hypotensive Effect of a Melatonin Analogue, 5-MCA-NAT, in Rabbit Eyes Investigative Ophthalmology & Visual Science 2011;52:1507-1515.

Los estudios de citotoxicidad se evaluaron mediante la reducción mitocondrial-dependiente de la sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich, Madrid, España) a formazán<sup>30 31</sup>. Se establecieron tiempos de exposición de 15 minutos, 1 hora y 4 horas con el fin de simular tratamientos a corto y largo plazo<sup>32</sup>. En administración tópica ocular se estima que el tiempo de residencia sobre la superficie ocular de una formulación convencional es inferior a 5 minutos por lo que tiempos de contacto cortos (15 minutos) serían suficientes para definir su tolerancia. Sin embargo, con el fin de simular terapias a largo plazo y/o teniendo en cuenta que los polímeros gelificantes aumentan el tiempo de contacto de la formulación sobre la superficie ocular, se incluyen en el ensayo tiempos de contacto de 1 hora y 4 horas. Este método ha sido empleado anteriormente por otros autores en la caracterización de polímeros<sup>33</sup>. Como referencia se utilizaron células tratadas con medio de cultivo y como control positivo se usó

---

<sup>30</sup> Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 1988;48(17):4827-33.

<sup>31</sup> Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;69(2):581-93

<sup>32</sup> Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

<sup>33</sup> Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Nov 6;55(12):7839-47. doi: 10.1167/iovs.14-14700.

una solución de cloruro de benzalconio al 0,005%<sup>34 35 36 37</sup> (BAK, Sigma-Aldrich, Madrid, España) en NaCl al 0,9%. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 5.2.5 ENSAYO DE TOLERANCIA OCULAR EN CONEJOS

El ensayo de tolerancia ocular *in vivo* se realizó con la formulación gelificante de CsA. Cada conejo recibió 25 µL de la formulación a ensayar en el ojo derecho cada 30 min durante 6 horas. El ojo contralateral recibió el mismo volumen de solución salina (solución de NaCl 0,9%) y se utilizó como control. A las tres, seis y veinticuatro horas después de la primera instilación se evaluaron macroscópicamente el malestar de los animales, los síntomas y signos en la conjuntiva, la córnea y las pestañas (Tabla 5.2) usando una modificación del sistema de puntuación establecido en las directrices de la Organización de Cooperación y Desarrollo<sup>38</sup> del año 2002 y los protocolos descritos por Enriquez y col<sup>39</sup>.

---

<sup>34</sup> Aguayo Bonniard A, Yeung JY, Chan CC, Birt CM. Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK). *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016 Jul 18:1-11.

<sup>35</sup> Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative study of *in vitro* ocular surface cytotoxicity of a fixed combination of 0.5% timolol/1% dorzolamide eyedrop and its components with 0.005% benzalkonium chloride. *Biocontrol Sci*. 2012;17(3):115-20.

<sup>36</sup> Pellinen P, Huhtala A, Tolonen A, Lokkila J, Maenpää J, Uusitalo H. The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium *in vitro* and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues *in vivo*. *Curr Eye Res*. 2012;37:145–154.

<sup>37</sup> Seibold LK, Ammar DA, Kahook MY. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity *in vitro*. *Curr Eye Res*. 2012;38:70–74.

<sup>38</sup> Organization for Economic Co-operation and Development. Test guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Available on-line at <http://www.oecd.org/2002> [7 jul 2016].

<sup>39</sup> Enriquez de Salamanca A, Calonge M, García Vázquez C, Callejo Vila A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2006:1416-25.

<b>Grado</b>	<b>Disconfort</b>	<b>Córnea</b>	<b>Conjuntiva</b>	<b>Secreción</b>	<b>Párpados</b>
<b>0</b>	No reacción	No alteración	No alteración	No secreción	No inflamación
<b>1</b>	Parpadeo	Opacidad moderada	Hiperemia moderada; edema moderado.	Secreción leve sin pelo humedecido	Inflamación moderada
<b>2</b>	Parpadeo aumentado; lagrimeo intenso; vocalización	Opacidad intensa	Hiperemia intensa; edema intenso; hemorragia	Secreción intensas con pelo humedecido	Inflamación intensa

**Tabla 5.2.** Sistema de graduación de la evaluación macroscópica de los signos y síntomas para el estudio de tolerancia *in vivo*.

### 5.2.6 ENSAYOS DE EFICACIA EN PERROS QUE PADECEN EL SÍNDROME DE OJO SECO

Estos estudios se realizaron en colaboración con el Dr. Alfonso Rodríguez Álvaro y la Dra. Elisa González Alonso-Alegre, profesores titulares de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid que son miembros del grupo de investigación. Se han realizado 2 estudios de eficacia para la evaluación de las formulaciones que contienen CsA al 0,1% vehiculizada en vesículas lipídicas. En el primer estudio se valoró una formulación liposomal que contenía hialuronato sódico al 0,4% (AH-L-CsA) desarrollada en el grupo de investigación y en el segundo se ensayó la formulación gelificante objeto de desarrollo en este trabajo (GG-L-CsA).

#### 5.2.6.1 PRIMER ESTUDIO EN PERROS CON SÍNDROME DE OJO SECO

En este estudio se diseñó un protocolo de evolución clínica que permitiera un seguimiento objetivo del SOS en perros de origen autoinmune o asociados a endocrinopatías leves moderadas y graves. Se consideró como principal dato de inclusión en el estudio que la prueba lagrimal de Schirmer estuviera por debajo de 15 milímetros en un minuto y presencia de signos clínicos compatibles con un síndrome de ojo seco. Se reclutaron los perros que cumplían el criterio de inclusión de forma consecutiva entre aquellos que acudían a la consulta de oftalmología del Hospital Clínico Veterinario Complutense. Todos los propietarios fueron informados sobre el procedimiento del estudio y firmaron su consentimiento.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a un ensayo clínico observacional temporal de 2 meses de duración en perros con síndrome de ojo seco. Los pacientes recibieron la formulación de CsA 3 veces al día.

Se utilizaron los siguientes indicadores diagnósticos del SOS:

(i) La prueba lagrimal de Schirmer (STT): es un método semicuantitativo que permite determinar el componente acuoso de la película lagrimal siendo, en la actualidad, la técnica más empleada en la clínica oftalmológica veterinaria para diagnosticar el SOS. Se realiza colocando una tira de papel de filtro de 5x35 mm, en el fondo de saco del tercio medial del párpado inferior durante 1 minuto sin emplear anestesia tópica. Mide tanto la producción basal lagrimal como la producción refleja provocada por la irritación generada por el papel del filtro. Los valores de STT normales en perros oscilan entre 16 y 24 mm/min.

En el SOS canino, valores de la STT por debajo de 15 mm/minuto se consideran significativos cuando están asociados a signos clínicos oculares.

(ii) Tinción de fluoresceína sódica: en oftalmología es particularmente útil en la valoración de la integridad de la superficie ocular. La fijación de la fluoresceína a la superficie ocular se debe a su acumulación en los espacios intercelulares debido a la alteración de las uniones de las células epiteliales y/o al daño de células epiteliales corneales y conjuntivales.

(iii) Presencia de secreciones mucosas: es uno de los posibles síntomas de SOS que se manifiestan habitualmente en la especie canina. Generalmente, se manifiesta asociada a una conjuntivitis mucopurulenta.

(iv) Paquimetría corneal: se utilizó un paquímetro (SP-100 TOMEY) que expresa la medida en  $\mu\text{m}$ . Determina el espesor de la córnea, y por tanto resulta indicador de la inflamación de la misma.

(v) Medida de estesiometría: se ha utilizado el estesiómetro de Cochet Bonnet que consiste en un filamento de nylon que toca la córnea (Figura 5.1). El dispositivo se basa en el principio de la presión transmitida axialmente por el monofilamento (diámetro conocido y longitud variable) para un esfuerzo de flexión determinado. La longitud del filamento es controlado por el dedo índice. Al disminuir la longitud se produce un aumento de la presión transmitida. Con una tabla de conversión especial es posible traducir la longitud en milímetros de filamento en una medida de presión expresada en milímetros de mercurio y posteriormente en unidades de  $\text{g}/\text{mm}^2$ .



**Figure 5.1.** *Medida de estesiometría en los perros*

#### 5.2.6.2 SEGUNDO ESTUDIO EN PERROS CON SOS

En este ensayo se planteó el tratamiento de perros con queratoconjuntivitis seca muy graves. Para este estudio el criterio de inclusión fue un STT inferior a 5 mm/min. Se reclutaron los perros que cumplían el criterio de inclusión de forma consecutiva entre aquellos que acudían a la consulta de oftalmología del Hospital Clínico Veterinario Complutense. Todos los propietarios fueron informados sobre el procedimiento del estudio y firmaron su consentimiento.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a un ensayo clínico observacional temporal de 2 meses de duración en perros con síndrome de ojo seco, en el que los pacientes recibieron la formulación elaborada 3 veces al día.

Se utilizaron los mismos indicadores de SOS que en el estudio anterior, añadiendo una exploración oftalmológica del estado de la conjuntiva (Tabla 5.3) y biopsias conjuntivales.

GRADO	SECRECIÓN	HIPEREMIA
0	Ausente	Ausente
1	Secreción mucoide	Hiperemia leve o moderada Conjuntiva con coloración rosácea encendida
2	Secreción purulenta	Hiperemia marcada Conjuntiva con coloración rojiza encendida y brillante

**Tabla 5.3.** Sistema de graduación de la exploración oftalmológica en conjuntiva para el estudio de la eficacia *in vivo* de la formulación liposomal gelificante con CsA al 0,1 % en perros con síndrome de ojo seco.

## **5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

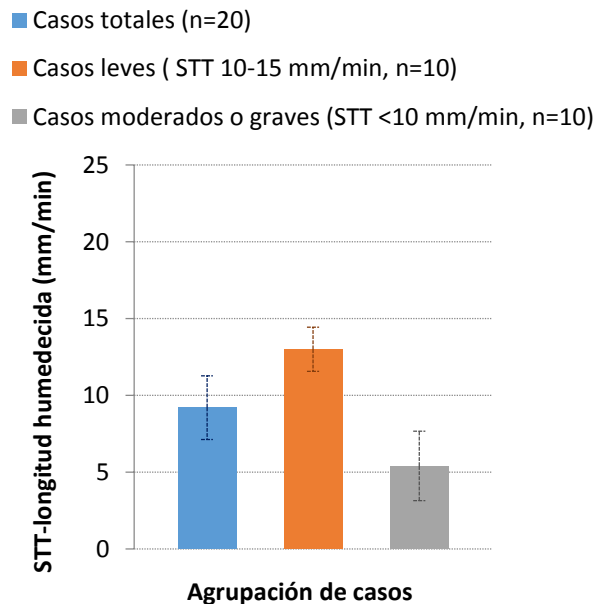
### **5.3.1 ESTUDIOS DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE CICLOSPORINA A CON HIALURONATO SÓDICO (AH-L-CSA) EN PERROS QUE PADECEN EL SÍNDROME DE OJO SECO**

Como se indicó anteriormente, para este primer estudio de eficacia se diseñó un protocolo de evolución clínica que permitiera un seguimiento objetivo del SOS en perros de origen autoinmune o asociados a endocrinopatías leves moderadas y graves (diabetes, hipotiroidismo y queratoconjuntivitis seca). Se consideró como principal dato de inclusión en el estudio que la prueba lagrimal de Schirmer estuviera por debajo de 15 milímetros en un minuto y presencia de signos clínicos compatibles con un síndrome de ojo seco.

El estudio se realizó mediante un ensayo clínico observacional temporal de 2 meses de duración, en el que los pacientes recibieron la formulación 3 veces al día. La formulación ensayada (AH-L-CsA) responde a la siguiente composición:

liposomas expresados en FC 20 mg/mL, Ch 2,5 mg/mL, vit-E 0,2 mg/mL, Hialuronato sódico 0,4% y CsA 0,1%.

En el ensayo se evaluaron 22 ojos con signos clínicos de SOS con un valor de Schirmer (STT) inferior a 15mm/min. En función de la gravedad del cuadro de SOS, los ojos se clasificaron en dos grupos: (i) casos leves cuando STT se encuentra entre 10 y 15 mm/min, y (ii) casos moderados y graves con STT inferior a 10 mm/min. El número de ojos de cada grupo, así como los valores de STT promedios obtenidos en cada caso se muestran en la Figura 5.2



**Figura 5.2.** Clasificación de los ojos en grupos en función de los valores iniciales de STT.

Los resultados promedios obtenidos en las diferentes pruebas realizadas al comienzo del ensayo y a los 60 días de tratamiento se recogen en la Tabla 5.4 y 5.5.

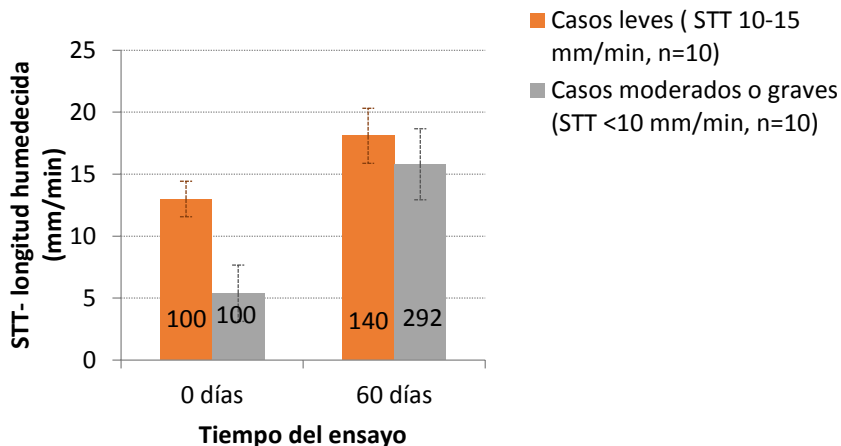
	<b>Casos leves (n=10)</b>	<b>Casos moderados y graves (n=10)</b>
<b>Producción lagrimal (STT, mm/min)</b>	13,0 ± 2,0	5,4 ± 3,2
<b>Tinción con fluoresceína (proporción de ojos con tinción positiva)</b>	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2
<b>Presencias de secreciones mucosas (proporción de ojos con exudados)</b>	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,2
<b>Espesor de la córnea (µm)</b>	673 ± 112	742 ± 228
<b>Sensibilidad corneal (g/mm<sup>2</sup>)</b>	6,5 ± 3,3	5,8 ± 5,0

**Tabla 5.4.** Resultados promedios ( $\pm$ DE) obtenidos en la exploración oftalmológica realizada a los animales al comienzo del estudio (tiempo 0).

	Casos leves (n=10)	Casos moderados y graves (n=10)
Producción lagrimal (STT, mm/min)	18,1 ± 2,0	15,8 ± 4,0
Tinción con fluoresceína (proporción de ojos con tinción positiva)	0	0,3 ± 0,15
Presencias de secreciones mucosas (proporción de ojos con exudados)	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2
Espesor de la córnea (µm)	662 ± 121	696 ± 155
Sensibilidad corneal (g/mm <sup>2</sup> )	3,6 ± 1,5	3,8 ± 3,5

**Tabla 5.5.** Resultados promedios ( $\pm$ DE) obtenidos en la exploración oftalmológica realizada a los animales a los 60 días de tratamiento con la formulación liposomal ensayada (AH-L-CsA).

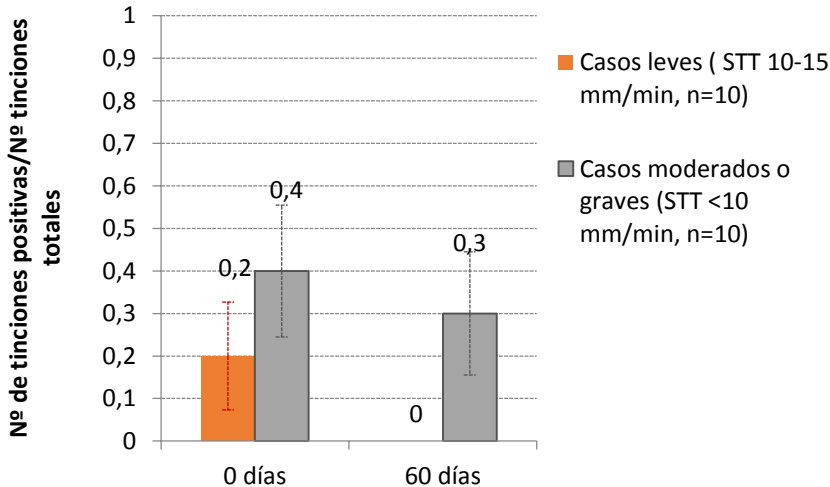
Se puede observar como después del tratamiento (Figura 5.3), la producción lagrimal (STT) se incrementó de forma significativa (contraste de medias,  $p < 0,001$ ) en los dos casos estudiados.



**Figura 5.3.** Comparación de los valores obtenidos en la prueba de Schirmer antes y después del tratamiento con la formulación liposomal ensayada (AH-L-CsA).

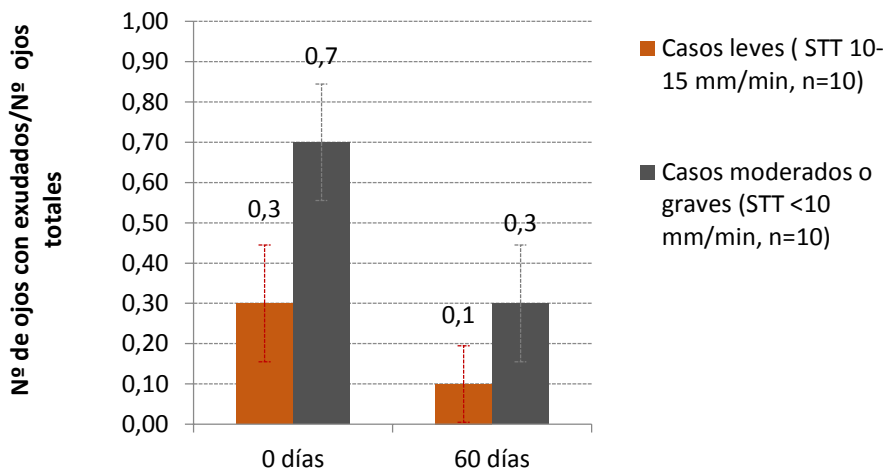
En ambos grupos, se alcanzaron valores promedios de STT superiores a 15 mm/min después del tratamiento. En el grupo de casos leves se produjo un aumento en el STT del 40% y en los casos moderados y graves el incremento fue de un 192%.

Al analizar el estado de la superficie ocular mediante exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura, tinción con fluoresceína (Figura 5.4), se observó una mejoría general en la integridad de la superficie ocular (todas las tinciones positivas iniciales y las obtenidas después del tratamiento fueron de grado 1). En los ojos leves después del tratamiento, no se originó ninguna tinción positiva pero en ninguno de los grupos se manifestaron diferencias significativas (test de McNemar,  $p=0,057$  para casos leves y  $p=0,327$  para moderados y graves).



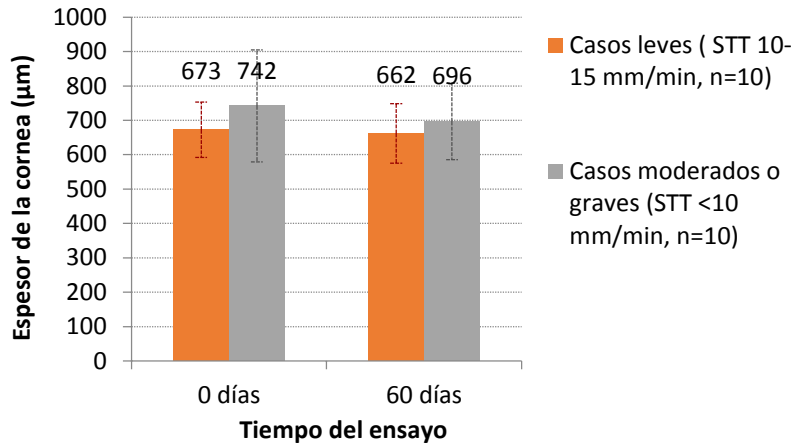
**Figura 5.4.** Comparación de los datos ( $\pm DE$ ) obtenidos en la tinción con fluoresceína antes y después del tratamiento con la formulación liposomal ensayada (AH-L-CsA).

La presencia de secreciones mucosas que habitualmente va asociada a conjuntivitis mucopurulenta, disminuyó en ambos grupos (Figura 5.5), aunque únicamente se manifestaron diferencias significativas en el grupo de mayor gravedad (test de McNemar,  $p=0,057$  para casos leves y  $p=0,005$  para moderados y graves). La secreción conjuntival positiva respondió a secreción de tipo mucoide.



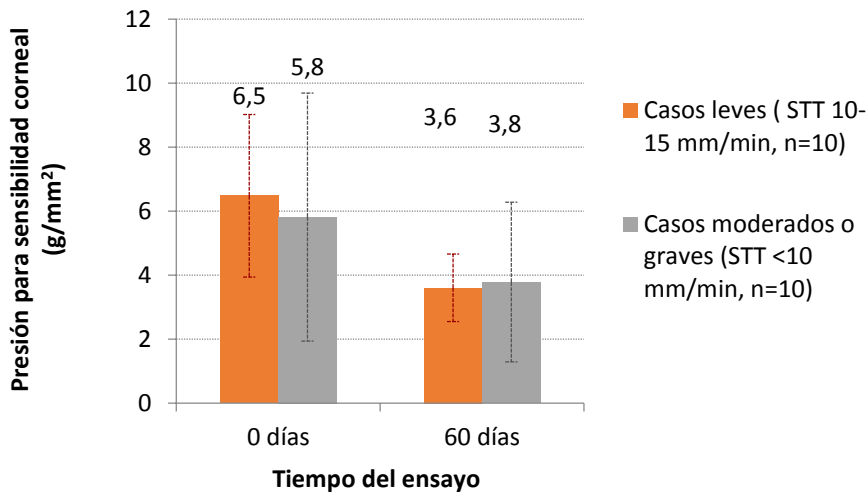
**Figura 5.5.** Comparación de los datos de presencia de secreciones ( $\pm DE$ ) obtenidos antes y después del tratamiento con la formulación liposomal ensayada (AH-L-CsA).

Los datos de paquimetría corneal (Figura 5.6) mostraron una ligera disminución promedio del espesor corneal: un 2% en los casos leves y un 4% en los moderados y graves. Estas pequeñas diferencias no fueron significativas (contraste de medias,  $p>0,05$ ).



**Figura 5.6.** Comparación de los datos de paquimetría corneal ( $\pm DE$ ) obtenidos antes y después del tratamiento con la formulación liposomal ensayada (AH-L-CSA).

La medida de la sensibilidad corneal (Figura 5.7) que se encuentra disminuida en los procesos inflamatorios, mejoró aunque no de forma significativa (contraste de medias,  $p > 0,05$ ). En la Figura 5.7 se puede observar los valores de presión necesaria para detectar respuesta en ambos grupos estudiados: disminuye en un 46% en el grupo de casos leves y en un 34% en el de moderados y graves.



**Figura 5.7.** Comparación de los datos de estesiometría ( $\pm DE$ ) obtenidos antes y después del tratamiento con la formulación liposomal ensayada (AH-L-CsA).

Estos resultados obtenidos con la formulación de CsA e hialuronato sódico confirman la actividad del preparado en tratamientos de 2 meses de duración. Estos resultados resultan todavía más relevantes si se considera que la ciclosporina A no es un fármaco de acción inmediata y necesita tratamientos prolongados. De aquí que los tratamientos habituales con este fármaco tengan una duración de 6 o más meses<sup>40</sup>.

<sup>40</sup> Leonardi A, Flamion B, Baudouin C. Keratitis in Dry Eye Disease and Topical Ciclosporin A. Ocul Immunol Inflamm. 2017 Feb 1:1-10.

### 5.3.2 SELECCIÓN DEL AGENTE GELIFICANTE Y CONCENTRACIÓN DEL MISMO EN LAS FORMULACIONES.

Dentro de los agentes gelificantes revisados en la bibliografía<sup>41 42 43 44 45</sup> se optó por los polisacáridos como la goma xantana, el alginato sódico y la goma gelano, que con carga negativa presentan la propiedad de formar geles en presencia de determinados cationes.

Se comenzó realizando estudios de tolerancia *in vitro* utilizando la línea celular de conjuntiva humana IOBA-NHC. En este ensayo se prepararon soluciones acuosas de los polímeros gelificantes utilizando como vehículo una solución isotónica de fructosa que presenta buena tolerancia ocular. Se ensayaron dos concentraciones de cada polímero, y los resultados obtenidos se recogen en la Figura 5.8.

---

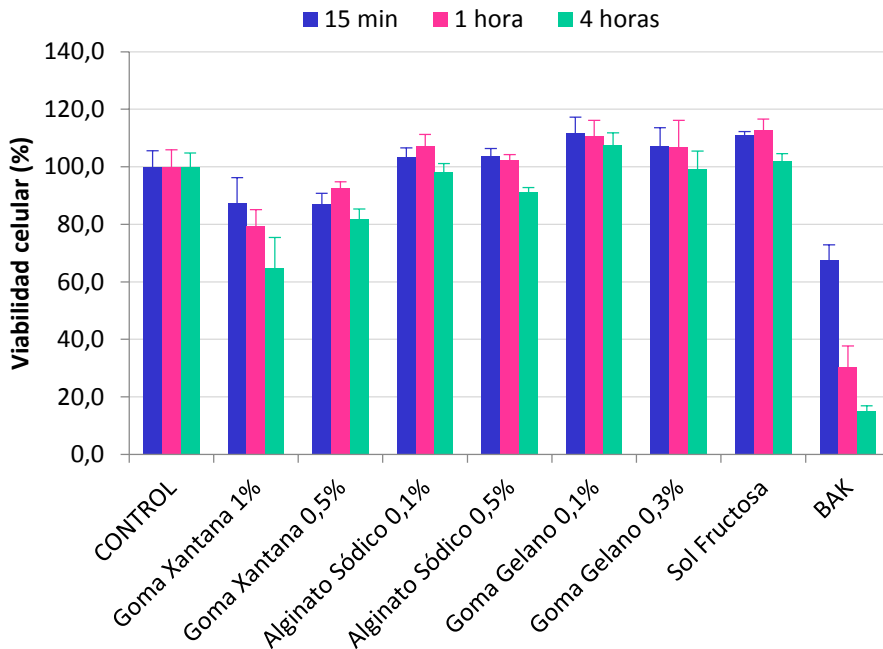
<sup>41</sup> Ahmed TA, Aljaeid BM. A potential *in situ* gel formulation loaded with novel fabricated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for enhancing and sustaining the ophthalmic delivery of ketoconazole. *Int J Nanomedicine*. 2017 Mar 8;12:1863-1875.

<sup>42</sup> Binsi PK, Nayak N, Sarkar PC, Joshy CG, Ninan G, Ravishankar CN. Gelation and thermal characteristics of microwave extracted fish gelatin-natural gum composite gels. *J Food Sci Technol*. 2017 Feb;54(2):518-530.

<sup>43</sup> Sarika PR, Nirmala RJ. Curcumin loaded gum arabic aldehyde-gelatin nanogels for breast cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Aug 1;65:331-7.

<sup>44</sup> Di Palma TM, Migliardini F, Caputo D, Corbo P. Xanthan and  $\kappa$ -carrageenan based alkaline hydrogels as electrolytes for Al/air batteries. *Carbohydr Polym*. 2017 Feb 10;157:122-127.

<sup>45</sup> Moawad FA, Ali AA, Salem HF. Nanotransfersomes-loaded thermosensitive *in situ* gel as a rectal delivery system of tizanidine HCl: preparation, *in vitro* and *in vivo* performance. *Drug Deliv*. 2017 Nov;24(1):252-260.



**Figura 5.8.** Resultados de viabilidad celular (+DE) obtenidos en la línea celular de conjuntiva IOBA-NHC con los polímeros gelificantes ensayados. Control positivo: cloruro de benzalconio al 0,005% (BAK).

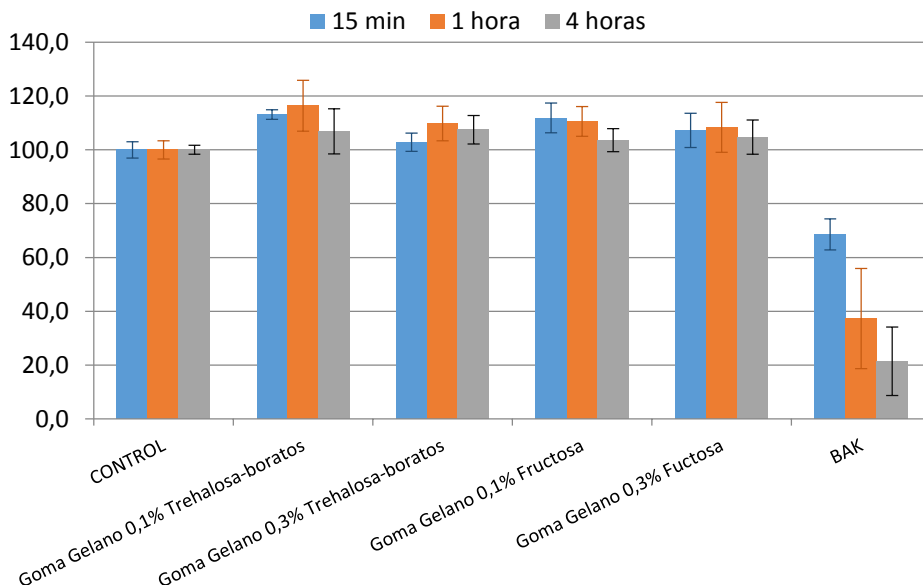
En la Figura 5.8 se puede observar que con las soluciones de goma gelano al 0,1% y 0,3% se obtienen valores de viabilidad que son mayores o iguales a 100%. Aunque inferiores a la goma gelano, el alginato sódico ha demostrado una buena tolerancia (viabilidades superiores al 90% a las 4 horas de contacto) tanto a concentraciones del 0,5% como del 1%. Sin embargo la goma xantana presenta una menor tolerancia e incluso al 1% a las 4 horas de tiempo de contacto, la viabilidad resulta inferior al 80%.

A la vista de estos resultados se optó por seleccionar la goma gelano como agente gelificante para las nuevos preparados de administración tópica ocular.

Se han estudiado diversos factores que afectan a la capacidad gelificante del producto. Mientras que la adición de azúcares y de polímeros bioadhesivos no

limitan la capacidad de gelificación, por el contrario, la incorporación de liposomas y la utilización de esterilización en autoclave (a 120°C) la reduce de forma apreciable. Si bien con la filtración esterilizante no se modifica la capacidad de formación de geles, se ha seleccionado el proceso de autoclavado debido a que este producto se obtiene por fermentación aeróbica de la glucosa mediante la bacteria *Sphingomonas Elodea*.

Teniendo en cuenta que nuestro grupo de investigación tiene una gran experiencia en la utilización de soluciones de trehalosa-boratos como vehículo en formulaciones para el tratamiento del ojo seco se planteó estudiar la tolerancia de la goma gelano en este vehículo y considerar la influencia de hipotonicidades próximas a 200 mOsm/L. Los resultados obtenidos en el estudio de viabilidad celular en la línea de conjuntiva humana IOBA-NHC se muestran en la Figura 5.9. Se puede comprobar que las soluciones hipotónicas ensayadas de goma gelano presentan, en todos los casos, viabilidades no inferiores al 100% en el intervalo de 0,1 al 0,3% de concentración.



**Figura 5.9.** Resultados de viabilidad celular ( $\pm$ DE) obtenidos en la línea celular de conjuntiva IOBA-NHC con soluciones hipotónicas de goma gelano en distintos vehículos. Control positivo: cloruro de benzalconio al 0,005% (BAK).

Aunque inicialmente se plantearon formulaciones que solo contenían goma gelano, finalmente se optó por una formulación que asociaba la goma gelano (0,25%) y la HPMC (0,12%). Esta formulación presenta la ventaja de una buena gelificación dentro del intervalo de concentraciones estudiadas en los ensayos de viabilidad.

### **5.3.3 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN GELIFICANTE CON CICLOSPORINA A.**

#### **5.3.3.1 COMPONENTES DE LA LÁGRIMA DE GELIFICACIÓN *IN SITU*.**

En el grupo de investigación se dispone de una línea de investigación de lágrimas artificiales que gelifican tras su administración sobre la superficie ocular. En esta línea se han desarrollado diferentes formulaciones a partir de la goma gelano, polisacárido seleccionado a partir de los resultados comentados previamente.

En la formulación gelificante seleccionada se encuentran asociados la goma gelano (0,25%) y la HPMC (0,12%). Esta composición mantiene la capacidad de formación de geles con electrolitos positivos que se encuentran en la lágrima natural (sodio, calcio, magnesio y potasio) y se puede administrar como colirio de baja viscosidad.

La concentración de liposomas se ajustó para que los geles formados resultasen lo menos opacos posible. La capacidad gelificante de las formulaciones ha sido ajustada adecuadamente mediante la adición de pequeñas concentraciones de cloruro sódico y cloruro potásico.

La composición de la formulación gelificante a partir de la cual se va a desarrollar la formulación de Ciclosporina A se recoge en la Tabla 5.6 y la proporción de componentes en los liposomas en la Tabla 5.7.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Goma Gelano	0,25 %
HPMC	0,12 %
Liposomas	0,5 % expresada en concentración de FC
NaCl	0,05 %
KCl	0,05 %
Ascorbil fosfato sódico	0,022 %
Trehalosa	1,68 %
Tetraborato sódico	0,076 %
Acido bórico	0,838 %

**Tabla 5.6.** *Composición de la lagrima artificial gelificante seleccionada para la incorporación de la CsA*

COMPONENTE	PROPORCIÓN
Fosfatidilcolina	8
Colesterol	1
Vitamina E	0,08

**Tabla 5.7.** *Proporción de componentes en la composición de los liposomas.*

### 5.3.3.2 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA FORMULACIÓN GELIFICANTE CON CICLOSPORINA A

La CsA como un componente altamente lipofílico se va a incorporar en la bicapa lipídica de los liposomas y permanecerá encapsulado durante el almacenamiento debido a su elevado coeficiente de partición.

Por tanto, la capacidad de encapsulación de la ciclosporina A en los liposomas es la que va a limitar su concentración en el preparado final. Hasta el momento se había trabajado con proporciones de FC:CsA de 20:1, y de esta forma, la concentración de ciclosporina A en la formulación gelificante con un 0,5% de FC era de 0,025%. Dado que esta concentración resultaba demasiado baja para el tratamiento terapéutico del SOS, se optimizó la preparación de los liposomas con el fin de incorporar mayor cantidad de principio activo.

Se realizaron ensayos de determinación de capacidad máxima de encapsulación de Ciclosporina A, obteniéndose un valor de 20:1,6 para la relación FC:CsA. En la Tabla 5.8 se puede observar como a medida que se incorpora mayor cantidad de CsA en la formulación, se reduce el tamaño de las vesículas formadas.

PROPORCIÓN FC: CSA	DIÁMETRO VOLUMEN VESICULAS (nm)
20:0	164
20:1,2	96,7
20:1,6	76,0

**Tabla 5.8.** *Relación entre la proporción de FC:CsA y el tamaño de las vesículas formadas.*

Para obtener en la formulación gelificante la misma concentración de CsA (0,1%) que en la formulación con Hialuronato sódico, fue necesario aumentar la concentración de liposomas al 1,25% (expresada en concentración de FC). A su vez fue necesario aumentar la concentración de iones positivos para mantener la capacidad gelificante de la formulación.

En la Tabla 5.9 se recoge la composición final de la formulación gelificante elaborada con CsA al 0,1% (GG-L-CsA).

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Goma gelano	0,25 %
HPMC	0,12 %
Liposomas	1,25 % expresada en concentración de FC
Ciclosporina A	0,1%
NaCl	0,05 %
KCl	0,1 %
Ascorbil fosfato sodico	0,022 %
Trehalosa	1,68 %
Tetraborato sódico	0,076 %
Acido borico	0,838 %

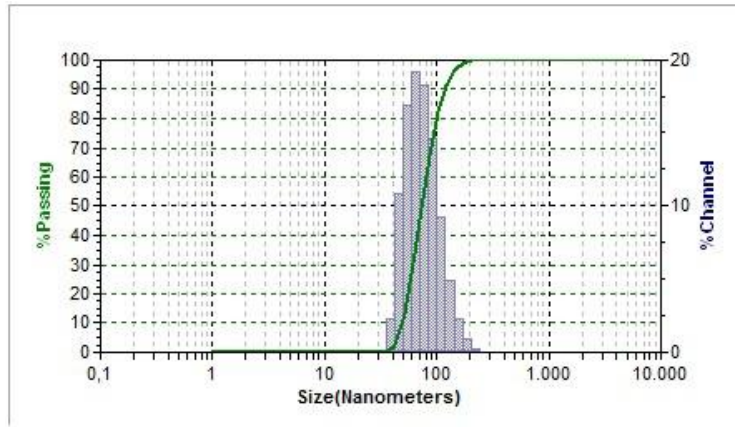
**Tabla 5.9.** *Composición de la preparación gelificante que contiene ciclosporina A al 0,1%.*

Las características fisicoquímicas de la dispersión de liposomas (sistema intermedio) y de la formulación gelificante con CsA se recogen en la Tabla 5.10.

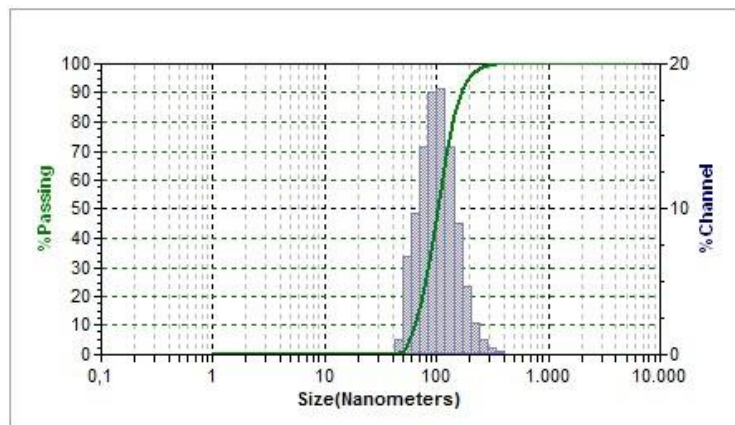
	Dispersión liposomal: → FC, 50 mg/mL → CsA, 0,4 mg/mL	Formulación gelificante: CsA al 0,1%
Tamaño de las vesículas lipídicas (nm)	80,4 ± 3,8	112,9 ± 3,2
pH	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1
Viscosidad (mPa·s)	1,2 ± 0,1	6,2 ± 0,2
Tensión superficial (mN/m)	-	41,0 ± 0,9
Osmolaridad (mOsm/L)	256 ± 1,8	276 ± 1,6

**Tabla 5.10.** Características fisicoquímicas de la dispersión liposomal (sistema intermedio) y de la formulación gelificante con CsA.

El análisis de tamaño de las vesículas lipídicas de la dispersión liposomal y de la formulación gelificante, ambas con CsA, muestra que la distribución unimodal de los liposomas iniciales se mantiene (Figuras 5.10 y 5.11) pero se modifica el tamaño de los mismos (de 80,4 pasa a 112,9 nm). Este incremento también se manifiesta cuando se trabaja con hialuronato sódico y sin embargo no se manifiesta con la HPMC. A partir de estos comportamientos se puede teorizar que los polímeros con carga negativa como la goma gelano y el ácido hialurónico interaccionan más fácilmente y de forma más estable con la superficie de los liposomas que los polímeros neutros como la HPMC, lo que supone un aumento en el volumen de la estructura medida.



**Figura 5.10** Distribución de tamaño de las vesículas lipídicas obtenida en la dispersión liposomal de CsA.



**Figura 5.11.** Distribución de tamaño de las vesículas lipídicas obtenida en la formulación gelificante de CsA.

Los valores de pH de la formulación gelificante liposomal (Tabla 5.10) se encuentran dentro del intervalo de pH fisiológico de la lágrima natural (7-7,4)

por lo que se evita que se produzcan molestias en el momento de la aplicación<sup>46</sup>  
47.

La formulación gelificante ha sido planteada como un preparado ligeramente hipotónico (276 mOsm/L) capaz de paliar la hipertonidad que se manifiesta en las situaciones patológicas de ojo seco<sup>48</sup>. El valor de tensión superficial del preparado se encuentra próximo a los que presenta la película lagrimal (44-46 mN/m<sup>49 50 51</sup>), y además, los polímeros utilizados van a actuar como agentes humectantes favoreciendo la estabilidad de la película precorneal<sup>52</sup>.

En las Figura 5.12 y 5.13 se muestran los reogramas obtenidos para la dispersión liposomal y la formuación gelificante de CsA.

---

<sup>46</sup> YamadaM, Mochikuzi H, Hata Y, Mashima Y. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. *Current eye research* 1998;17:1005-1009.

<sup>47</sup> Carney LG, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;Apr;30:747-54.

<sup>48</sup> Kim M, Kim HS, Na KS. Correlation between Tear Osmolarity and Other Ocular Surface Parameters in Primary Sjögren's Syndrome. *Korean J Ophthalmol.* 2017 Feb;31(1):25-31.

<sup>49</sup> Nagyova B, Tiffany JM. Components for responsible Surface tension of human tears. *Current Eye Research.* 1999;19:4-11.

<sup>50</sup> Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye* 2003;17:1-4.

<sup>51</sup> Bron AJ Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Experimental Eye Research* 2004;78:347-36.

<sup>52</sup> Lemp MA, holly FJ. Ophthalmic polymers as ocular wetting agents. *Annals of Ophthalmology* 1972;4:15-20.

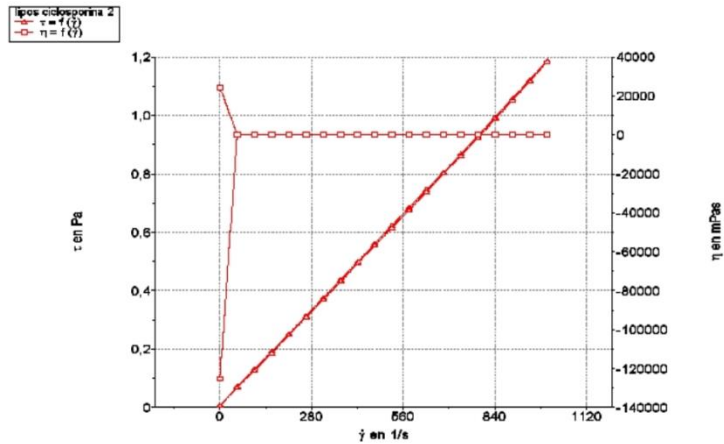


Figura 5.12. Reograma de la dispersión liposomal de CsA (sistema intermedio).

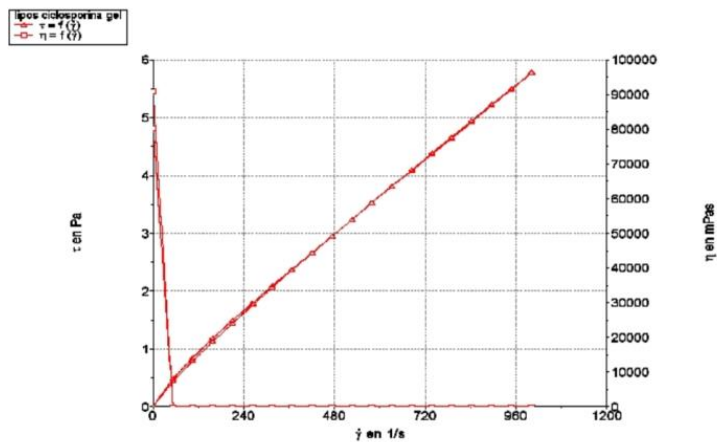


Figura 5.13. Reograma de la formulación gelificante de CsA (GG-L-CsA).

Se puede observar un comportamiento newtoniano para la dispersión liposomal. En la formulación gelificante, excepto a velocidades de cizalla bajas, también se manifiesta un comportamiento newtoniano. Los valores promedio de viscosidad obtenidos para la dispersión liposomal y para la formulación gelificante son de 1,2 y 6,2 mPa·s, respectivamente. Ambos valores se encuentran dentro del intervalo de viscosidades de la lagrime humana (0,3 a 8,3

mPa.s)<sup>53 54</sup>. El valor de viscosidad en la formulación gelificante asegura su fácil administración como colirio.

#### 5.3.4 CARACTERIZACIÓN DEL GEL FORMADO POR SIMULACIÓN *IN SITU*

Para imitar la situación en la que la formulación gelificante de CsA se va a gelificar *in situ* tras su administración en la superficie ocular, se ha diluido la formulación con fluido lacrimal simulado en la proporción 25:7 (volumen de aplicación 25  $\mu$ L y volumen de la película lagrimal 7  $\mu$ L)<sup>55</sup>. El fluido lagrimal simulado únicamente aporta los electrolitos de la lágrima natural que permiten la formación del gel.

El fluido lacrimal simulado se preparó de acuerdo a la siguiente composición: NaCl al 0,577%, KCl al 0,211%, CaCl<sub>2</sub> al 0,013%, MgCl<sub>2</sub> al 0,0076% y bicarbonato sódico al 0,218%<sup>56 57</sup>. La fuerza iónica del medio fue 0,317.

En los estudios reológicos, una vez formado el gel *in situ* se dejó en reposo durante 90 segundos antes del comienzo del ensayo. Se realizaron curvas de flujo tanto en la modalidad CR que permite evaluar el comportamiento del gel frente a grandes deformaciones como en la modalidad CS, que se centra en estudios oscilatorios donde se mantiene intacta la estructura del gel durante las mediciones.

---

<sup>53</sup> Yamaguchi M Ueda K Isowaki A Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:1266–1271.

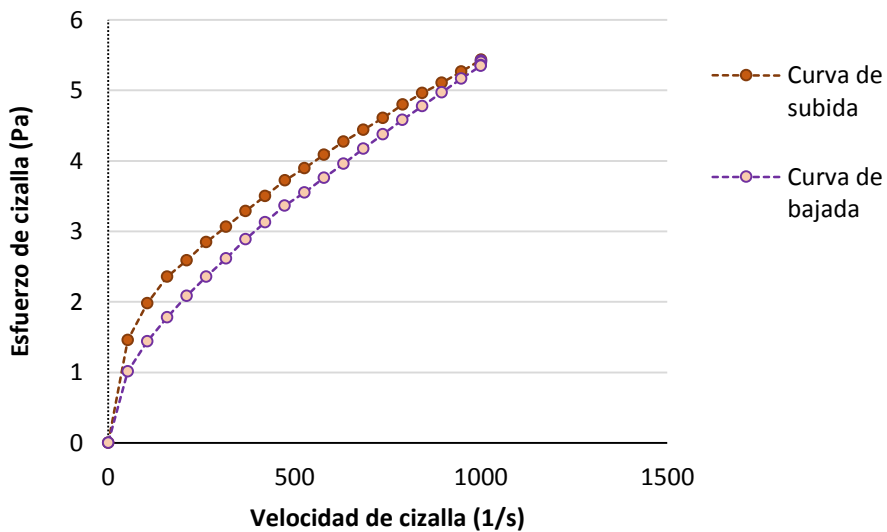
<sup>54</sup> Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991;15:371–376.

<sup>55</sup> Kesavan K, Nath G, Pandit JK. Preparation and in vitro antibacterial evaluation of gatifloxacin mucoadhesive gellan system. *Daru.* 2010;18(4):237-46.

<sup>56</sup> Díaz-Valle David. Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular: Diagnóstico y tratamiento en Xerodacriología. *Arch Soc Esp Oftalmol* [Internet]. 2008 Sep [citado 2017 Mar 30]; 83(9):569-569.

<sup>57</sup> Lorentz H, Heynen M, Trieu D, Hagedorn SJ, Jones L. The impact of tear film components on in vitro lipid uptake. *Optom Vis Sci.* 2012 Jun;89(6):856-67.

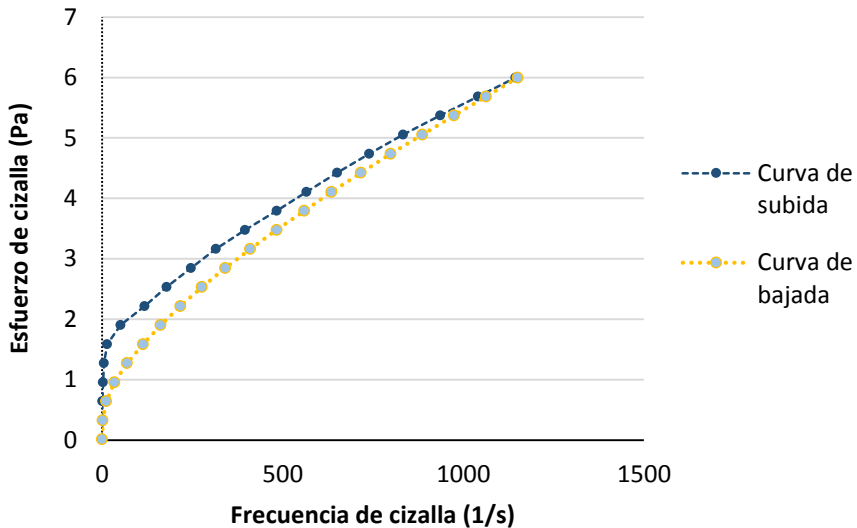
Los resultados obtenidos para la modalidad CR utilizando un gradiente de 0 a 1000  $\text{s}^{-1}$  se recogen en la Figura 5.14. Se puede observar un comportamiento pseudoplástico con un ciclo de histéresis denominado ciclo de tixotropía. Se obtienen valores de viscosidad más elevados durante la primera medida, (subida de velocidad de cizalla), que durante la segunda, al disminuir paulatinamente la velocidad de cizalla. La viscosidad dinámica calculada a velocidades de cizalla elevadas entre 800 y 1000  $\text{s}^{-1}$  es de 3,0 mPa·s.



**Figura 5.14.** Curva de flujo correspondiente al gel obtenido in situ con la formulación gelificante de CsA (modo CR).

Cuando se realiza la curva de flujo en modalidad CS (Figura 5.15), se puede observar que además del comportamiento pseudoplástico se aprecia un esfuerzo umbral para comenzar la deformación, de forma que se manifiesta un modelo de fluido de Herschel-Bulkley. A velocidades bajas se refleja el comportamiento elástico y a velocidades altas el viscoso.

En este caso se puede calcular el esfuerzo umbral como valor extrapolado en el eje Y, obteniéndose un valor de 1,71 Pa. La viscosidad dinámica calculada entre 800 y 1150 s<sup>-1</sup> es de 3,5 mPa·s, valor muy similar al obtenido con el modo CR.



**Figura 5.15.** Curva de flujo correspondiente al gel obtenido *in situ* con la formulación gelificante de CsA (modo CS).

El comportamiento viscoelástico se evaluó mediante ensayos oscilatorios a diferentes frecuencias. Como paso previo a la obtención de los espectros mecánicos, se ha establecido el intervalo de viscoelasticidad lineal mediante barridos de esfuerzo o deformación. El intervalo de deformación ensayado fue desde 0,01 a 10 Pa y la frecuencia se fijó en 1 Hz (Figura 5.16). El punto donde se quiebra la linealidad del módulo  $G'$  se le denomina esfuerzo crítico ( $E_c$ ) y se produce a un valor entre 1,5 y 2,3 Pa. Este dato representa la tensión a la que se genera la pérdida de la estructura del gel.

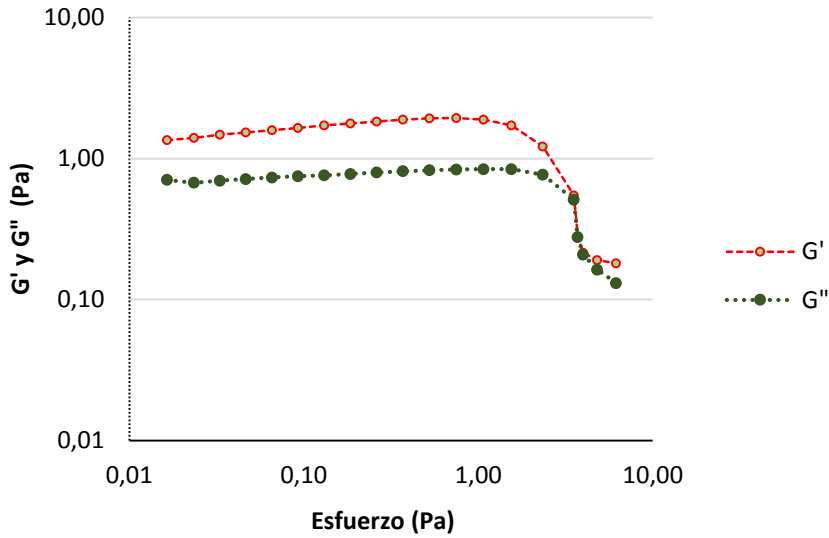


Figura 5.16. Barrido de esfuerzo realizado a una frecuencia fija de 1 Hz.

El barrido de frecuencia (Figura 5.17) se ha llevado a cabo a una amplitud de esfuerzo fija (0,3 Pa), localizada dentro del intervalo de viscoelasticidad lineal lo que asegura el mantenimiento de la estructura de gel.

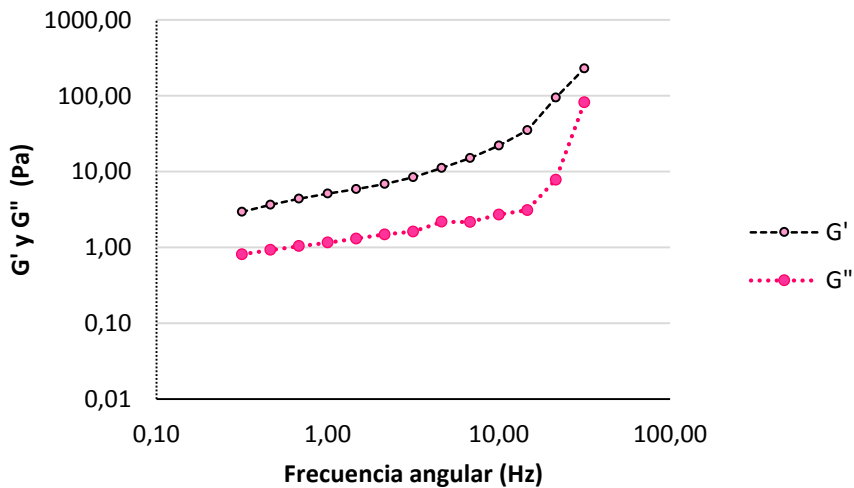


Figura 5.17. Barrido de frecuencia realizado a un esfuerzo fijo de 0,3 Pa.

El espectro mecánico recogido en la Figura 5.17, muestra que  $G'$  es mayor que  $G''$  y por tanto el gel manifiesta propiedades viscoelásticas con un comportamiento de gel elástico (tangente del ángulo de desfase o pérdida  $< 0,15$ )<sup>58</sup>.

A frecuencias intermedias (1-10 Hz), los valores de  $G'$  y  $G''$  muestran una baja dependencia de la frecuencia lo que evidencia una estructura que favorece la estabilidad física del sistema. Así mismo, en este intervalo se produce una separación entre las curvas correspondientes a  $G'$  y  $G''$  lo que podría indicar que se va formando una pequeña fracción de sol que no forma parte de la red polimérica gelificada y la fracción de gel restante aumenta su elasticidad.

A frecuencias altas, a partir de 20 Hz, el modulo viscoso ( $G''$ ) aumenta más rápidamente que el modulo elástico ( $G'$ ), lo que significa una pérdida acusada de la respuesta elástica.

### 5.3.5 ESTUDIOS DE TOLERANCIA OCULAR *IN VIVO*

Este estudio se llevó a cabo con la formulación gelificante de CsA al 0,1%.

Como se indicó en el apartado de materiales y métodos, antes de comenzar el ensayo de tolerancia, se realizó un estudio macroscópico de la superficie ocular de los conejos para confirmar que no sufrían daño o alteraciones en la misma. En el análisis previo se observó que todos los animales (n=6) mostraron una superficie ocular normal y se les asignó un valor inicial de cero para todos los parámetros estudiados.

La administración de la formulación se realizó de acuerdo al protocolo indicado en materiales y métodos.

---

<sup>58</sup> Avanza MV, Puppo MC, Añón MC. Structural Characterization of Amaranth Protein Gels. Journal of Food Science 2005;70(3):E223-E229.

Los conejos no mostraron signos de molestias durante el ensayo, ni a las 24 horas después de haber comenzado el mismo. La córnea se mantuvo transparente a lo largo del ensayo y la conjuntiva mantuvo su coloración normal. Ningún animal presentó secreción mucosa durante las 24 horas de la realización del estudio (Tabla 5.11).

SINTOMA	RESULTADO DEL ENSAYO
DISCONFORT	No hay reacción (Grado 0)
CÓRNEA	No se presentan alteraciones (Grado 0)
CONJUNTIVA	No se presentan alteraciones (Grado 0)
SECRECIONES	No hay presencia de secreciones (Grado 0)
PÁRPADOS	No hay inflamación (Grado 0)

**Tabla 5.11.** *Evaluación macroscópica de los signos y síntomas en el estudio de tolerancia in vivo para la formulación gelificante de CsA al 0,1%.*

Estos resultados demuestran la buena tolerancia *in vivo* de la formulación gelificante desarrollada.

### 5.3.6 ESTUDIOS DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN GELIFICANTE DE CICLOSPORINA A (GG-L-CSA) EN PERROS QUE PADECEN EL SÍNDROME DE OJO SECO

En este ensayo se planteó el tratamiento de perros con queratoconjuntivitis seca muy graves. Para este estudio el criterio de inclusión fue un STT inferior a 5 mm/min.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a un ensayo clínico observacional temporal de 2 meses de duración en perros con síndrome de ojo seco, en el que los pacientes recibieron la formulación seleccionada 3 veces al día.

Se han tratado un total de 5 ojos con queratoconjuntivitis seca grave. Los resultados promedios obtenidos en las diferentes pruebas realizadas al comienzo del ensayo y a los 60 días de tratamiento se recogen en la Tabla 5.12.

	Tiempo 0 (n=5)	Tiempo 60 días (n=5)
<b>Producción lagrimal (STT, mm/min)</b>	0,4 ± 0,9	1,2 ± 2,7
<b>Tinción con fluoresceína (proporción de ojos con tinción positiva)</b>	1 ± 0	0,8 ± 0,2
<b>Presencias de secreciones mucosas (proporción de ojos con exudados)</b>	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2
<b>Espesor de la córnea (µm)</b>	673 ± 125	672 ± 98
<b>Sensibilidad corneal (g/mm<sup>2</sup>)</b>	12,5 ± 3,1	9,1 ± 7,2
<b>Hiperemia (proporción de ojos con hiperemia)</b>	1 ± 0	1 ± 0

**Tabla 5.12.** Resultados promedios ( $\pm$  DE) obtenidos en la exploración oftalmológica realizada a los animales al comenzar el ensayo y a los 60 días de tratamiento con la formulación gelificante de ciclosporina A.

Además, se realizaron biopsias conjuntivales en las que se apreció un proceso inflamatorio con células plasmáticas y linfocitos que se graduó del 1 al 4 y los resultados se recogen en la Tabla 5.13. Tan solo en dos ojos se produjo una disminución de la infiltración inflamatoria.

Número de ojo	Inflamación (tiempo 0)	Inflamación (tiempo 60 días)
1	1 sobre 4	3 sobre 4
2	3 sobre 4	2 sobre 4
3	3 sobre 4	2 sobre 4
4	2 sobre 4	2 sobre 4
5	2 sobre 4	2 sobre 4

**Tabla 5.13.** Resultados obtenidos en las biopsias conjuntivales.

No se ha realizado el análisis estadístico de los datos porque el número de datos de la muestra es tan bajo que los resultados no son extrapolables a la población.

No obstante los resultados obtenidos se pueden resumir en los siguientes comentarios:

- En ningún caso se produjeron reacciones adversas en el momento de la instilación.
- En un ojo se produjo un incremento de la prueba lagrimal de Schirmer.
- La paquimetría corneal no mostro variaciones significativas.
- La sensibilidad corneal aumentó ligeramente.
- El grado de tinción con fluoresceína mejoró en tres de los ojos.
- Los signos de conjuntivitis no mostraron diferencias según indican el nivel de hiperemia y la secreción conjuntival.

A pesar de algunos de los efectos beneficiosos observados, al tratarse de perros con patologías muy graves (hipoplasia glandular severa) resulta difícil encontrar una mejoría satisfactoria. Estos cuadros tan severos no se pueden manejar con monoterapia de CsA y requieren tratamientos más complejos.

## **5.4 BIBLIOGRAFÍA**

Aguayo Bonniard A, Yeung JY, Chan CC, Birt CM. Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK). *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016 Jul 18:1-11.

Ahmed TA, Aljaeid BM. A potential in situ gel formulation loaded with novel fabricated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for enhancing and sustaining the ophthalmic delivery of ketoconazole. *Int J Nanomedicine*. 2017 Mar 8;12:1863-1875.

Andrés-Guerrero V, Molina-Martínez IT, Peral A, de las Heras B, Pintor J, Herrero-Vanrell R. The Use of Mucoadhesive Polymers to Enhance the Hypotensive Effect of a Melatonin Analogue, 5-MCA-NAT, in Rabbit Eyes *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011;52:1507-1515.

Avanza MV, Puppo MC, Añón MC. Structural Characterization of Amaranth Protein Gels. *Journal of Food Science* 2005;70(3):E223-E229.

Ayaki M, Iwasawa A, Niwano Y. Comparative study of in vitro ocular surface cytotoxicity of a fixed combination of 0.5% timolol/1% dorzolamide eyedrop and its components with 0.005% benzalkonium chloride. *Biocontrol Sci*. 2012;17(3):115-20.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*. 1965;13:238-252.

Barabino S, Chen Y, Chauhan S, R. D. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2012 May;31:271-285.

Binsi PK, Nayak N, Sarkar PC, Joshy CG, Ninan G, Ravishankar CN. Gelation and thermal characteristics of microwave extracted fish gelatin-natural gum composite gels. *J Food Sci Technol*. 2017 Feb;54(2):518-530.

Bron AJ Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Experimental Eye Research* 2004;78:347-36.

Carney LG, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;Apr;30:747-54.

El-Asrar AM, Tabbara KF, Geboes K, et al. An immunohistochemical study of topical cyclosporine in vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121:156-61.

Dai Y, Zhou R, Liu L, Lu Y, Qi J, Wu W. Liposomes containing bile salts as novel ocular delivery systems for tacrolimus (FK506): in vitro characterization and improved corneal permeation, *Int. J. Nanomed.* 2013;8:1921–1933.

De Paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2008;71:89-95.

Díaz-Valle D. Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular: Diagnóstico y tratamiento en Xerodacriología. *Arch Soc Esp Oftalmol* [Internet]. 2008 Sep [citado 2017 Mar 30]; 83(9):569-569.

Diebold Y, Calonge M, Enríquez de Salamanca A. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4263–4274.

Di Palma TM, Migliardini F, Caputo D, Corbo P. Xanthan and  $\kappa$ -carrageenan based alkaline hydrogels as electrolytes for Al/air batteries. *Carbohydr Polym.* 2017 Feb 10;157:122-127.

Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses, *Surv. Ophthalmol.* 2009;54:321–338.

Enriquez de Salamanca A, Calonge M, García Vazquez C, Callejo vila A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular Surface:

toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2006;1416-25.

Fernández-Ferreiro A, Silva-Rodríguez J, Otero-Espinar FJ, González-Barcia M, Lamas MJ, Ruibal A, Luaces-Rodríguez A et al. In vivo eye surface residence determination by high-resolution scintigraphy of a novel ion-sensitive hydrogel based on gellan gum and kappa-carrageenan. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017 May;114:317-323.

Kesavan K, Nath G, Pandit JK. Preparation and in vitro antibacterial evaluation of gatifloxacin mucoadhesive gellan system. *Daru*. 2010;18(4):237-46.

Kim M, Kim HS, Na KS. Correlation between Tear Osmolarity and Other Ocular Surface Parameters in Primary Sjögren's Syndrome. *Korean J Ophthalmol*. 2017 Feb;31(1):25-31.

Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: A prospective randomized case-control study. *American Journal of Ophthalmology* 2005;139(2):242-6.

Lallemand, F., Felt-Bayens, O., Besseghir, K., et al. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2013;56:307–318.

Lallemand F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: a comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017 Mar 14. pii: S0939-6411(16)30908-0.

Lemp, M.A. The definition and classification of dry eye disease: Report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop 2007. *Ocul Surf* 2007;5:75-92.

Lemp MA, Holly FJ. Ophthalmic polymers as ocular wetting agents. *Annals of Ophthalmology* 1972;4:15-20.

Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;69(2):581-93.

Lorentz H, Heynen M, Trieu D, Hagedorn SJ, Jones L. The impact of tear film components on *in vitro* lipid uptake. *Optom Vis Sci*. 2012 Jun;89(6):856-67.

Mahdi MH, Conway BR, Smith AM. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. *Int J Pharm*. 2015 Jul 5;488(1-2):12-9.

Mahdi MH, Conway BR, Mills T, Smith AM. Gellan gum fluid gels for topical administration of diclofenac. *Int J Pharm*. 2016 Dec 30;515(1-2):535-542.

Miljanovic B, Trivedi KA, Dana MR, Gilbard JP, Buring JE, Schaumberg DA. Relation between dietary n -3 and n -6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82:887-893.

Moawad FA, Ali AA, Salem HF. Nanotransfersomes-loaded thermosensitive *in situ* gel as a rectal delivery system of tizanidine HCl: preparation, *in vitro* and *in vivo* performance. *Drug Deliv*. 2017 Nov;24(1):252-260.

Moss SE, Klein R, Klein BEK. Long-term Incidence of Dry Eye in an Older Population. *Optometry & Vision Science* 2008;85:668-674.

Nagyova B, Tiffany JM. Components for responsible Surface tension of human tears. *Current Eye Research*. 1999;19:4-11.

Organization for Economic Co-operation and Development. Test guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Available on-line at <http://www.oecd.org>2002 [7 jul 2016].

Osmatek T, Froelich A, Tasarek S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int J Pharm*. 2014 May 15;466(1-2):328-40.

Pellinen P, Huhtala A, Tolonen A, Lökkilä J, Maenpää J, Uusitalo H. The cytotoxic effects of preserved and preservative-free prostaglandin analogs on human corneal and conjunctival epithelium *in vitro* and the distribution of benzalkonium chloride homologs in ocular surface tissues *in vivo*. *Curr Eye Res.* 2012;37:145–154.

Power WJ, Mullane P, Farrell M, Collum LM. Effect of topical cyclosporin A on conjunctival T cells in patients with secondary Sjögren's syndrome. *Cornea* 1993;12:507-11.

Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye. A twenty-five-year review. *Cornea* 2000;19:644-649.

Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Work Shop. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. *The Ocular Surface* 2007 Apr;5;2.

Rocha EM, Mantelli F, Nominato LF, Bonini S. Hormones and dry eye syndrome: an update on what we do and don't know. *Curr Opin Ophthalmol* 2013 Jul;24:348-355.

Sarika PR, Nirmala RJ. Curcumin loaded gum arabic aldehyde-gelatin nanogels for breast cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 Aug 1;65:331-7.

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research.* 1988;48(17):4827-33.

Seibold LK, Ammar DA, Kahook MY. Acute effects of glaucoma medications and benzalkonium chloride on pre-adipocyte proliferation and adipocyte cytotoxicity *in vitro*. *Curr Eye Res.* 2012;38:70–74.

Shen Y, Tu J. Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes, *AAPS J.* 2007;9:E371–377.

Sullivan DA, Wickham L, Toda I, Gao J. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat, rabbit, and human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;35:S651.

Tang-Liu D, Richman J, Weinkam R, Takruri H. Effects of four penetration enhancers on corneal permeability of drugs in vitro, *J. Pharm. Sci.* 1994;83:85-90.

Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye* 2003;17:1-4.

Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991;15:371–376.

Tseng SG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic Membrane Transplantation With or Without Limbal Allografts for Corneal Surface Reconstruction in Patients With Limbal Stem Cell Deficiency. *Arch Ophthalmol.*1998;116(4):431-441.

Utine CA, Stern M, Akpek EK. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporin A, *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2010;18:352–361

Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:7839-7847.

YamadaM, Mochikuzi H, Hata Y, Mashima Y. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. *Current eye research* 1998;17:1005-1009.

Yamaguchi M Ueda K Isowaki A Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:1266-1271.



## **6. DISCUSIÓN GENERAL**



Como se indicó en el apartado dos de esta memoria el objetivo de la Tesis Doctoral fue desarrollar nuevos nanosistemas que permitan la administración tópica ocular de sustancias activas que en formas de dosificación clásicas presentan problemas de formulación.

Se trata de fármacos que pertenecen a la clase IV del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), que ven limitada su utilización como preparados convencionales de aplicación ocular debido a su baja solubilidad y/o baja permeabilidad.

Como principios activos indicadores se han utilizado la acetazolamida que actualmente no se utiliza por vía tópica ocular y la ciclosporina A que en formulaciones convencionales se utiliza a dosis elevadas.

### **6.1 PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOTENSORA DE NANOSISTEMAS DE ACETAZOLAMIDA DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.**

El glaucoma es una neuropatía óptica progresiva que se caracteriza por una pérdida de las células ganglionares de la retina y de sus axones. Dentro de los factores de riesgo de la enfermedad se encuentra el aumento de la presión intraocular. Se considera que existe hipertensión ocular cuando los valores de

la PIO se encuentran por encima de 21 mmHg<sup>1 2</sup>. El glaucoma es una enfermedad cuya prevalencia va en aumento debido al incremento de la esperanza de vida. El tratamiento de la enfermedad puede ser farmacológico, láser o quirúrgico y se encamina a frenar la progresión de la enfermedad o enlentecerla en la mayoría de los pacientes<sup>3</sup>. El tratamiento farmacológico es el más frecuente y consiste en la instilación del preparado una o dos veces al día. Además, hay que tener en cuenta que durante un largo periodo tiempo la enfermedad es asintomática y no afecta a la calidad de vida del paciente y es difícil la adherencia al tratamiento. De hecho, el paciente va perdiendo visión progresivamente sin darse cuenta<sup>4</sup>.

Las investigaciones en el tratamiento del glaucoma se centran en la búsqueda de agentes hipotensores más potentes y de nuevas formulaciones que permitan instilaciones menos frecuentes y que resulten mejor toleradas para el paciente. Dentro de los hipotensores con una eficacia óptima se encuentran sustancias activas de baja solubilidad. Por esta razón, las investigaciones también se dirigen hacia el diseño de nuevas formulaciones de agentes hipotensores que presenten una baja solubilidad.

Dentro de las sustancias hipotensoras de baja solubilidad se encuentra la acetazolamida. Se trata de un inhibidor de la anhidrasa carbónica empleado por

---

<sup>1</sup> Baiza-Durán LM, Llamas-Moreno JF, Ayala-Barajas C. Comparison of timolol 0.5% + brimonidine 0.2% + dorzolamide 2% versus timolol 0.5% + brimonidine 0.2% in a Mexican population with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:1051-5.

<sup>2</sup> Oddone F, Rossetti L, Tanga L, Berardo F, Ferrazza M, Michelessi M, Roberti G, Manni G, Centofanti M. Effects of Topical Bimatoprost 0.01% and Timolol 0.5% on Circadian IOP, Blood Pressure and Perfusion Pressure in Patients with Glaucoma or Ocular Hypertension: A Randomized, Double Masked, Placebo-Controlled Clinical Trial. *PLoS One*. 2015 Oct 20;10(10):e0140601.

<sup>3</sup> Migulei Dominguez M, Coba Gonzalez MJ, Ortiz Gonzalez E, Perez Tamayo B. Actualidad en el tratamiento médico del glaucoma. *Rev Cubana Oftalmol*. 2004;17(1).

<sup>4</sup> Kim CY, Park KH, Ahn J, Ahn MD, Cha SC, Kim HS, Kim JM et al. Treatment patterns and medication adherence of patients with glaucoma in South Korea. *Br J Ophthalmol*. 2017 Mar 7. pii: bjophthalmol-2016-308505.

vía oral para reducir la presión intraocular<sup>5</sup>. Dentro de los problemas asociados a la administración de este fármaco por una vía que implique su paso a circulación sistémica se encuentran, entre otros, la diuresis, la acidosis sistémica y la pérdida de peso<sup>6</sup>. Estos efectos adversos podrían evitarse si este agente hipotensor se administrara en forma de colirio. De acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, la acetazolamida es un fármaco de clase IV (baja solubilidad y baja permeabilidad) y su administración por vía tópica ocular resulta poco efectiva<sup>7 8</sup>.

Los nanosistemas han sido empleados desde hace años para aumentar la penetración de sustancias activas por vía tópica oftálmica<sup>9 10</sup>. Dentro de estos se encuentran las nanopartículas y los liposomas.

En esta tesis se ha abordado el diseño de nuevos nanosistemas capaces de mejorar la actividad hipotensora y de preservar la superficie ocular.

---

<sup>5</sup> Lorenz K, Wasilica-Poslednik J, Bell K, Renieri G, Keicher A, Ruckes C, Pfeiffer N, Thieme H. Efficacy and safety of preoperative IOP reduction using a preservative-free fixed combination of dorzolamide/timolol eye drops versus oral acetazolamide and dexamethasone eye drops and assessment of the clinical outcome of trabeculectomy in glaucoma. *PLoS One*. 2017 Feb 15;12(2):e0171636.

<sup>6</sup> Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm*. 2002 Nov 6;248(1-2):1-14.

<sup>7</sup> Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58:265–78.

<sup>8</sup> Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Azimi M, Valizadeh H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73:102–6.

<sup>9</sup> Chaurasia SS, Lim RR, Lakshminarayanan R, Mohan RR. Nanomedicine approaches for corneal diseases. *J Funct Biomater*. 2015 Apr 30;6(2):277-98.

<sup>10</sup> Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for Ocular Drug Delivery. *Macromol Biosci*. 2012;12(5):608-20.

### 6.1.1 NANOPARTÍCULAS DE HEMA-Bayfit-MA CARGADAS CON ACETAZOLAMIDA

En este estudio se han utilizado copolímeros de HEMA-Bayfit-MA obtenidos a partir de un poloxámero comercial (Bayfit® 10WF15) funcionalizado con grupos metacrilatos (Bayfit-MA) y moléculas hidrofílicas de HEMA. La síntesis del polímero fue llevada a cabo por el grupo del Dr. Julio San Román. Tal y como se refleja en esta memoria la estructura del polímero corresponde a secuencias de HEMA unidas al azar a las unidades del poloxámero con tres ramas en forma de estrella. El polímero HEMA ha sido empleado ya en la elaboración de insertos conjuntivales para la administración de ciclosporina A<sup>11</sup>. A su vez, los nanosistemas basados en poloxámeros han sido también descritos<sup>12</sup>

Gracias a las propiedades y estructura del poloxámero, el copolímero adquiere una naturaleza anfifílica y se encuentra dotado de una cierta capacidad de autoensamblaje. La preparación de los nanosistemas se ha llevado a cabo basándonos en estas propiedades. En este trabajo, la elaboración de los nanosistemas se ha basado en la nanoprecipitación mediante diálisis. El procedimiento de elaboración se ha realizado sin la adición de tensioactivos con el fin de evitar posibles efectos adversos en la elaboración posterior de la formulación ya que está destinada a su instilación en la superficie ocular. Esta estrategia ha sido utilizada por otros autores en la elaboración de nanopartículas<sup>13 14</sup>. Aunque de gran utilidad desde el punto de vista tecnológico, la adición de tensioactivos puede afectar la tolerancia de las

---

<sup>11</sup> Gupta C, Chauhan A. Drug transport in HEMA conjunctival inserts containing precipitated drug particles. *J Colloid Interface Sci.* 2010 Jul 1;347(1):31-42.

<sup>12</sup> Van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharmaceutical Research.* 2007;24:1405-14.

<sup>13</sup> Lasic DD. Mixed micelles in drug delivery. *Nature.* 1992;355(6357):279-80.

<sup>14</sup> Nah JW, Jeong YI, Cho CS. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles composed of poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics.* 1998;36(3):415-23.

formulaciones oftálmicas instiladas ya que en muchos casos se desestabiliza la película precorneal después de su administración. El efecto de agentes tensioactivos en la superficie ocular ha sido objeto de investigación en un gran número de trabajos<sup>15 16</sup>. La adición de este tipo de sustancias puede tener un efecto beneficioso ya que son capaces de aumentar la extensibilidad de la formulación sobre la superficie ocular<sup>17</sup> y en determinados casos incluso promover un aumento de la penetración de la sustancia activa a través de la córnea<sup>18 19</sup>. Su tolerancia sobre la superficie ocular depende de la carga siendo los tensioactivos no iónicos los que resultan mejor tolerados<sup>20</sup>. En muchos casos se emplean agentes catiónicos ya que algunos de ellos presentan propiedades antisépticas. Un ejemplo de este tipo de sustancias es el cloruro de benzalconio, agente empleado como conservante en un gran número de formulaciones tópicas oftálmicas multidosis<sup>21</sup>. El cloruro de benzalconio es un tensioactivo de gran actividad siendo capaz de disolver con facilidad las paredes bacterianas y destruir las membranas citoplasmáticas. En función de su concentración puede

---

<sup>15</sup> Zhang Z, Abdel-Razek O, Hawgood S, Wang G. Protective Role of Surfactant Protein D in Ocular Staphylococcus aureus Infection. *PLoS One*. 2015 Sep 23;10(9):e0138597.

<sup>16</sup> Ramos Yacasi GR, García López ML, Espina García M, Parra Coca A, Calpena Campmany AC. Influence of freeze-drying and  $\gamma$ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol. *Int J Nanomedicine*. 2016 Aug 23;11:4093-106.

<sup>17</sup> Nanjwade BK, Deshmukh RV, Gaikwad KR, Parikh KA, Manvi FV. Formulation and evaluation of micro hydrogel of Moxifloxacin hydrochloride. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2012 Jun;37(2):117-23.

<sup>18</sup> Patel N, Thakkar V, Metalia V, Baldaniya L, Gandhi T, Gohel M. Formulation and development of ophthalmic in situ gel for the treatment ocular inflammation and infection using application of quality by design concept. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016 Sep;42(9):1406-23.

<sup>19</sup> Mohapatra R, Senapati S, Sahoo C, Mallick S. Transcorneal permeation of diclofenac as a function of temperature from film formulation in presence of triethanolamine and benzalkonium chloride. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Nov 1;123:170-80.

<sup>20</sup> Grant RL, Yao C, Gabaldon D, Acosta D. Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicology*. 1992 Nov 30;76(2):153-76.

<sup>21</sup> García-Feijoo J, Muñoz-Negrete FJ, Hubatsch DA, Rossi GC. Efficacy and tolerability of benzalkonium chloride-free travoprost in glaucoma patients switched from benzalkonium chloride-preserved latanoprost or bimatoprost. *Clin Ophthalmol*. 2016 Oct 21;10:2085-2091.

ser irritante para la conjuntiva produciendo edema y descamación<sup>22</sup>. Aunque en este trabajo se podría haber empleado un agente tensioactivo que presentara una buena tolerancia se aprovecharon las características del biomaterial para poder elaborar partículas que, una vez formadas, quedaran libres de este tipo de sustancias. De esta forma, tal y como se ha descrito en el apartado de resultados el comportamiento anfifílico del sistema y su capacidad de formar los nanosistemas puede atribuirse al sistema HEMA-Bayfit-MA.

El tamaño de los nanosistemas no fue afectado por la composición del copolímero empleado en su elaboración. Sin embargo el potencial Z fue disminuyendo con el aumento de la proporción de HEMA como consecuencia de la neutralización de la carga negativa.

Con el fin de seleccionar la proporción HEMA y Bayfit-MA más idónea se elaboraron nanosistemas empleando copolímeros con tres proporciones (1:99, 5:95 y 10:90). Estos copolímeros presentan diferente capacidad de hidratación que aumenta a medida que lo hace el porcentaje de HEMA en su composición<sup>23</sup>.

Los estudios de tolerancia resultan críticos a la hora de elaborar una formulación de administración en el ojo. En estos estudios se emplean habitualmente líneas celulares de córnea y conjuntiva ya que son representativas de la superficie ocular. Como resulta difícil extrapolar las condiciones *in vivo* de administraciones repetidas de las formulaciones en un cultivo celular nuestro grupo de investigación estableció un protocolo en el que se establecen tiempos cortos de exposición con las células (15 minutos), intermedios (1 hora) y largos (4 horas). Como control negativo se emplean las células sin tratar y como control positivo las células tratadas con cloruro de

---

<sup>22</sup> Walimbe T, Chelerkar V, Bhagat P, Joshi A, Raut A. Effect of benzalkonium chloride-free latanoprost ophthalmic solution on ocular surface in patients with glaucoma. Clin Ophthalmol. 2016;10:821-7.

<sup>23</sup> Parra FJ, Román JS, Rodríguez-Alonso L, Herrero-Vanrell, Vázquez B, inventors; CSIC, UCM, assignee. Hidrogeles basados en poloxámeros con estructura de estrella para liberación controlada de sustancias activas. Spanish patent ES 2352634. 2011 february 22. Spanish.

benzalconio a una concentración que resulta tóxica para las células (0,005%). En un primer momento ensayamos las formulaciones de nanopartículas sin cargar. Al igual que en estudios anteriores, se observó que la tolerancia disminuye con los tiempos de exposición y que las células de conjuntiva resultaban más sensibles que las de córnea<sup>24</sup>. Ninguna de las formulaciones de nanopartículas blanco resultó tóxica para las líneas celulares de la superficie ocular. Con el fin de discriminar en cuanto a tolerancia, entre las distintas composiciones de nanopartículas se emplearon macrófagos de ratón que es una línea celular con una elevada sensibilidad. En estos experimentos las nanopartículas NP1 elaboradas con el copolímero con una menor cantidad de HEMA resultó con una peor tolerancia en comparación con las otras nanopartículas preparadas con los copolímeros con un mayor porcentaje del 2 hidroxietil metacrilato (HEMA). Al presentar las nanopartículas NP5 y NP10 valores similares de tolerancia, se decidió escoger aquellas en las que el porcentaje de HEMA era intermedio para proceder a su estudio de tolerancia en animales de experimentación. Los conejos no mostraron ningún signo que señalara un efecto tóxico producido por las nanopartículas sin cargar.

Una vez descartada la toxicidad *in vivo*, se procedió al desarrollo de la formulación de nanopartículas cargadas con acetazolamida utilizando el polímero HEMA-Bayfit-MA de composición 5:95 (m/m).

El recurso empleado para evitar pérdidas de la sustancia activa durante el proceso de diálisis fue igualar la concentración de acetazolamida durante la formación de los nanosistemas en ambos compartimentos de diálisis (0,8 mg/mL). La adición de acetazolamida no modificó la forma esférica de las partículas. Sin embargo, el tamaño de partícula se incrementó frente al obtenido en las partículas sin carga (247 nm frente a 137 nm). El potencial Z se

---

<sup>24</sup> Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

modificó también a valores de -17,24 mV frente a -30,02 mV para las partículas blanco. Este resultado se puede atribuir al carácter básico de la acetazolamida que neutralizaría parcialmente la carga de las nanopartículas.

La formulación final se elaboró con una concentración de nanopartículas de 0,6 mg/mL y se ajustó la osmolaridad y el pH gracias a la adición de propilenglicol y NaOH 1M. El propilenglicol se emplea como componente en lágrimas artificiales y su tolerancia es óptima<sup>25</sup> <sup>26</sup>. Ya que nuestro objetivo era conseguir un incremento en la actividad hipotensora con una formulación que presentara una buena tolerancia elegimos el propilenglicol como componente de nuestra formulación en una proporción del 0,4% que incrementó la osmolaridad de la formulación a valores isotónicos (292,3 mOsm/L).

Las nanopartículas de acetazolamida cedieron *in vitro* la sustancia activa durante 8 horas de acuerdo a una cinética de orden cero, con un periodo de latencia de 40 minutos. A ese tiempo el porcentaje de sustancia activa cedido es del 28,9 % con respecto a la cantidad total. Con el fin de determinar la liberación completa del principio activo a partir de las partículas se realizó la determinación de la cesión a las 24 horas, confirmándose que, a ese tiempo, se había cedido prácticamente la totalidad de la sustancia activa (83,3% del total).

Los estudios de actividad hipotensora de esta formulación en conejos mostraron que el efecto hipotensor del fármaco se incrementó gracias a los nanosistemas desarrollados. La formulación produjo un descenso más acusado de la  $\Delta\text{PIO}_{\text{max}}$  (16,4% frente a 9,6% obtenida para la formulación que contenía acetazolamida en solución). Aunque esta estrategia ha sido empleada ya por otros autores, en este estudio es importante destacar que la concentración de la sustancia activa administrada es menor (0,077%) que la empleada en otros

---

<sup>25</sup> Andrés-Guerrero V, Alarma-Estrany P, Molina-Martínez IT, Peral A, Herrero-Vanrell R, Pintor J. Ophthalmic formulations of the intraocular hypotensive melatonin agent 5-MCA-NAT. *Exp Eye Res.* 2009 Mar;88(3):504-11.

<sup>26</sup> Andrés-Guerrero V. New strategies for the vehiculization of hypotensive drugs for the treatment of glaucoma [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

trabajos llevados a cabo por otros autores (1% para niosomas y 0,5% para liposomas)<sup>27 28</sup>. La mejora que suponen los nanosistemas queda patente en el valor del área bajo la curva obtenida para la formulación desarrollada que resultó dos veces superior a la obtenida para la solución de la sustancia activa en PBS. También resultó significativamente diferente el descenso máximo de la presión intraocular indicando la superioridad de la formulación de nanopartículas frente a la de acetazolamida en solución.

A partir de los resultados obtenidos en este primer trabajo se puede concluir que se ha conseguido una formulación de acetazolamida, basada en nanopartículas de un nuevo biomaterial, con la que se consigue un aumento de la eficacia hipotensora a una concentración menor de la sustancia activa que la empleada por otros autores y con una tolerancia óptima sobre la superficie ocular.

### **6.1.2 FORMULACIÓN LIPOSOMAL CON ACETAZOLAMIDA**

La tolerancia de las formulaciones en los tratamientos a largo plazo es un factor crítico ya que la formulación va a estar en contacto con la superficie ocular de forma crónica. Como se ha señalado anteriormente los tratamientos antiglaucomatosos con instilaciones diarias a largo plazo se asocian con alteraciones de la superficie ocular. En estos pacientes puede generarse ojo seco o agravarse los síntomas si ya padece dicha enfermedad. Aunque el ojo seco no se considera grave, los pacientes tienen una disminución de la calidad de vida que se acompaña con dolor e irritación ocular produciéndose alteración

---

<sup>27</sup> Deepika Aggarwala, Dhananjay Palb, Ashim K. Mitrab, Indu P. Kaura. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;338(1–2):21–26.

<sup>28</sup> Prashant B. Pisala, Manjusha A. Joshib, Mahesh N. Padamwarb, Sharvil S. Patila, Varsha B. Pokharkara. Probing influence of methodological variation on active loading of acetazolamide into nanoliposomes: Biophysical, in vitro, ex vivo, in vivo and rheological investigation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;461(1–2)82–88.

de la función visual<sup>29</sup>. En muchos casos, la aparición de ojo seco está ligada a una alteración en la película precorneal que favorece la evaporación del agua de la lágrima.

Durante un tiempo, los efectos adversos de las formulaciones antiglaucomatosas se asociaron a la presencia de conservantes de los preparados de agentes hipotensores. Sin embargo, se ha visto que la aparición de alteraciones en la superficie ocular pueden estar también relacionadas con la naturaleza de la sustancia activa como es el caso del maleato de timolol, sustancia hipotensora que produce daño en la SO<sup>30</sup>. Por esta razón resulta no solo importante el desarrollo de formulaciones que no incluyan conservantes si no la adición de excipientes capaces de proteger la superficie ocular. Dentro de estos agentes se encuentran los osmoprotectores, antioxidantes y fosfolípidos. Por esta razón el segundo preparado desarrollado en este trabajo ha sido una formulación híbrida de un agente hipotensor con un vehículo que contiene componentes capaces de preservar la integridad de la superficie ocular. Al igual que en el caso anterior el agente hipotensor elegido ha sido la acetazolamida, fármaco de clase IV según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica<sup>31</sup>.

Dentro de los nanosistemas farmacéuticos de administración oftálmica los liposomas han despertado gran interés ya que son capaces de favorecer la penetración a través de la córnea y aumentar la biodisponibilidad<sup>32</sup>. La ventaja de los liposomas empleados en este trabajo se relaciona con su composición ya

---

<sup>29</sup> Lemp MA, Baudouin C, Baum J, Dogru M, Foulks GN, Kinoshita S, Laibson P et al. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007), *Ocul. Surf.* 2007;5(2):75–92.

<sup>30</sup> Andres-Guerrero V, Vicario-de-la-Torre M, Molina-Martinez IT, Benitez-del-Castillo JM, Garcia-Feijoo J, Herrero-Vanrell R. Comparison of the in vitro tolerance and in vivo efficacy of traditional timolol maleate eye drops versus new formulations with bioadhesive polymers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3548–3556.

<sup>31</sup> Ghadi R, Dand N. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. *J Control Release.* 2017 Feb 28;248:71-95.

<sup>32</sup> Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ. Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2005 Mar-Apr;50(2):167-82.

que proviene de la lecitina de soja. La fosfatidilcolina es uno de los componentes de la capa lipídica de la película precorneal y presenta una tolerancia óptima en la superficie. De hecho, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una lágrima artificial con componentes semejantes a los de la película precorneal y cuya fase lipídica se basa en dicho compuesto<sup>33</sup>.

En este trabajo se elaboraron dos formulaciones de liposomas. La concentración de acetazolamida en la dispersión liposomal ha sido de 0,7 mg/mL.

En la primera formulación el vehículo empleado contiene un tampón borato ( $H_3BO_3$  y  $Na_2B_4O_7$ ) y agentes osmoprotectores (trehalosa y eritritol) y se denominó vehículo base. En la segunda se añadió hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Dicho polímero se utiliza en la composición de lágrimas artificiales y la concentración empleada es la que habitualmente se utiliza en estos preparados (0,3%)<sup>34 35 36</sup>.

La HPMC es un polímero biodhesivo que aumenta el contacto del preparado con la superficie ocular y potencia además la protección de la misma por sus efectos antioxidantes y citoprotectores<sup>37</sup>.

---

<sup>33</sup> Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

<sup>34</sup> Zheng X, Goto T, Shiraishi A, Ohashi Y. In vitro efficacy of ocular surface lubricants against dehydration. *Cornea*. 2013 Sep;32(9):1260-4.

<sup>35</sup> Rahman MQ, Chuah KS, Macdonald EC, Trusler JP, Ramaesh K. The effect of pH, dilution, and temperature on the viscosity of ocular lubricants--shift in rheological parameters and potential clinical significance. *Eye (Lond)*. 2012 Dec;26(12):1579-84.

<sup>36</sup> Prabhasawat P, Ruangvaravate N, Tesavibul N, Thewthong M. Effect of 0.3% Hydroxypropyl Methylcellulose/Dextran Versus 0.18% Sodium Hyaluronate in the Treatment of Ocular Surface Disease in Glaucoma Patients: A Randomized, Double-Blind, and Controlled Study. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015 Jul-Aug;31(6):323-9.

<sup>37</sup> Ye J, Zhang H, Wu H, Wang C, Shi X, Xie J, He J, Yang J. Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012 Oct;250(10):1459-66

El tamaño de las vesículas de las dos formulaciones fue semejante (155,9 nm frente a 160,9 nm), lo que indica que a diferencia de otros polímeros con carga, la adición de HPMC no modifica este parámetro<sup>38</sup>. Posiblemente sea debido a la falta de recubrimiento o interacción persistente entre la vesícula lipídica y el polímero.

Los valores de pH de las formulaciones se aproximan al pH de la lágrima natural y también las osmolaridades con valores de 297,7 mOsm/L para la formulación de liposomas en el vehículo base y 295,5 mOsm/L con HPMC. El comportamiento reológico de ambas formulaciones es newtoniano, con valores muy bajos de viscosidad, 0,7 mPa·s para la formulación del vehículo base y ligeramente superior, 4,7 mPa·s para la formulación que incluye HPMC. Ambos valores resultan semejantes a los de la lágrima humana que oscilan en un intervalo de 0,3 a 8,3 mPa·s<sup>39 40</sup>. Los valores de tensión superficial son 30,6 mN/m para la formulación sin polímero y 47,6 mN/m para la formulación con HPMC. Ambos resultan adecuados para los preparados de administración sobre la superficie ocular. Se garantiza una buena extensibilidad sin desestabilización de la película precorneal (se sabe que valores muy bajos de tensión superficial pueden desestabilizarla produciendo daño en la SO)<sup>41</sup>.

Los estudios de viabilidad celular demostraron que la acetazolamida a la misma concentración que en las formulaciones, tanto en solución de NaCl al 0,9% como en el vehículo base y el propio vehículo base presentaban una tolerancia óptima, con valores que resultaron superiores al 80%. En este caso se utilizaron

---

<sup>38</sup> Vicario-de-la-Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome del ojo seco [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

<sup>39</sup> Yamaguchi M Ueda K Isowaki A Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:1266–1271.

<sup>40</sup> Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991;15:371–376.

<sup>41</sup> Hotujac Grgurević M, Juretić M, Hafner A, Lovrić J, Pepić I. Tear fluid-eye drops compatibility assessment using surface tension. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 Feb;43(2):275-282.

líneas celulares HeLa y macrófagos J774 por ser ambas de gran sensibilidad y el tiempo de exposición fue de 2 horas.

La formulación liposomal en vehículo base también presentó valores de viabilidad celular superiores al 80%, pero al contrario que en el resto de los preparados la formulación que incorpora HPMC resultó citotóxica en la línea celular de macrófagos. Si se tiene en cuenta de forma aislada, los resultados obtenidos podrían indicar que la formulación que incluye HPMC resulta no tolerable. Sin embargo, hay que señalar que los macrófagos son más sensibles que las células de la superficie ocular (conjuntiva y/o cornea) y que, probablemente, esta formulación resultaría bien tolerada en las líneas celulares de la superficie ocular. De hecho, en estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación se han obtenido valores de viabilidad celular superiores al 80% para la misma concentración de HPMC<sup>42 43</sup>.

En cuanto a la actividad hipotensora la formulación liposomal produce una disminución superior de la presión intraocular respecto a la solución de acetazolamida en el vehículo base que se administra como comparador activo. De hecho, el área bajo la curva resulta más de dos veces superior para la formulación liposomal frente a la solución en el vehículo base. Además, el descenso máximo de la presión intraocular también resulta doble al de la solución de la sustancia activa. Teniendo en cuenta que la concentración de la sustancia activa es la misma en ambos preparados, este incremento de actividad únicamente puede ser originado por un aumento en la penetración de la acetazolamida facilitada por las vesículas lipídicas.

---

<sup>42</sup> Andrés-Guerrero V. New estrategias for the vehiculization of hypotensive drugs for the treatment of glaucoma [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

<sup>43</sup> Andrés-Guerrero V, Vicario-de-la-Torre M, Molina-Martínez IT, Benítez-del-Castillo JM, García-Feijoo J, Herrero-Vanrell R. Comparison of the in vitro tolerance and in vivo efficacy of traditional timolol maleate eye drops versus new formulations with bioadhesive polymers. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Jun 1;52(6):3548-56.

Al comparar las formulaciones liposomales sin y con polímero, como era de esperar, se produce una disminución de la presión intraocular superior cuando se incorpora el polímero celulósico. De hecho, el área bajo la curva resulta 1,5 veces superior para la formulación que incorpora HPMC comparado con los liposomas en el vehículo base y el descenso máximo se incrementa 1,4 veces. Este hecho se podría relacionar con el aumento del tiempo de contacto del preparado con la superficie ocular que se ha demostrado en otros estudios, y que aumenta la eficacia de los preparados<sup>44 45</sup>.

Respecto a la duración del efecto, a las 8 horas después de la instilación de los preparados, las formulaciones liposomales mantienen los valores de la presión intraocular por debajo del valor basal. Este hecho es mucho más significativo en la formulación que incorpora HPMC y puede ser de gran interés en los tratamientos crónicos con agentes hipotensores.

Estos resultados confirman que la actividad de la acetazolamida en las formulaciones ensayadas sería:

$$FOR - ACZ - P > L - ACZ > ACZ - VB$$

---

<sup>44</sup> Yang M, Yang YF, Lei M, Ye CT, Zhao CS, Xu JG, Wu KL, Yu MB. Preparation and evaluation of HPMC-based pirfenidone solution in vivo. *Drug Dev Ind Pharm*. 2017 Jan;43(1):171-176.

<sup>45</sup> Wegener AR, Meyer LM, Schönfeld CL. Effect of Viscous Agents on Corneal Density in Dry Eye Disease. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015 Oct;31(8):504-8.

## **6.2 PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE GELIFICACIÓN *IN SITU* DE CICLOSPORINA A DE ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR.**

El síndrome de ojo seco (SOS) es una patología ocular presente en el 14-33% de la población mundial. Se considera una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular (SO) que origina inestabilidad de la película lagrimal y se acompaña de un aumento de osmolaridad de la lagrime y inflamación de la SO<sup>46</sup>.

La aparición de ojo seco está ligada a la alteración de la película lagrimal que favorece la evaporación del agua de la lágrima<sup>47</sup>. Sin embargo la etiología de la enfermedad presenta una gran controversia. Algunos autores establecen el SOS como un problema de base inflamatoria inmune debido a la presencia de infiltrados inflamatorios en la SO<sup>48</sup>. Otros autores lo relacionan con alteraciones hormonales debido a la alta incidencia de ojo seco en mujeres postmenopáusicas<sup>49</sup>.

Independientemente del origen de la enfermedad, la terapia del SOS se centra, fundamentalmente, en mejorar los síntomas de la patología. Dentro de los tratamientos empleados se incluyen: sustitución de la lágrima natural (por medio de lágrimas artificiales), preservación de la lágrima existente (mediante oclusión del sistema de drenaje o por medios que disminuyan su evaporación)

---

<sup>46</sup> *Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Work Shop. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. The Ocular Surface 2007 Apr;5;2.*

<sup>47</sup> Moss SE, Klein R, Klein BEK. Long-term Incidence of Dry Eye in an Older Population. *Optometry & Vision Science* 2008;85:668-674.

<sup>48</sup> Barabino S, Chen Y, Chauhan S, R. D. *Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. Prog Retin Eye Res* 2012 May;31:271-285.

<sup>49</sup> Rocha EM, Mantelli F, Nominato LF, Bonini S. Hormones and dry eye syndrome: an update on what we do and don't know. *Curr Opin Ophthalmol* 2013 Jul;24:348-355.

y estimulación de una mayor producción de lágrima natural (a través de fármacos secretagogos o lacrimomiméticos).

Ante el aumento en el número de pacientes cuya sintomatología no revierte mediante el empleo de formulaciones convencionales, se están introduciendo agentes con actividad antiinflamatoria (ciclosporina A, inmunomodulador)<sup>50</sup> u hormonal (andrógenos)<sup>51</sup> capaces de generar un alivio de los síntomas que acompañan esta enfermedad<sup>52</sup>. La sustitución de la lágrima natural mediante colirios de suero autólogo o de membrana amniótica<sup>53 54</sup> para el tratamiento del ojo seco grave y la terapia nutricional en ojo seco leve-moderado (ácidos grasos omega-3 y omega-6) constituyen nuevas estrategias eficaces en la terapia de esta patología<sup>55</sup>.

La ciclosporina A (CsA) es un inmunomodulador y agente antiinflamatorio. Se ha demostrado que bloquean la proliferación de células T y la transducción de la señal del receptor. Las respuestas inflamatorias mediadas por células son moduladas a través de la regulación negativa de la expresión del receptor de IL-2 y la transcripción génica<sup>56 57</sup>. Debido a las propiedades mencionadas

---

<sup>50</sup> De Paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2008;71:89-95.

<sup>51</sup> Sullivan DA, Wickham L, Toda I, Gao J. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat, rabbit, and human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;35:S651.

<sup>52</sup> Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye. A twenty-five-year review. *Cornea* 2000;19:644-649.

<sup>53</sup> Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: A prospective randomized case-control study. *American Journal of Ophthalmology* 2005;139(2):242-6.

<sup>54</sup> Tseng SG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998 Apr;116(4):431-41.

<sup>55</sup> Miljanovic B, Trivedi KA, Dana MR, Gilbard JP, Buring JE, Schaumberg DA. Relation between dietary n -3 and n -6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82:887-893.

<sup>56</sup> el-Asrar AM, Tabbara KF, Geboes K, et al. An immunohistochemical study of topical cyclosporine in vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121:156-61.

<sup>57</sup> Power WJ, Mullaney P, Farrell M, Collum LM. Effect of topical cyclosporin A on conjunctival T cells in patients with secondary Sjogren's syndrome. *Cornea* 1993;12:507-11.

anteriormente, la CsA tiene diversas aplicaciones en oftalmología, incluyendo síndrome de ojo seco, prevención del rechazo de injerto corneal, blefaritis, rosácea y diferentes tipos de queratoconjuntivitis<sup>58 59</sup>.

La hidrofobicidad y la solubilidad acuosa extremadamente baja de CsA da lugar a bajas concentraciones en la película lagrimal y si además se considera su baja permeabilidad<sup>60</sup>, se explica fácilmente la baja biodisponibilidad ocular que presenta<sup>61</sup>. Se ha estudiado el efecto de varios potenciadores de la permeación transcorneal de la ciclosporina A, pero a pesar de mostrar resultados prometedores, su baja tolerancia corneal limita su uso<sup>62</sup>. Para superar los problemas asociados de la CsA a los sistemas de administración convencionales y mejorar su eficacia, se han utilizado liposomas como sistema de administración del agente inmunomodulador.

El primer objetivo de este trabajo era la evaluación de la eficacia de una formulación liposomal de CsA con hialuronato sódico desarrollada por el grupo de investigación en perros que padecen el síndrome de ojo seco. En el segundo objetivo, se desarrolla un nuevo preparado liposomal con CsA capaz de gelificar *in situ* y de esta forma aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular.

---

<sup>58</sup> Utine CA, Stern M, Akpek EK. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporin A. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2010;18:352–361.

<sup>59</sup> Donnenfeld, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv. Ophthalmol.* 2009;54:321–338.

<sup>60</sup> Lallemand F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: a comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 Mar 14. pii: S0939-6411(16)30908-0.

<sup>61</sup> Lallemand, F., Felt-Bayens, O., Besseghir, K., et al., 2003. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 307–318.

<sup>62</sup> Tang-Liu D, Richman J, Weinkam R, Takruri H. Effects of four penetration enhancers on corneal permeability of drugs in vitro, *J. Pharm. Sci.* 1994;83:85–90.

### **6.2.1 ESTUDIOS DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE CICLOSPORINA A CON HIALURONATO SÓDICO EN PERROS QUE PADECEN EL SÍNDROME DE OJO SECO**

La formulación liposomal de ciclosporina A (al 0,1%) desarrollada en el grupo de investigación, incluye componentes semejantes a los de la película precorneal. El preparado contiene fosfatidilcolina como componente lipídico, trehalosa como agente osmoprotector, vitamina E como antioxidante e hialuronato sódico como mucomimético.

El estudio de eficacia se realizó en perros que padecían el síndrome de ojo seco. De esta forma se evitan algunos de los inconvenientes que presenta la utilización de modelos desarrollados en animales de experimentación. Entre los inconvenientes de los modelos de laboratorio se encuentran que (i) no imitan la enfermedad de forma global sino aspectos determinados de ella y que (ii) tampoco reflejan la complejidad y cronicidad de la enfermedad. El síndrome de ojo seco espontáneo en la especie canina se ha considerado un modelo idóneo para la evaluación de nuevos preparados farmacéuticos sin los inconveniente enumerados.

Para este estudio de eficacia se diseñó un protocolo de evolución clínica que permitiera un seguimiento objetivo del SOS en perros de origen autoinmune o asociados a endocrinopatías leves, moderadas y graves (diabetes, hipotiroidismo y queratoconjuntivitis seca). Se consideró como principal dato de inclusión en el estudio que la prueba lagrimal de Schirmer (STT) estuviera por debajo de 15 milímetros en un minuto y presencia de signos clínicos compatibles con un síndrome de ojo seco. El estudio se planteó como ensayo clínico observacional temporal de 2 meses de duración, en el que los pacientes recibieron el tratamiento 3 veces al día.

En este ensayo se evaluaron 22 ojos, y estos fueron clasificados en función de la gravedad del cuadro de SOS en dos grupos: (i) casos leves cuando el STT se

encuentra entre 10 y 15 mm/min (n=10), y (ii) casos moderados y graves con STT inferior a 10 mm/min (n=10).

Con el tratamiento de la formulación liposomal de ciclosporina A, se observaron mejorías importantes en ambos grupos, siendo estas más relevantes en el grupo de los casos moderados y graves.

La producción lagrimal, una de las pruebas más significativa de esta patología, aumentó un 40% en el grupo de casos leves y un 192% en los casos moderados y graves (diferencias estadísticamente significativas). En ambos grupos se alcanzaron valores promedios superiores a 15 mm/min.

La presencia de secreciones mucosas que habitualmente va asociada a conjuntivitis mucopurulenta, disminuyó de forma relevante en ambos grupos, aunque únicamente se manifestaron diferencias significativas en el grupo de mayor gravedad.

El resto de los indicadores utilizados para valorar el SOS revelaron una recuperación clínica importante en ambos grupos, aunque estadísticamente no fuese significativa.

Estos resultados positivos, resultan todavía más importantes si se considera que la ciclosporina A no es un fármaco de acción inmediata y necesita tratamientos prolongados. De aquí que los ensayos publicados de ciclosporina se realicen con una duración de 6 meses<sup>63</sup>.

---

<sup>63</sup> Leonardi A, Flamion B, Baudouin C. Keratitis in Dry Eye Disease and Topical Ciclosporin A. *Ocul Immunol Inflamm*. 2017 Feb 1:1-10.

### **6.2.2 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE GELIFICACIÓN *IN SITU* DE CICLOSPORINA A.**

Con el fin de aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular y por tanto aumentar su eficacia, así como disminuir el número de instilaciones, se planteó el desarrollo de un nuevo preparado liposomal con ciclosporina A capaz de gelificar *in situ*. Este preparado combinaría las características de una formulación líquida a la hora de la administración con las de un gel en el lugar de administración, evitando los problemas de aplicación de este último.

Entre los agentes de gelificación que responden a iones positivos, se ha seleccionado la goma gelano por la excelente tolerancia *in vitro* que ha demostrado previamente en ensayos de viabilidad realizados en una línea celular de conjuntiva humana (IOBA-NHC).

Se estudiaron diversos factores que afectan a la capacidad de gelificación del producto. Mientras que la adición de azúcares y de polímeros bioadhesivos no limitan la capacidad de gelificación, la incorporación de liposomas y la utilización de esterilización en autoclave (a 120°C) la reduce de forma apreciable. No obstante, se seleccionó el proceso de autoclavado debido a que este producto se obtiene por fermentación aeróbica de la glucosa mediante la bacteria *Sphingomonas Elodea*.

Aunque inicialmente se plantearon formulaciones que solo contenían goma gelano, finalmente se optó por asociar la goma gelano y la HPMC para esta formulación de ciclosporina A.

Tras la optimización de la formulación liposomal para conseguir una concentración de ciclosporina A del 0,1%, la composición final se recoge en la Tabla 6.1.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Goma gelano	0,25 %
HPMC	0,12 %
Liposomas	1,25 % expresada en concentración de FC
Ciclosporina A	0,1%
NaCl	0,05 %
KCl	0,1 %
Ascorbil fosfato sódico	0,022 %
Trehalosa	1,68 %
Tetraborato sódico	0,076 %
Acido bórico	0,838 %

**Tabla 6.1.** *Composición de la formulación de gelificación in situ que contiene ciclosporina A al 0,1%.*

El análisis de tamaño de las vesículas lipídicas de la dispersión liposomal (sistema intermedio) y de la formulación gelificante, ambas con CsA, muestra que se modifica el tamaño de los liposomas (de 80,4 nm pasa a 112,9 nm) cuando se adiciona al resto de los componentes de la formulación. Este incremento también se manifiesta cuando se trabaja con hialuronato sódico y sin embargo no se manifiesta con la hidroxipropilmetilcelulosa. A partir de estos comportamientos se puede teorizar que los polímeros con carga negativa como

la goma gelano y el ácido hialurónico interaccionan más fácilmente y de forma más estable con la superficie de los liposomas que los polímeros neutros como la HPMC. Esta interacción y recubrimiento con el polímero supone un aumento en el volumen de la estructura medida.

El pH de la formulación gelificante fue de 7,3. Este valor se encuentra dentro del intervalo de pH fisiológico de la lágrima natural (7-7,4) por lo que se evita que se produzcan molestias en el momento de la aplicación<sup>64 65</sup>.

La formulación gelificante ha sido planteada como un preparado ligeramente hipotónico (276 mOsm/L) capaz de paliar la hipertonicidad que se manifiesta en las situaciones patológicas de ojo seco<sup>66</sup>. El valor de tensión superficial del preparado se encuentra próximo a los que presenta la película lagrimal (44-46 mN/m<sup>67 68 69</sup>), y además, los polímeros utilizados van a actuar como agentes humectantes favoreciendo la estabilidad de la película precorneal<sup>70</sup>.

El valor de viscosidad en la formulación de gelificación fue de 6,2 mPa·s lo que asegura su fácil administración como colirio.

Para imitar la situación de gelificación *in situ* tras la administración del preparado con CsA en la superficie ocular, se ha diluido la formulación con fluido lacrimal simulado en la proporción 25:7 (volumen de aplicación 25 µL y

---

<sup>64</sup> Yamada M, Mochikuzi H, Hata Y, Mashima Y. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. *Current eye research* 1998;October ;17:1005-1009.

<sup>65</sup> Carney LG, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;Apr;30:747-54.

<sup>66</sup> Kim M, Kim HS, Na KS. Correlation between Tear Osmolarity and Other Ocular Surface Parameters in Primary Sjögren's Syndrome. *Korean J Ophthalmol.* 2017 Feb;31(1):25-31.

<sup>67</sup> Nagyova B, Tiffany JM. Components for responsible Surface tension of human tears. *Current Eye Research.* 1999;19:4-11.

<sup>68</sup> Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye* 2003;17:1-4.

<sup>69</sup> Bron AJ Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Experimental Eye Research* 2004;78:347-36

<sup>70</sup> Lemp MA, holly FJ. Ophthalmic polymers as ocular wetting agents. *Annals of Ophthalmology* 1972;4:15-20.

volumen de la película lagrimal 7  $\mu\text{L}$ )<sup>71</sup>. El fluido lagrimal aporta un suministro limitado de electrolitos que permite la formación del gel.

En el estudio reológico del gel se obtiene valores de viscosidades dinámicas a velocidades de cizalla altas, comprendidas entre 800-1000  $\text{s}^{-1}$ , de 3 y 3,5 mPa·s para las dos modalidades estudiadas, rotacional u oscilante respectivamente. Ambos valores son muy similares, y confirman el comportamiento fluido del preparado durante el parpadeo.

A partir de la curva de flujo se obtiene un valor para el esfuerzo umbral de 1,7 Pa, dato que coincide con el esfuerzo crítico obtenido a partir de comportamiento del módulo elástico ( $G'$ ) frente a la frecuencia que toma un valor comprendido entre 1,5 y 2,3 Pa.

El espectro mecánico muestra un comportamiento de gel viscoelástico. A frecuencias comprendidas entre 1 y 10 Hz el espectro parece indicar que se va formando una pequeña fracción de sol que no forma parte de la red polimérica gelificada y la fracción de gel aumenta su elasticidad. A frecuencias altas, a partir de 20 Hz, el módulo viscoso ( $G''$ ) aumenta más rápidamente que el módulo elástico ( $G'$ ), por lo que se produce una pérdida de la respuesta elástica.

Estas características de viscoelasticidad y las de mucoadhesión propias de estos polímeros aseguran una mayor permanencia de la formulación sobre la superficie ocular.

Los estudios de tolerancia en conejos demuestran la buena tolerancia de la formulación de gelificación *in situ* desarrollada.

El ensayo de eficacia para esta formulación, se planteó en perros con queratoconjuntivitis seca muy graves. Para este estudio el criterio de inclusión fue un STT inferior a 5 mm/min.

---

<sup>71</sup> Kesavan K, Nath G, Pandit JK. Preparation and in vitro antibacterial evaluation of gatifloxacin mucoadhesive gellan system. Daru. 2010;18(4):237-46.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a un ensayo clínico observacional temporal de 2 meses de duración, en el que los pacientes recibieron la formulación seleccionada 3 veces al día.

Se han tratado solo 5 ojos con queratoconjuntivitis seca grave y por lo tanto los resultados no son extrapolables. No obstante los resultados obtenidos se pueden resumir en los siguientes apartados:

- En ningún caso se produjeron reacciones adversas en el momento de la instilación.
- En un ojo se produjo un incremento de la prueba lagrimal de Schirmer.
- La paquimetría corneal no mostro variaciones significativas.
- La sensibilidad corneal aumentó ligeramente
- El grado de tinción con fluoresceína mejoró en tres de los ojos.
- Los signos de conjuntivitis no mostraron diferencias según indican los niveles de hiperemia y la secreción conjuntival.

A pesar de algunos de los efectos beneficiosos observados, al tratarse de perros con patologías muy graves (hipoplasia glandular severa) resulta difícil encontrar una mejoría satisfactoria. Estos cuadros tan severos no se pueden manejar con monoterapia de CsA y requieren tratamientos más complejos.

### **6.3 BIBLIOGRAFÍA**

Andrés-Guerrero V, Alarma-Estrany P, Molina-Martínez IT, Peral A, Herrero-Vanrell R, Pintor J. Ophthalmic formulations of the intraocular hypotensive melatonin agent 5-MCA-NAT. *Exp Eye Res.* 2009 Mar;88(3):504-11.

Andrés-Guerrero V. New strategies for the vehiculization of hypotensive drugs for the treatment of glaucoma [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

Andres-Guerrero V, Vicario-de-la-Torre M, Molina-Martinez IT, Benitez-del-Castillo JM, Garcia-Feijoo J, Herrero-Vanrell R. Comparison of the in vitro tolerance and in vivo efficacy of traditional timolol maleate eye drops versus new formulations with bioadhesive polymers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3548–3556.

Baiza-Durán LM, Llamas-Moreno JF, Ayala-Barajas C. Comparison of timolol 0.5% + brimonidine 0.2% + dorzolamide 2% versus timolol 0.5% + brimonidine 0.2% in a Mexican population with primary open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:1051-5.

Barabino S, Chen Y, Chauhan S, R. D. Ocular surface immunity: homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2012 May;31:271-285.

Bron AJ Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Experimental Eye Research* 2004;78:347-36.

Carney LG, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;Apr;30:747-54.

Chaurasia SS, Lim RR, Lakshminarayanan R, Mohan RR. Nanomedicine approaches for corneal diseases. *J Funct Biomater*. 2015 Apr 30;6(2):277-98.

Deepika Aggarwala, Dhananjay Palb, Ashim K. Mitrab, Indu P. Kaura. Study of the extent of ocular absorption of acetazolamide from a developed niosomal formulation, by microdialysis sampling of aqueous humor. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;338(1–2):21–26.

De Paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 2008;71:89-95.

Donnenfeld, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv. Ophthalmol.* 2009;54:321–338.

Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ. Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2005 Mar-Apr;50(2):167-82.

el-Asrar AM, Tabbara KF, Geboes K, et al. An immunohistochemical study of topical cyclosporine in vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121:156-61.

Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002 Nov 6;248(1-2):1-14.

García-Feijoo J, Muñoz-Negrete FJ, Hubatsch DA, Rossi GC. Efficacy and tolerability of benzalkonium chloride-free travoprost in glaucoma patients switched from benzalkonium chloride-preserved latanoprost or bimatoprost. *Clin Ophthalmol.* 2016 Oct 21;10:2085-2091.

Ghadi R, Dand N. BCS class IV drugs: Highly notorious candidates for formulation development. *J Control Release.* 2017 Feb 28;248:71-95.

Gupta C, Chauhan A. Drug transport in HEMA conjunctival inserts containing precipitated drug particles. *J Colloid Interface Sci.* 2010 Jul 1;347(1):31-42.

Grant RL, Yao C, Gabaldon D, Acosta D. Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. *Toxicology.* 1992 Nov 30;76(2):153-76.

Hotujac Grgurević M, Juretić M, Hafner A, Lovrić J, Pepić I. Tear fluid-eye drops compatibility assessment using surface tension. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 Feb;43(2):275-282.

Kesavan K, Nath G, Pandit JK. Preparation and in vitro antibacterial evaluation of gatifloxacin mucoadhesive gellan system. *Daru.* 2010;18(4):237-46.

Kim CY, Park KH, Ahn J, Ahn MD, Cha SC, Kim HS, Kim JM et al. Treatment patterns and medication adherence of patients with glaucoma in South Korea. *Br J Ophthalmol*. 2017 Mar 7. pii: bjophthalmol-2016-308505.

Kim M, Kim HS, Na KS. Correlation between Tear Osmolarity and Other Ocular Surface Parameters in Primary Sjögren's Syndrome. *Korean J Ophthalmol*. 2017 Feb;31(1):25-31.

Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: A prospective randomized case-control study. *American Journal of Ophthalmology* 2005;139(2):242-6.

Lallemand, F., Felt-Bayens, O., Besseghir, K., et al., 2003. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 307–318.

Lallemand F, Schmitt M, Bourges JL, Gurny R, Benita S, Garrigue JS. Cyclosporine A delivery to the eye: a comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017 Mar 14. pii: S0939-6411(16)30908-0.

Lasic DD. Mixed micelles in drug delivery. *Nature*. 1992;355(6357):279-80.

Lemp MA, Baudouin C, Baum J, Dogru M, Foulks GN, Kinoshita S, Laibson P et al. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007), *Ocul. Surf.* 2007;5(2):75–92.

Lemp MA, Holly FJ. Ophthalmic polymers as ocular wetting agents. *Annals of Ophthalmology* 1972;4:15-20.

Leonardi A, Flamion B, Baudouin C. Keratitis in Dry Eye Disease and Topical Ciclosporin A. *Ocul Immunol Inflamm*. 2017 Feb 1:1-10.

Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58:265–78.

Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for Ocular Drug Delivery. *Macromol Biosci*. 2012;12(5):608-20.

Lorenz K, Wasielica-Poslednik J, Bell K, Renieri G, Keicher A, Ruckes C, Pfeiffer N, Thieme H. Efficacy and safety of preoperative IOP reduction using a preservative-free fixed combination of dorzolamide/timolol eye drops versus oral acetazolamide and dexamethasone eye drops and assessment of the clinical outcome of trabeculectomy in glaucoma. *PLoS One*. 2017 Feb 15;12(2):e0171636.

Migulei Dominguez M, Coba Gonzalez MJ, Ortiz Gonzalez E, Perez Tamayo B. Actualidad en el tratamiento médico del glaucoma. *Rev Cubana Oftalmol*.2004;17(1)

Miljanovic B, Trivedi KA, Dana MR, Gilbard JP, Buring JE, Schaumberg DA. Relation between dietary n -3 and n -6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82:887-89.

Mohapatra R, Senapati S, Sahoo C, Mallick S. Transcorneal permeation of diclofenac as a function of temperature from film formulation in presence of triethanolamine and benzalkonium chloride. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Nov 1;123:170-80.

Moss SE, Klein R, Klein BEK. Long-term Incidence of Dry Eye in an Older Population. *Optometry & Vision Science* 2008;85:668-674.

Nagyova B, Tiffany JM. Components for responsible Surface tension of human tears. *Current Eye Research*. 1999;19:4-11.

Nah JW, Jeong YI, Cho CS. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles composed of poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*. 1998;36(3):415-23.

Nanjwade BK, Deshmukh RV, Gaikwad KR, Parikh KA, Manvi FV. Formulation and evaluation of micro hydrogel of Moxifloxacin hydrochloride. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2012 Jun;37(2):117-23.

Oddone F, Rossetti L, Tanga L, Berardo F, Ferrazza M, Michelessi M, Roberti G, Manni G, Centofanti M. Effects of Topical Bimatoprost 0.01% and Timolol 0.5% on Circadian IOP, Blood Pressure and Perfusion Pressure in Patients with Glaucoma or Ocular Hypertension: A Randomized, Double Masked, Placebo-Controlled Clinical Trial. *PLoS One.* 2015 Oct 20;10(10):e0140601.

Parra FJ, Román JS, Rodriguez-Alonso L, Herrero-Vanrell, Vázquez B, inventors; CSIC, UCM, assignee. Hidrogeles basados en poloxámeros con estructura de estrella para liberación controlada de sustancias activas. Spanish patent ES 2352634. 2011 february 22. Spanish.

Patel N, Thakkar V, Metalia V, Baldaniya L, Gandhi T, Gohel M. Formulation and development of ophthalmic in situ gel for the treatment ocular inflammation and infection using application of quality by design concept. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016 Sep;42(9):1406-23.

Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye. A twenty-five-year review. *Cornea* 2000;19:644-649.

Power WJ, Mullaney P, Farrell M, Collum LM. Effect of topical cyclosporin A on conjunctival T cells in patients with secondary Sjogren's syndrome. *Cornea* 1993;12:507-11.

Prabhasawat P, Ruangvaravate N, Tesavibul N, Thewthong M. Effect of 0.3% Hydroxypropyl Methylcellulose/Dextran Versus 0.18% Sodium Hyaluronate in the Treatment of Ocular Surface Disease in Glaucoma Patients: A Randomized, Double-Blind, and Controlled Study. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015 Jul-Aug;31(6):323-9.

Prashant B. Pisala, Manjusha A. Joshib, Mahesh N. Padamwarb, Sharvil S. Patila, Varsha B. Pokharkara. Probing influence of methodological variation on active loading of acetazolamide into nanoliposomes: Biophysical, in vitro, ex vivo, in vivo and rheological investigation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;461(1–2):82–88.

Rahman MQ, Chuah KS, Macdonald EC, Trusler JP, Ramaesh K. The effect of pH, dilution, and temperature on the viscosity of ocular lubricants--shift in rheological parameters and potential clinical significance. *Eye (Lond)*. 2012 Dec;26(12):1579-84.

Ramos Yacasi GR, García López ML, Espina García M, Parra Coca A, Calpena Campmany AC. Influence of freeze-drying and  $\gamma$ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol. *Int J Nanomedicine*. 2016 Aug 23;11:4093-106.

Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Work Shop. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. *The Ocular Surface* 2007 Apr;5;2.

Rocha EM, Mantelli F, Nominato LF, Bonini S. Hormones and dry eye syndrome: an update on what we do and don't know. *Curr Opin Ophthalmol* 2013 Jul;24:348-355.

Sullivan DA, Wickham L, Toda I, Gao J. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat, rabbit, and human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;35:S651.

Tang-Liu D, Richman J, Weinkam R, Takruri H. Effects of four penetration enhancers on corneal permeability of drugs in vitro, *J. Pharm. Sci.* 1994;83:85-90.

Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye* 2003;17:1-4.

Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol*. 1991;15:371–376.

Tseng SG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998 Apr;116(4):431-41.

Utine CA, Stern M, Akpek EK. Clinical review: topical ophthalmic use of cyclosporin A. *Ocul Immunol Inflamm*. 2010;18:352–361.

Van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharmaceutical Research*. 2007;24:1405-14.

Walimbe T, Chelerkar V, Bhagat P, Joshi A, Raut A. Effect of benzalkonium chloride-free latanoprost ophthalmic solution on ocular surface in patients with glaucoma. *Clin Ophthalmol*. 2016;10:821-7.

Wegener AR, Meyer LM, Schönfeld CL. Effect of Viscous Agents on Corneal Density in Dry Eye Disease. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015 Oct;31(8):504-8.

Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Azimi M, Valizadeh H. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73:102–6.

Vicario-de-la-Torre M, Benítez-del-Castillo JM, Vico E, Guzmán M, de-Las-Heras B, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT. Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Nov 6;55(12):7839-47.

Vicario-de-la-Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome del ojo seco [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2011.

Yamada M, Mochikuzi H, Hata Y, Mashima Y. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. *Current eye research* 1998;October ;17:1005-1009.

Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A. Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:1266–1271

Yang M, Yang YF, Lei M, Ye CT, Zhao CS, Xu JG, Wu KL, Yu MB. Preparation and evaluation of HPMC-based pirfenidone solution in vivo. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 Jan;43(1):171-176.

Ye J, Zhang H, Wu H, Wang C, Shi X, Xie J, He J, Yang J. Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012 Oct;250(10):1459-66

Zhang Z, Abdel-Razek O, Hawgood S, Wang G. Protective Role of Surfactant Protein D in Ocular *Staphylococcus aureus* Infection. *PLoS One.* 2015 Sep 23;10(9):e0138597.

Zheng X, Goto T, Shiraishi A, Ohashi Y. In vitro efficacy of ocular surface lubricants against dehydration. *Cornea.* 2013 Sep;32(9):1260-4.

## **7. CONCLUSIONES**



1.- El copolímero HEMA-Bayfit-MA (5:95) sintetizado por el grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) resulta adecuado para la preparación de nanosistemas de administración tópica ocular. Estas nanopartículas cargadas con acetazolamida presentan una tolerancia ocular óptima y su actividad hipotensora es significativamente superior a la solución de la misma concentración, tanto en el descenso máximo como en la duración de efectos.

2.- El método utilizado en esta memoria para la incorporación de la acetazolamida en los liposomas permite obtener una concentración de la sustancia activa en la formulación liposomal dos veces superior a su hidrosolubilidad.

3.- A partir de los estudios de actividad hipotensora de la solución de acetazolamida y de su formulación liposomal se puede estimar que con la utilización de este último vehículo se duplica la biodisponibilidad del preparado. Así mismo se consigue un aumento significativo en el descenso máximo de presión intraocular y en la duración del efecto hipotensor.

4.- La formulación liposomas de acetazolamida con hidroxipropilmetilcelulosa presenta una tolerancia ocular óptima. Con la adición del polímero se consigue una superioridad significativa en la actividad hipotensora de la formulación liposomal. Además, con esta formulación se aumenta la biodisponibilidad hasta 3,7 veces con respecto a la solución de la sustancia activa.

5.- La formulación liposomal de ciclosporina A al 0,1% con hialuronato sódico al 0,4% ha demostrado ser eficaz en el síndrome del ojo seco espontáneo en la especie canina. En los dos grupos de casos estudiados (leves o moderados y graves) se obtienen valores promedios en la prueba de Schirmer superiores a 15 mm/min después de 60 días de tratamiento.

6.- La combinación de goma gelano e hidroxipropilmetilcelulosa permite preparar una formulación con ciclosporina A con una tolerancia ocular óptima y características adecuadas de gelificación *in situ*. El comportamiento reológico del gel simulado *in situ* asegura una mayor permanencia de la formulación sobre la superficie ocular.

7.- Con la optimización en el desarrollo de la formulación de gelificación *in situ* se ha conseguido incorporar una concentración de ciclosporina A de hasta 0,1%.



