

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de formulaciones liposomales oftálmicas: aplicación
en la enfermedad de ojo seco**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Ángela Caballo González

Directores

Irene Teresa Molina Martínez

Rocío Herrero Vanrell

Madrid

© María Ángela Caballo González, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



TESIS DOCTORAL

Estudio de formulaciones liposomales oftálmicas.

Aplicación en la enfermedad de ojo seco.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Ángela Caballo González

DIRECTORES

Irene Teresa Molina Martínez

Rocío Herrero Vanrell

Madrid, 2020

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de dejar por escrito la parte de la tesis que siento más mía, y quizá por ello, la que más me cuesta. Léanse estas frases como lo que son, un sincero agradecimiento a todo lo que he recibido.

Me gustaría comenzar mostrando mi más infinita gratitud al Señor, Quien me ha acompañado, ayudado y dado fuerzas en todos estos años, haciéndose concreto en multitud de rostros y formas. Formas a veces un tanto sutiles y difíciles de entender a simple vista.

Su Rostro bueno, en primer lugar, ha pasado a través de mi familia: padres, hermano, tíos y abuelos. En ellos he visto y veo el amor incondicional que me muestra el valor de la entrega, haciendo que desee dar lo mejor de mí incluso en la dificultad. En ese “darme” he aprendido el significado de trabajo, constancia, sacrificio y, por qué no decirlo, paciencia.

Esencial también ha sido la compañía de tantos y tantos amigos que, de una forma u otra han estado conmigo a lo largo de este intenso camino. Quiero hacer una mención especial a mis “fraternos”, a mis “amigos de siempre”, a mis “compis de casa” y a mis “amigos de curro” que con su recurrente “*a ver cuándo terminas, que queremos verte*” seguido de un, simple pero cargado de sentido, “*ánimo*”, me han ayudado durante los fines de semana y meses de confinamiento.

Asimismo, quisiera mostrar mi agradecimiento a los distintos directores del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la UCM por haberme permitido llevar a cabo en él el presente trabajo. Gracias a la Dra. Irene Teresa Molina Martínez y la Dra. Rocío Herrero Vanrell, por haberme admitido en su grupo, ofreciéndome su tiempo, dedicación y apoyo como directoras de tesis. En este sentido, destaco el apoyo recibido en tantas ocasiones por la Dra. Paloma Ballesteros Papantonakis. Gracias a todos.

Me gustaría agradecer a la Dra. Beatriz de las Heras y a su grupo del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la UCM su colaboración en los ensayos de viabilidad celular *in vitro*. Seguidamente, mencionar 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 y al Dr. José Manuel Benítez del Castillo del Departamento de Oftalmología de la UCM con sus respectivos grupos, por su aportación en los ensayos clínicos *in vivo*.

Por último, gracias de corazón a mis compañeros y amigos del laboratorio. Gracias por vuestra amistad, ayuda y esos grandes momentos que han contribuido a hacer fácil y feliz mi tiempo en el departamento.

Durante todos estos años ha tocado renunciar en muchas ocasiones a estar junto a los míos. Quisiera terminar diciendo que esta renuncia no ha sido en balde. Espero y deseo que os sepáis parte fundamental, no sólo de este trabajo sino también de esta importante etapa de mi vida en la que tanto he aprendido profesional y personalmente.

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT.....	13
2. INTRODUCCIÓN.....	27
2.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA OCULAR	29
2.2. SUPERFICIE OCULAR.....	34
2.3. NUEVOS PREPARADOS TÓPICOS OCULARES	40
2.3.1. Vías de administración.....	40
2.3.2. Nuevas estrategias utilizadas en el desarrollo galénico.....	41
2.4. ENFERMEDAD DEL OJO SECO.....	52
2.4.1. Ojo seco por deficiencia acuosa o acuodeficiente	57
2.4.2. Ojo seco evaporativo.....	58
2.5. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE OJO SECO	60
2.5.1. Tratamiento ambiental	63
2.5.2. Recomendaciones generales y medidas higiénicas	64
2.5.3. Lágrimas artificiales.....	67
2.5.4. Suero autólogo.....	72
2.5.5. Fármacos secretagogos.....	74
2.5.6. Empleo de antiinflamatorios.....	75
3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.....	81
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	85
4.1. MATERIALES EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES.....	87
4.2. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE ACTIVOS	87
4.2.1. Cuantificación de la vitamina E por HPLC	87
4.2.2. Cuantificación de la vitamina C por HPLC.....	90
4.2.3. Cuantificación de la Ciclosporina A por HPLC	92
4.2.4. Cuantificación del cloroformo residual por HS-SPME-GCMS.....	93
4.3. PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES.....	95
4.3.1. Elaboración de la formulación liposomal enriquecida	98

4.3.2. Elaboración de una formulación liposomal con Ciclosporina A al 0,1%	99
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES	100
4.4.1. Determinación del pH	101
4.4.2. Determinación de la osmolaridad	101
4.4.3. Determinación de la tensión superficial	102
4.4.4. Determinación de la viscosidad	103
4.4.5. Determinación del tamaño de las vesículas liposomales	103
4.4.6. Ensayos de tolerancia <i>in vitro</i>	104
4.4.7. Ensayos de tolerancia <i>in vivo</i>	107
4.5. ENSAYOS DE EFICACIA <i>IN VIVO</i> DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES ..	109
4.5.1. Ensayos de eficacia <i>in vivo</i> de la formulación liposomal enriquecida FL-E _{con}	109
4.5.2. Ensayos de eficacia <i>in vivo</i> realizados con la formulación liposomal FL-CsA _{con} ...	120
5. RESULTADOS.....	123
5.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE ACTIVOS	125
5.1.1. Cuantificación de la vitamina E por HPLC	125
5.1.2. Cuantificación de vitamina C por HPLC	128
5.1.3. Cuantificación de Ciclosporina A por HPLC	131
5.2. FORMULACIÓN LIPOSOMAL BLANCO O VEHÍCULO BASE	134
5.2.1. Diseño de las formulaciones liposomales blanco o vehículos base	135
5.2.2. Preparación de las formulaciones liposomales blanco o vehículos base	137
5.2.3. Caracterización de las formulaciones liposomales blanco o vehículos base	141
5.3. FORMULACIÓN LIPOSOMAL ENRIQUECIDA	156
5.3.1. Diseño de las formulaciones liposomales enriquecidas	156
5.3.2. Preparación de las formulaciones liposomales enriquecidas.....	163
5.3.3. Caracterización de las formulaciones liposomales enriquecidas.....	165
5.3.4. Ensayos de eficacia <i>in vivo</i> de la formulación liposomal enriquecida FL-E _{con} en un modelo animal de la enfermedad de ojo seco	176
5.3.5.. Ensayos de calidad de la visión con la formulación liposomal enriquecida FL-E _{con} en voluntarios sanos.....	204

5.4. FORMULACIÓN LIPOSOMAL CON CICLOSPORINA A	209
5.4.1. Diseño de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A.....	209
5.4.2. Preparación de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A	210
5.4.3. Caracterización de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A	212
5.4.4. Ensayos de eficacia <i>in vivo</i> de la formulación liposomal FL-CsA _{con} en un modelo animal de la enfermedad de ojo seco.....	223
6. CONCLUSIONES.....	229
7. BIBLIOGRAFÍA.....	233
8. ABREVIATURAS.....	255

1. RESUMEN / ABSTRACT

ESTUDIO DE FORMULACIONES LIPOSOMALES OFTÁLMICAS. APLICACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE OJO SECO.

La enfermedad de ojo seco (EOS) es uno de los motivos más frecuente de consulta médica, especialmente en atención primaria y en oftalmología. En el informe emitido por Tear Film and Ocular Surface Society en el año 2007, se estima que la patología de ojo seco afecta al 5 – 30 % de la población mayor de 50 años¹. Sin embargo, según el informe publicado en el año 2017, contabilizando los pacientes que mostraron síntomas relacionados con dicha patología, independientemente de la presencia o no de signos clínicos, el número de pacientes afectados asciende hasta el 50%. El número de afectados alcanza el 75% en los estudios basados principalmente en los signos de esta patología². Por este motivo, la patología de ojo seco es considerada una de las enfermedades del siglo XXI.

A la enfermedad de ojo seco se le define como una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por la pérdida de homeostasis de la película lagrimal. La inestabilidad e hiperosmolaridad lagrimal daña, tanto directa como indirectamente, la superficie ocular iniciando una serie de acontecimientos en cadena en donde están implicados la inflamación y el deterioro de la superficie ocular, anomalías neurosensoriales, además de un complejo cuadro sintomatológico que empeora la calidad de vida de los pacientes significativamente³.

Hasta ahora, la terapia a seguir venía determinada por la severidad de la enfermedad. En cambio, hoy en día se pone especial atención al diagnóstico de la enfermedad, en donde se evalúa entre otros factores, el posible origen de la enfermedad determinándose si el paciente muestra más signos de ojo seco evaporativo u ojo seco por deficiencia acuosa⁴.

Actualmente no existe un tratamiento curativo. Independientemente del tipo y estadio de la enfermedad es recomendable modificar el entorno o ciertos hábitos conductuales del paciente a fin de mejorar el estado general de su superficie ocular, así como, usar lubricantes oculares.

Los sustitutos lagrimales se pueden emplear solos o en combinación con otros tratamientos y, como su nombre indica, reemplazan o ayudan a conservar la lágrima natural del paciente reduciendo la sintomatología característica de la enfermedad de ojo seco. Existen en el mercado una gran variedad de productos, pero ninguno de ellos logra imitar totalmente a la lágrima

¹ No authors listed. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007;5(2):93-107.

² Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, *et al.* TFOS DEWS II Epidemiology report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):334-65.

³ Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C, *et al.* TFOS DEWS II Definition and Classification report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):273-83.

⁴ Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, *et al.* TFOS DEWS II Management and therapy report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575-628.

natural, debido entre otros motivos, a su compleja composición^{5,6}, estructura de bicapa (lipídica y acuomucinoso) y producción basal continúa^{7,8}.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido el diseño y la evaluación de nuevas formulaciones tópicos oculares orientadas a mejorar sustancialmente los síntomas y signos asociados a la enfermedad de ojo seco. Para ello, se ha buscado emular las características fisicoquímicas de la lágrima natural, incluyéndose componentes hidrofílicos y lipofílicos semejantes a los de la película precorneal.

Debido a la importancia de la película lagrimal y su alta inestabilidad en pacientes con la enfermedad de ojo seco⁹, se ha recurrido al uso de lípidos en forma de vesículas liposomales que logran reponer la capa lipídica de la película precorneal y dar estabilidad a la capa acuomucinoso lo que disminuye la evaporación superficial del agua^{10,11}. Así mismo, gracias a sus características vesiculares, los sistemas liposomales se han empleado como vehículos de transporte de principios activos, tanto hidrófilos como lipófilos, mejorando de este modo su biodisponibilidad a nivel ocular¹².

Un alto porcentaje de los preparados lagrimales comercializados presentan componentes poliméricos y/o viscosizantes que ayudan a prolongar la permanencia del preparado sobre la superficie ocular además de actuar como lubricante¹³. Para las nuevas formulaciones desarrolladas en este trabajo se ha recurrido al uso del ácido hialurónico en forma de hialuronato sódico por ser un polímero bioadhesivo con estructura análoga a las mucinas presentes en la película precorneal¹⁴ lo que logra estabilizar la capa acuomucinoso del film lagrimal y reducir la evaporación superficial del agua. Así mismo, se ha descubierto que el ácido hialurónico interviene en el proceso inflamatorio, presenta efecto antioxidante y propiedades cicatrizantes además de promover la proliferación de las células epiteliales de la córnea y conjuntiva, por lo que su uso es especialmente útil para el tratamiento etiológico y sintomatológico de la enfermedad de ojo seco^{15,16,17}.

⁵ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

⁶ Geerling G, Maclellan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(11):1467-74.

⁷ Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Tisdale A, Fong T, Russo CL. Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2496-506.

⁸ Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol.* 2007;52(4):369-74.

⁹ Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, *et al.* TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf.* 2017;15:366-403.

¹⁰ Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):347-60.

¹¹ Chetty E, Gillan WDH. Reviewing the tear film's lipid layer. *S Afr Optom.* 2008;67(4):155-9.

¹² Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv.* 2011;2011:863734.

¹³ Wegener AR, Meyer LM, Schönfeld CL. Effect of viscous agents on corneal density in dry eye disease. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015;31(8):504-8.

¹⁴ Mochizuki H, Yamada M, Hato S, Nishida T. Fluorophotometric measurement of the precorneal residence time of topically applied hyaluronic acid. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(1):108-11.

¹⁵ Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, *et al.* TFOS DEWS II Management and therapy report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575-628.

Por último, considerando que la lágrima de dichos pacientes es ligeramente hiperosmolar, todas las formulaciones diseñadas presentan valores hipoosmolares a fin de reestablecer la normoosmolaridad fisiológica. Como agentes auxiliares se han empleado boratos como agente tamponante y trehalosa como agente osmoprotector^{18,19}. En concreto, los boratos presentan cierta actividad conservante por lo que prolongan la estabilidad de la fórmula sin necesidad de emplear conservantes que dañen la superficie ocular²⁰.

Teniendo en cuenta las premisas anteriormente citadas, el trabajo se ha estructurado en tres partes.

1. Desarrollo y caracterización de formulaciones liposomales blanco o vehículo base:

Se diseñaron dos formulaciones liposomales elaboradas con componentes semejantes a los de la película precorneal: fosfatidilcolina (FC) y colesterol (Cht) como componentes lipídicos, vitamina E (Vit E) como antioxidante, boratos como agentes tamponante y trehalosa como osmoprotector. Además, a uno de estos preparados se le incorporó hialuronato sódico como polímero bioadhesivo.

Ambas dispersiones liposomales fueron preparadas según el método de Bangham^{21,22}, en el que los componentes lipídicos se solubilizan en un solvente orgánico volátil, para posteriormente eliminarlo y redispersar la capa lipídica formada en un medio acuoso, obteniéndose espontáneamente vesículas liposomales. El rendimiento del proceso se evaluó determinando la pérdida del material lipídico durante la preparación de los liposomas a través de la cuantificación por HPLC de vitamina E. Así mismo, se pudo optimizar el método de fabricación gracias a la cuantificación del disolvente orgánico residual empleado, cloroformo, en las dispersiones liposomales fabricadas a través de la técnica de cromatografía de gases – espectrometría de masas previa microextracción en fase sólida realizada en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de espectrometría de masas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Las formulaciones obtenidas fueron caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico (pH, osmolaridad, comportamiento reológico, tensión superficial y tamaño de partícula),

¹⁶ Daull P, Feraille L, Elena PP, Garrigue JS. Comparison of the anti-inflammatory effects of artificial tears in a rat model of corneal scraping. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2016;32(2):109-18.

¹⁷ Kim Y, Moon CH, Kim BY, Young S. Oral Hyaluronic Acid Supplementation for the Treatment of Dry Eye Disease: A Pilot Study. *J Ophthalmol.* 2019;2019:5491626.

¹⁸ Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, et al. TFOS DEWS II Management and therapy report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575-628.

¹⁹ Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(4):312-34.

²⁰ Houlby RD, Ghajar M, Chavez GO. Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29(5):803-6.

²¹ Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965;13(1):238-52.

²² Vicario de la Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome de ojo seco. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2011.

tanto a tiempo cero como a lo largo de un año de almacenamiento bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente o nevera. Según el comportamiento reológico de ambas formulaciones, la incorporación del polímero bioadhesivo al 0,4% incrementó la viscosidad del preparado pudiendo suponer un incremento del tiempo de contacto de ésta con la superficie ocular.

Los estudios de viabilidad celular *in vitro* realizados en conjuntiva y córnea demostraron una buena tolerancia para ambas formulaciones durante al menos 12 meses desde su preparación, siempre y cuando se conserven en nevera. Así mismo, la buena tolerancia *in vivo* de ambas formulaciones evaluada en conejos hace que sean adecuadas para su uso como lágrimas artificiales en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

2. Desarrollo y caracterización de formulaciones liposomales enriquecidas con vitaminas:

Se diseñaron dos lágrimas artificiales con vitamina A (Vit A) como sustancia regeneradora²³ y vitamina C (Vit C) como antioxidante²⁴, usándose como vehículo base las formulaciones liposomales anteriormente citadas.

Tras la realización de varios estudios preliminares, se decidió añadir la vitamina A en forma de acetato de retinol y la vitamina C como sal trisódica 2-fosfo-ascórbica (SAP), en base a los resultados de estabilidad, caracterización fisicoquímica y tolerancia celular *in vitro*. Debido a su carácter lipofílico e hidrofílico, respectivamente, la vitamina A se incorpora en la fase oleosa de la formulación liposomal mientras que vitamina C lo hace en la fase acuosa.

La caracterización de estos dos preparados lagrimales enriquecidos, uno con hialuronato sódico y otro sin él, incluyó la evaluación de parámetros fisicoquímicos (pH, osmolaridad, comportamiento reológico, tensión superficial y tamaño de partícula) así como su tolerancia *in vitro* en conjuntiva y córnea e *in vivo* en conejos. El comportamiento de estas nuevas formulaciones fue similar al mostrado por el vehículo base, siendo ambos preparados óptimos para su utilización por vía tópica ocular.

Para evaluar la eficacia de las dos formulaciones diseñadas en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco fue necesario desarrollar un modelo animal de ojo seco evaporativo en cobayas Dunkin Hartley. El estado de la superficie ocular en los animales de experimentación se evaluó a través de diferentes pruebas clínicas (osmolaridad de la lágrima, valoración de la secreción lagrimal mediante el uso de tiras de rojo de fenol, tinción de la superficie ocular con fluoresceína y citología de impresión de células

²³ Kim EC, Choi JS, Joo CK. A comparison of vitamin a and cyclosporine a 0.05% eye drops for treatment of dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(2):206-13.

²⁴ Serra HM, Cafaro TA. Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2007;41(4):525-32.

epiteliales de la superficie ocular) concluyéndose que la administración de la lágrima artificial enriquecida con polímero es eficaz para dicho tratamiento logrando revertir la enfermedad en menor tiempo que con la administración de una solución isotónica de cloruro sódico (NaCl) al 9‰ (dosis: 10 µL / cuatro veces al día / 15 días).

Asimismo, se evaluó el efecto de la administración de este preparado sobre la salud de la superficie ocular en voluntarios humanos en colaboración con el Hospital Clínico San Carlos. Tras su instilación puntual mejoraron significativamente los parámetros basales de osmolaridad lagrimal, calidad visual y el tiempo de ruptura de la película precorneal.

3. Desarrollo y caracterización de formulaciones liposomales con Ciclosporina A (CsA):

Cuando la sintomatología de la enfermedad de ojo seco no revierte con las lágrimas artificiales, es necesario recurrir al empleo de otros fármacos, como por ejemplo el uso de agentes antiinflamatorios. Por ello, se diseñaron formulaciones liposomales que incluyen Ciclosporina A como agente antiinflamatorio^{25,26}. Debido su carácter hidrofóbico y a su baja solubilidad acuosa y permeabilidad, la Ciclosporina A presenta una baja biodisponibilidad tópica ocular. Por ello, su formulación con liposomas, además de facilitar su vehiculización en medio acuoso, puede mejorar la penetración del fármaco a través de membranas y por tanto optimizar su biodisponibilidad.

Partiéndose de los dos vehículos base desarrollados en la primera etapa de este trabajo doctoral, se elaboraron dos formulaciones con Ciclosporina A al 0,1%, una con polímero y otra sin polímero. A fin de determinar el rendimiento del proceso de encapsulado, se puso a punto la cuantificación de Ciclosporina en la formulación liposomal elaborada sin polímero por HPLC, detectándose una pérdida de aproximadamente el 4% a lo largo del proceso de fabricación.

Tras caracterizar ambas formulaciones a tiempo cero y a lo largo de 6 meses de estabilidad bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente o nevera, se concluyó que los preparados diseñados presentan características fisicoquímicas óptimas y una adecuada tolerancia, tanto in vitro (líneas celulares de conjuntiva y cornea) como in vivo (conejos), para su administración tópica ocular independientemente de las condiciones de almacenamiento empleadas durante esos 6 meses.

Finalmente, se evaluó la eficacia de la formulación liposomal de Ciclosporina A con hialuronato sódico en perros que padecen la patología de ojo seco en el Hospital Clínico Veterinario de la UCM. Para este estudio de eficacia se diseñó un protocolo de evolución clínica que permitiera un seguimiento objetivo de la superficie ocular de los pacientes

²⁵ Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(3):321-38.

²⁶ Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000;47(2-3):119-25.

antes, a lo largo y después del tratamiento valorándose el estado de la conjuntiva y córnea y su producción lagrimal por el test de Schirmer. Tras el tratamiento durante 1 mes de una gota del preparado indicado tres veces al día, la sintomatología de los pacientes mejoró significativamente la sintomatología de la enfermedad de ojo seco espontánea en la especie canina.

STUDY OF LIPOSOMIC OPHTHALMIC FORMULATIONS. IMPLEMENTATION IN DRY EYE DISEASE.

Dry eye disease is one of the most frequent consultations in medical practice, particularly in primary health care and ophthalmology. In 2007, the Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS) reported that the prevalence of dry eye disease ranged from 5% to 30% in individuals over the age of 50²⁷. According to the estimation published in 2017, the prevalence increased to 50% considering symptoms. However, the prevalence based on signs alone was much higher, reaching up to 75% in some populations²⁸. Consequently, dry eye disease is considered one of the diseases of the 21st century.

Dry eye is a multifactorial disease of the ocular surface characterized by a loss of homeostasis of the tear film. Tear film instability and hyperosmolarity damage the ocular surface, either directly or indirectly, starting a series of chain events involving the inflammation and deterioration of ocular surface, neurosensory abnormalities, in addition to complex clinical symptoms that significantly worsen the patient's quality of life²⁹.

Until recently, the management and therapy of dry eye disease had been determined by its severity. Nevertheless, nowadays special attention is paid to the diagnostic of the disease evaluating its origin and the relationship between the clinical signs and the type of pathology (aqueous deficient dry eye or evaporative dry eye), among other factors³⁰.

Currently, there is no treatment to cure dry eye disease. Regardless of its type and severity, it is recommended to modify certain environment conditions and behaviours, in addition to using ocular lubricants, in order to improve the condition of ocular surface.

The use of artificial teardrops may be used separately or in combination with other treatments to treat dry eye disease. As its name implies, artificial teardrops replace or help to preserve the patient's natural tear, therefore minimizing dry eye symptomatology. There is a wide variety of artificial teardrops currently available on the market. However, none of them

²⁷ No authors listed. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007;5(2):93-107.

²⁸ Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, *et al.* TFOS DEWS II Epidemiology report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):334-65.

²⁹ Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C, *et al.* TFOS DEWS II Definition and Classification report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):273-83.

³⁰ Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, *et al.* TFOS DEWS II Management and therapy report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575-628.

succeed in copying it completely due to its complex composition^{31,32} and bilayer structure (lipid and aqueous-mucinous) and continuous basal production^{33,34}, among other factors.

The aim of this doctoral thesis has been the design and the evaluation of new topical ocular formulations oriented to substantially improve the symptoms and signs related to dry eye disease. In order to achieve this aim, it was intended to emulate the physical-chemical characteristics of the natural tear, adding hydrophilic and lipophilic compounds like precorneal tear film.

Given the importance of the precorneal tear film and its high instability in patients with dry eye disease³⁵, lipids were used as liposome vesicles to replace the bilayer of precorneal tear film and stabilize the aqueous-mucin gel layer, reducing the evaporation of aqueous^{36,37}. In addition, due to its vesicular properties, liposome systems have been used as carrier vehicles of drug substances, hydrophilic as well as lipophilic compounds, improving its ocular bioavailability³⁸.

A high percentage of commercialized artificial drops show polymers and/or viscosity-enhancers that help to extend the formulation on the ocular surface in addition to acting as a lubricant³⁹. New formulations designed in this dissertation include hyaluronic acid as sodium hyaluronate, which is a bioadhesive polymer with a similar structure to the mucinous of precorneal film⁴⁰. Polymers help to stabilize the aqueous-mucinous layer minimizing the evaporation of surface water. Moreover, it has been found that hyaluronic acid is involved in inflammatory processes, shows antioxidant and healing properties and promotes epithelial cell proliferations of cornea and conjunctive areas. Thus, hyaluronic acid is particularly useful in the treatment of the origin and symptoms of dry eye disease^{41,42,43}.

³¹ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol*. 2001;45(2):S227-39.

³² Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(11):1467-74.

³³ Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Tisdale A, Fong T, Russo CL. Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(6):2496-506.

³⁴ Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(4):369-74.

³⁵ Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, *et al*. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*. 2017;15:366-403.

³⁶ Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):347-60.

³⁷ Chetty E, Gillan WDH. Reviewing the tear film's lipid layer. *S Afr Optom*. 2008;67(4):155-9.

³⁸ Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv*. 2011;2011:863734.

³⁹ Wegener AR, Meyer LM, Schönfeld CL. Effect of viscous agents on corneal density in dry eye disease. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015;31(8):504-8.

⁴⁰ Mochizuki H, Yamada M, Hato S, Nishida T. Fluorophotometric measurement of the precorneal residence time of topically applied hyaluronic acid. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(1):108-11.

⁴¹ Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, *et al*. TFOS DEWS II Management and therapy report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):575-628.

⁴² Daull P, Feraille L, Elena PP, Garrigue JS. Comparison of the anti-inflammatory effects of artificial tears in a rat model of corneal scraping. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016;32(2):109-18.

⁴³ Kim Y, Moon CH, Kim BY, Young S. Oral Hyaluronic Acid Supplementation for the Treatment of Dry Eye Disease: A Pilot Study. *J Ophthalmol*. 2019;2019:5491626.

Finally, considering that natural tears of dry eye patients are slightly hyperosmolar, new formulations that have been designed show hypoosmolar values to restore the normoosmolarity. In addition, auxiliary compounds were employed, such as borates as a buffer and trehalose as an osmolarity protector^{44,45}. In particular, borates show preservative activity thus extending the stability of formulations without the need of using preservative compounds that damage the ocular surface⁴⁶.

Taking into account the above-mentioned, this doctoral thesis has been structured in three parts:

1. Design, development and characterization of basal liposome formulations or basal vehicles:

Two liposomal formulations were designed using compounds similar to the components of precorneal film: Phosphatidylcholine and Cholesterol as lipidic compounds, Vitamin E as an antioxidant, Borates as buffer agents and Trehalose as an osmoprotectant compound. In addition, one of these formulations included Sodium hyaluronate as a bioadhesive polymer.

Both liposome dispersions were manufactured following the Bangham method^{47,48}, wherein lipophilic compounds are solubilized into an organic volatile solvent that it is subsequently eliminated. The lipidic layer formed is redispersed in an aqueous solution, spontaneously creating liposome vesicles. The process yield was evaluated analysing the lipidic material loss by Vitamin E assay (HPLC method). Moreover, due to the quantification of residual organic solvent in liposome formulations by Headspace Solid Phase Microextraction – Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-SPME-GCMS), the manufacturing process could be optimized.

Both formulations were characterized from a physical-chemical point of view (pH, osmolarity, rheological behaviour, surface tension and vesicle size), at the time of manufacturing as well as over a year-long period. All samples were stored in darkness and some were kept at room temperature while others were refrigerated. According to the results obtained, the addition of bioadhesive polymer at 0.4% increased the viscosity of the formulation, which can result in an increment of residence time of formulation on the ocular surface.

⁴⁴ Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, *et al.* TFOS DEWS II Management and therapy report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575-628.

⁴⁵ Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(4):312-34.

⁴⁶ Houlby RD, Ghajar M, Chavez GO. Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29(5):803-6.

⁴⁷ Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965;13(1):238-52.

⁴⁸ Vicario de la Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome de ojo seco. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2011.

The *in vitro* cell viability assays performed in conjunctive and corneal cells demonstrated an optimal tolerance to both formulations along 12 months, if the formulations are refrigerated. Furthermore, after topical ocular administration in rabbits, both preparations showed proper tolerance thus they could be used as artificial teardrops for the treatment of dry eye disease.

2. Design, development and characterization of liposome formulations enriched with vitamins:

Two artificial teardrops were developed with Vitamin A as a regeneration substance⁴⁹ and Vitamin C as an antioxidant agent⁵⁰. For that, the aforementioned liposome formulations have been used as basal vehicles.

Based on the stability and the *in vitro* tolerance results obtained in preliminary studies, Vitamin A was added as retinyl acetate and Vitamin C as 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt. Due to its respective lipophilic and hydrophilic behaviours, Vitamin A is included in the lipidic layer of liposome vesicles while Vitamin C is in the aqueous solution.

Both formulations were characterized according to physical-chemical parameters (pH, osmolarity, rheological behaviour, surface tension and particle size) in addition to tolerance *in vitro* in conjunctive and corneal cells and tolerance *in vivo* in rabbits. The behaviour of both preparations was like the properties of basal vehicles thus both new formulations show suitable properties to be used for topical ocular administration.

To analyse the efficacy of these formulations for the treatment of dry eye disease, it was necessary to develop an animal model with evaporative dry eye in Dunkin Hartley guinea pigs. The ocular surface status of these experimental animals was evaluated by several clinical trials (osmolarity, phenol red thread test, fluorescent eye test and conjunctival impression cytology) concluding that formulation with vitamins and Sodium hyaluronate is more efficient to reverse the dry eye disease in short term than using an isotonic solution of 9‰ Sodium chloride (NaCl) (dosage: 10 µL / four times per day / 15 days).

In collaboration with Clinical San Carlos Hospital, the impact of this formulation was evaluated on the ocular surface health in humans. After only one instillation, an improvement of basal parameters of osmolarity, visual quality and rupture time test was observed.

⁴⁹ Kim EC, Choi JS, Joo CK. A comparison of vitamin a and cyclosporine a 0.05% eye drops for treatment of dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(2):206-13.

⁵⁰ Serra HM, Cafaro TA. Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2007;41(4):525-32.

3. Design, development and characterization of liposome formulations with Cyclosporine A:

When symptoms of dry eye disease are not reverted using artificial teardrops, it is necessary to use other pharmaceutical treatments, such as anti-inflammatory agents.

Two new preparations were designed including Cyclosporine A as anti-inflammatory agents^{51,52}. Due to hydrophobic behaviour, low aqueous solubility and permeability properties, Cyclosporine A shows low bioavailability by topical ocular route. Thus, the inclusion of Cyclosporine A into liposome vesicles helps transport it in aqueous solutions and improves its penetration into ocular membranes optimizing its bioavailability.

Based on two basal vehicles designed, two preparations with Cyclosporine A 0.1% were elaborated, one of them with polymer and the other without polymer. In order to determinate the yield of the encapsulation process, the Cyclosporine A amount in the liposomal formulation made without polymer was evaluated by HPLC, detecting a loss of approximately 4% throughout the manufacturing process.

After characterizing both formulations at time zero and for six months under darkness and room temperature or refrigerated conditions, both preparations showed proper physical-chemical properties and suitable tolerance, *in vitro* assays with conjunctive and corneal cells and *in vivo* experiments with rabbits. Thus, both formulations could be administrated by topic ocular route regardless of storage conditions used.

Finally, the efficacy of Cyclosporine A formulation with Sodium hyaluronate was evaluated in dogs that had dry eye disease. This trial was performed in the Clinical Veterinarian Hospital of the Complutense University of Madrid. For that, a protocol was elaborated for following the clinical evolution of symptoms observed in conjunctive and corneal surfaces and tear production by Schirmer test. After a month of treatment administrating one drop three times a day, symptoms related to dry eye disease improved significantly.

⁵¹ Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(3):321-38.

⁵² Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000;47(2-3):119-25.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA OCULAR

El sistema de información visual o sentido de la vista permite interpretar la información recibida por el ojo a través de estímulos luminosos externos. Las señales luminosas son captadas por la retina (membrana sensible a la luz), codificadas y transmitidas al cerebro en donde se produce el fenómeno de la visión.

Anatómicamente, el sistema visual consta de cuatro partes:

- Globo ocular, considerado el órgano de la visión ya que en él se localiza la retina y el sistema óptico que conduce los haces luminosos hasta ella.
- Anejos oculares, estructuras destinadas a alojar y proteger al globo ocular.
- Vía óptica la cual engloba los mecanismos de transmisión del sistema nervioso que transportan los impulsos nerviosos generados en la retina hasta el córtex cerebral en donde son procesados.
- Sistema muscular extraocular el cual permite al globo ocular moverse para determinar el campo de recepción.

El ojo o globo ocular es una estructura esférica ligeramente abombada en su superficie anterior y de aproximadamente 2,5 cm de diámetro. Está localizado en la **cavidad orbitaria** u **órbita ósea**, la cual tiene cuatro paredes, un reborde y un vértice, donde se ubica el canal óptico; además de las fisuras orbitarias. A su vez, el ojo está protegido por párpados, conjuntiva y aparato lagrimal (**Figura 1**).

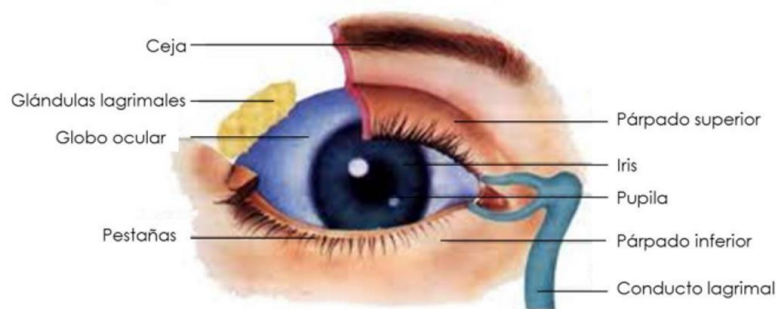


Figura 1: Anejos del globo ocular.

Los **párpados** son repliegues de la piel que cierran la órbita ocular. De este modo protegen físicamente al ojo y mejoran la lubricación de la superficie ocular. Cada globo ocular está protegido por dos párpados, superior e inferior, llamándose a la zona de unión entre ambos hendidura palpebral. Cada párpado presenta dos caras, anterior y posterior, y dos bordes, libre y adherente, localizándose en el borde libre las pestañas y las glándulas sebáceas.

La **conjuntiva** es una membrana mucosa vascularizada, delgada y transparente que reviste el segmento anterior del globo ocular, desde el limbo hasta los párpados, protegiendo la superficie ocular. De fuera a dentro, la conjuntiva se divide en 3 capas: *conjuntiva tarsal o palpebral* (capa que recubre la superficie interna de los párpados llegando hasta la zona del fornix), *fornix* o *fondo de saco conjuntival* (zona de transición entre la zona conjuntival tarsal y la bulbar) y *conjuntiva bulbar* (zona que recubre el globo ocular hasta el limbo esclerocorneal). El tejido conjuntival es rico en células caliciformes. Dichas células se encargan de secretar mucinas, componentes indispensables para el buen funcionamiento de la visión.

Así mismo, el **aparato lagrimal** protege al ojo al favorecer la humectación de conjuntiva y córnea. Dicho aparato interviene en la segregación de la lágrima gracias a la glándula lagrimal y en su drenaje a través del llamado aparato de drenaje.

La producción lagrimal basal es de aproximadamente 1,2 $\mu\text{L}/\text{min}$ (rango 0,5 – 2,2 $\mu\text{L}/\text{min}$), disminuyendo significativamente a partir de los 60 años. En individuos sanos, el 16% del total de la lágrima es renovado cada minuto durante las horas de vigilia. Además, la producción lagrimal puede ser inducida por factores externos como por ejemplo bajas temperaturas, exceso de luz o irritación química o mecánica de la superficie ocular, incrementando su flujo hasta un máximo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. De este modo, se produce un lavado de la superficie ocular y la eliminación de los cuerpos extraños en el caso de existir irritación química o mecánica⁵³.

Del mismo modo, para asegurar una correcta visión es imprescindible controlar el movimiento de los ojos. Cada ojo está rodeado por seis **músculos extraoculares** –cuatro músculos rectos (superior, inferior, medio y lateral) y dos oblicuos (superior e inferior)-insertados sobre el globo ocular a través de la esclera y que se contraen o relajan en coordinación con los músculos del ojo opuesto (**Figura 2**). Dichos músculos están inervados por tres **nervios craneales**, el nervio motor ocular común (III), el nervio troclear o patético (IV) y el nervio motor ocular externo (VI), lo que permite al sistema nervioso central controlar de forma precisa los movimientos de ambos ojos, mantener la fusión visual de las imágenes, así como fijar, focalizar y seguir una diana visual.

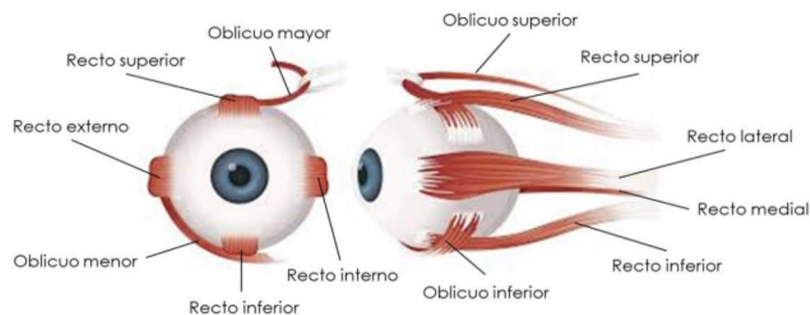


Figura 2: Musculatura extraoculares.

⁵³ Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1595-639.

Anatómicamente, el **globo ocular** se encuentra dividido en dos hemisferios (segmento anterior y segmento posterior) por el cristalino, estructura transparente, avascular y con forma elíptica que actúa como lente biconvexa con un gran poder de refracción y acomodación permitiendo que los rayos luminosos se desvíen e incidan sobre la retina (**Figura 3**).

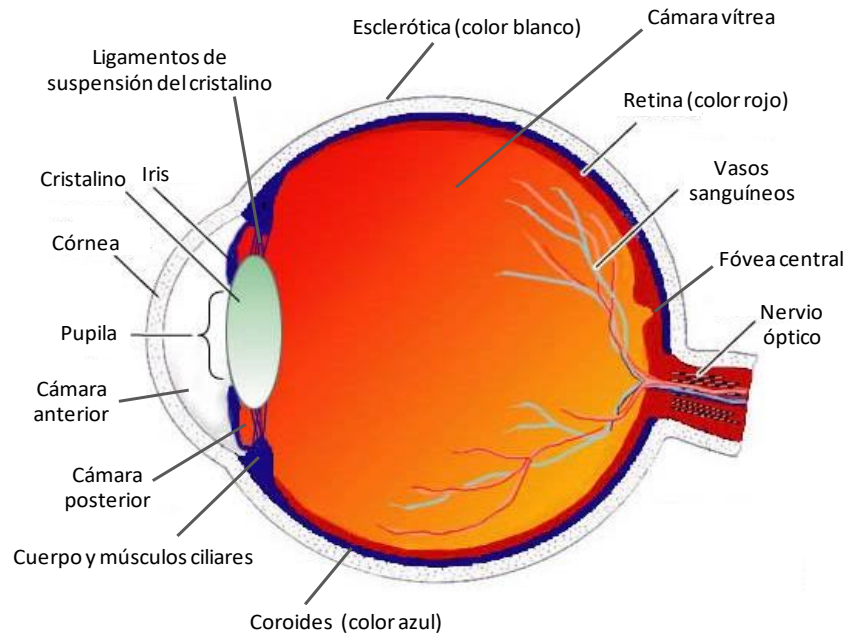


Figura 3: Estructura del globo ocular.

El *segmento anterior*, localizado entre la córnea y el cristalino, representa un sexto del globo ocular. Por el iris, queda dividido en dos áreas, la *cámara anterior* comprendida entre la córnea y el iris y la *cámara posterior* situada entre el iris y el cristalino. La cavidad del segmento anterior está rellena por un líquido denominado humor acuoso el cuál, además de nutrir a las células del cristalino y córnea, ejerce una presión intraocular adecuada que mantiene la forma de globo ocular.

El *segmento posterior o cámara vítrea* es el compartimento de mayor tamaño ubicado entre el cristalino y la retina. Está relleno de un gel transparente llamado humor vítreo constituido por agua, colágeno y glucosaminoglicanos, en especial ácido hialurónico, además de por glucosa y electrolitos tales como sodio, cloro y potasio. Dicho líquido, junto con el humor acuoso, es responsable de la presión intraocular, participando en el mantenimiento de la forma esférica del ojo y realizando una función de soporte de la retina contra las estructuras internas del globo ocular⁵⁴.

A nivel tisular, el globo ocular consta de tres capas concéntricas: la capa externa o fibrosa, la capa media, vascular o úvea y la capa interna o nerviosa.

⁵⁴ Reinhard P, Reinhard P. (2006). *Sobotta. Atlas de Anatomía Humana. Tomo 2*, Madrid, España: Panamericana.

- La capa externa o fibrosa se encarga de proteger al resto de tejidos intraoculares ya que, al estar constituida por tejido colagenoso, presenta una gran resistencia. Consta de dos zonas, la córnea localizada en parte anterior del globo ocular y la esclerótica o esclera en la posterior, unidas entre sí por el denominado limbo esclerocorneal.

La *córnea* es una estructura fibrosa de aproximadamente 12 mm de diámetro que recubre el iris. La ausencia de vascularización y la distribución regular de sus fibras de colágeno le hace ser transparente lo que, unido a su forma ovalada, le permite actuar como lente. Estructuralmente, de fuera a dentro, consta de las siguientes 5 capas⁵⁵:

- Epitelio corneal: epitelio escamoso formado por 5 o 6 filas de células estratificadas no queratinizadas, fuertemente unidas entre sí. La capa basal está fijada firmemente a la membrana de Bowman por medio de una membrana basal continua mientras que las capas más superficiales son eliminadas por el movimiento de los párpados. Presenta una gran capacidad regenerativa renovándose en su totalidad cada 7 días.
- Membrana de Bowman: capa acelular fina, densa y transparente, constituida por fibras de colágeno y localizada entre el epitelio corneal y el estroma. Mantiene la integridad de la córnea al presentar gran resistencia frente a posibles deformaciones traumáticas, al paso de cuerpos extraños y los microorganismos.
- Estroma: capa que representa el 90% del espesor corneal estando constituida por haces densos de colágeno dispuestos regularmente en paralelo conformando laminillas y recubiertos por una sustancia rica en mucoproteínas y glicoproteínas.
- Membrana de Descemet: lámina acelular de gran resistencia y elasticidad compuesta por colágeno.
- Endotelio: monocapa de células hexagonales con escasa o nula capacidad regenerativa por lo que su número de células disminuye con el tiempo.

La *esclerótica o esclera* es una membrana firme y blanquecida que cubre todo el globo ocular, salvo la zona de la córnea, formada por tejido conectivo denso y opaco. Presenta una superficie externa (epiesclera) que sirve como punto de inserción de los músculos extraoculares y un estroma escleral constituido por tejido conectivo fibroelástico. El espacio epiescleral separa la esclera de la cara interna de la cápsula de Tenon. En la parte posterior, sufre modificaciones en su estructura apareciendo una zona porosa denominada lámina cribosa. Esta malla colagenosa es atravesada por las fibras nerviosas de la retina que forman el nervio óptico. En la zona central se encuentra un orificio de mayor tamaño que permite el paso de la arteria y venas centrales de la retina.

⁵⁵ Pastor Jimeno JC, Maldonado López MJ. (2011). *Guiones de Oftalmología*, Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.

- La capa intermedia, túnica vascular o úvea consta a su vez de tres partes: coroides, cuerpo ciliar e iris.

La *coroides*, capa muy vascularizada, reviste la tres quintas partes de la superficie interna de la esclerótica. Su función principal es proporcionar nutrientes al epitelio pigmentario de la retina, además de absorber los rayos luminosos que no son absorbidos por ella.

El *cuerpo ciliar* es un tejido fino y vascular que rodea al cristalino. Está formado por dos zonas diferenciadas: la pars plicata que contiene el músculo ciliar y los procesos ciliares y la pars plana. El músculo ciliar está formado por fibras musculares lisas y es responsable de la acomodación ocular ya que altera la forma del cristalino para adaptarlo a la visión lejana o cercana. En cambio, las células epiteliales de los procesos ciliares se encargan de secretar el humor acuoso. Sobre los procesos ciliares se insertan las fibras de tejido conectivo del ligamento suspensorio (o zónula de Zinn) que se encargan de sostener al cristalino.

El *iris* es la porción coloreada del globo ocular, suspendido entre la córnea y el cristalino y unido a los procesos ciliares. Está formado por fibras musculares que regulan la cantidad de luz que penetra a la parte posterior del ojo a través de la pupila. El diámetro de la pupila es modificado por acción de dos músculos, el músculo esfínter pupilar inervado por el sistema parasimpático y el músculo radial, inervado por el sistema simpático. La estimulación parasimpática produce una disminución del diámetro pupilar (miosis) mientras que la activación del sistema simpático provoca la dilatación pupilar (midriasis).

- La capa interna, nerviosa o retina es el estrato sensorial neural del globo ocular, siendo considerado el comienzo de la vía visual por ser el lugar en donde se transforma el estímulo nervioso en un impulso eléctrico.

La retina se localiza en la parte posterior interna del ojo en contacto con la cara interna de la coroides y el humor vítreo. Estructuralmente está dividida en diez capas, aunque funcionalmente se organiza en dos regiones básicas, la capa externa o epitelio pigmentario (porción no visual) y la capa interna o zona nerviosa (porción visual).

El epitelio pigmentario se encuentra en contacto directo con la coroides de la que recibe los nutrientes necesarios para el resto de las capas de la retina. Junto con la coroides, absorbe los rayos luminosos dispersos impidiendo la dispersión y reflexión de la luz en el interior del globo ocular.

En cambio, la porción nerviosa localizada entre el epitelio pigmentario y el humor vítreo consta de tres tipos de neuronas: fotorreceptores (conos y bastones), células

bipolares y células ganglionares. Los fotorreceptores se encuentran principalmente situados en la parte central de la retina denominada fovea, disminuyendo su número a medida que nos alejamos hacia la periferia. Los bastones, localizados en la retina periférica, son los responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad y en blanco y negro. En cambio, los conos localizados en la parte posterior central de la retina denominada mácula, presentan una menor sensibilidad frente a la luz que los bastones, pero proporcionan la visión del color y facilitan una mayor agudeza visual.

De este modo, la luz es captada por los conos y bastones que transforman las imágenes recibidas en impulsos nerviosos. Estos, son transmitidos a las células bipolares y después a las ganglionares cuyos axones componen el nervio óptico, llegando el estímulo nervioso hasta la corteza cerebral, en donde se procesan las imágenes.

2.2. SUPERFICIE OCULAR

La denominada **unidad funcional lagrimal** es un único sistema funcional constituido por diferentes estructuras anatómicas tales como párpados, glándulas lagrimales, la superficie ocular (córnea, conjuntiva y glándulas de Meibomio), así como los nervios sensoriales y motores que los conectan⁵⁶.

Dicha unidad funcional regula los principales componentes de la película lagrimal y responde a estímulos ambientales, endocrinos y corticales interviniendo directamente sobre la integridad de la película lagrimal, la transparencia de la córnea y, de este modo, en la proyección de la imagen en la retina^{57,58,59}. Por lo tanto, la alteración de cualquiera de estos elementos puede desestabilizar la película lagrimal y provocar daños en la superficie ocular ocasionando la enfermedad de ojo seco.

La **película precorneal o film lagrimal precorneal** es una delgada capa de entre 2 – 5,5 μm (dependiendo del instrumento de medida empleado) con un volumen total máximo de 10 μL ^{60,61}, que recubre la superficie ocular evitando su contacto directo con el exterior.

La película lagrimal es una estructura dinámica por estar en continua renovación, siendo la secreción normal basal de 1 – 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($16 \pm 5\%/\text{min}$)^{62,63}. Está constituida principalmente por

⁵⁶ Sade de Paiva C, Pflugfelder SC. Tear clearance implications for ocular surface health. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):395-7.

⁵⁷ Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five year review. *Cornea.* 2000;19(5):644-9.

⁵⁸ Beuerman RW, Mircheff A, Pflugfelder SC, Stern ME. The lacrimal functional unit, in Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME (eds). *Dry eye and ocular surface disorders*. New York. Marcel Dekker, 2004.

⁵⁹ Stern ME, Gao J, Siemanko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res.* 2014;78(3):409-16.

⁶⁰ Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul. Surf.* 2017;15:366-403.

⁶¹ Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1595-639.

agua, lípidos, proteínas y mucinas. La disposición de dichos componentes ha dado lugar a diferentes teorías en cuanto a la estructura de la película precorneal.

La concepción clásica defiende que la película lagrimal consta de tres capas: una capa lipídica exterior, una capa central de naturaleza acuosa y una capa interna constituida por mucinas⁶⁴. En cambio, en los últimos años números estudios han desmontado dicha teoría al haberse detectado mucinas en el fluido acuoso. De este modo, las anteriormente consideradas capa central y capa interna han pasado a ser consideradas una única capa denominada “acuomucinoso”, en donde se combinan componentes acuoso-protéicos y mucinosos para formar un gel hidratado⁶⁵ (**Tabla 1**).

Tabla 1: Comparativa entre los esquemas clásico y actual de la estructura de la película precorneal.

Estructura de la película precorneal (esquema clásico)	Estructura de la película precorneal (esquema actual)
	<ul style="list-style-type: none"> Mucinas de unión a membrana Fragmento mucinas de unión a membrana Mucinas formadoras de gel Lisozima Inmunoglobulina A Transferrina Defensina Factortrefoil

La capa lipídica, de aproximadamente 42 nm de espesor medio⁶⁶, contiene fundamentalmente lípidos segregados por las glándulas de Meibomio situadas en la zona tarsal de los párpados superior e inferior. También se pueden incorporar lípidos que migran desde la capa mucoacuosa^{67,68}.

⁶² McCulley JP, Uchiyame E, Aronowicz JD, Butovich IA. Impact of evaporation on aqueous tear loss. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2006;104:121-8.

⁶³ Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, *et al.* TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul. Surf.* 2017;15:366-403.

⁶⁴ Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol.* 1977;22(2):69-87.

⁶⁵ Craig JP, Willcox MD, Argüeso P, Maissa C, Stahl U, Tomlinson A, *et al.* The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort: report of the contact lens interactions with the tear film subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(11):TFOS123-56.

⁶⁶ King-Smith PE, Hinel EA, Nichols JJ. Application of a novel interferometric method to investigate the relation between lipid layer thickness and tear film thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(5):2418-23.

⁶⁷ Isreb MA, Greiner JV, Korb DR, Glonek T, Mody SS, Finmore VM, *et al.* Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break-up time and Schirmer's test. *Eye.* 2003;17(1):79-83.

⁶⁸ Korb DR, Scaffidi RC, Greiner JV, Kneynon KR, Herman JP, Blackie CA, *et al.* The effect of two novel lubricant eye drops on tear film lipid layer thickness in subjects with dry eye symptoms. *Optom Vis Sci.* 2005;82(7):594-601.

La secreción de las glándulas de Meibomio consta de aproximadamente un 95% de lípidos no polares (ésteres de cera y ésteres de colesterol, además de una pequeña cantidad de triglicéridos) y un 5% de lípidos polares (o-acil- ω -hidroxi ácidos grasos, AHAG) y fosfolípidos. La concentración de AHAG supera la de los fosfolípidos en el fluido secretado inicialmente, pero la proporción se invierte en la película lagrimal. En condiciones normales, el bajo punto de fusión de la mezcla lipídica (19 – 32 °C) facilita su paso a la película lagrimal (tejidos de alrededor a 37 °C). Variaciones en su composición pueden modificar el punto de fusión de la mezcla, dificultando su segregación y provocando alteraciones en la película lagrimal⁶⁹.

Los lípidos segregados se extienden sobre la capa acuomucinoso de la película lagrimal en cada parpadeo, evitándose así la evaporación de los componentes acuosos cuando el ojo está abierto. Por otro lado, permiten que la superficie ocular esté suave y lisa para obtener una óptima calidad visual. Así mismo, la capa lipídica previene de la contaminación de la película lagrimal y; al disminuir la tensión superficial de la lágrima, previene su rebosamiento por los márgenes del párpado además de favorecer un adecuado sellado de éstos durante el sueño^{70,71}.

Dentro de la capa lipídica, los lípidos polares se disponen en contacto directo con la capa acuomucinoso mientras que los lípidos apolares se colocan entrando en contacto directo con el aire formándose de este modo dos capas diferenciadas, la capa polar hidrofílica y la capa no polar o hidrófoba, respectivamente⁷². La compleja estructura permanece estable gracias al parpadeo que, a modo de acordeón, se aproxima al margen del párpado cuando el ojo se cierra durante el parpadeo y se despliega en la fase de apertura del ojo.

En cuanto a la capa acuomucinoso o mucus, que supone un 90% del total de la película lagrimal, es una fase acuosa que contiene mucinas, electrolitos, glucosa, proteínas, factores de crecimiento, vitaminas, citoquinas, inmunoglobulinas y hormonas^{73,74,75,76}.

La glándula lagrimal y glándulas accesorias colaboran en la formación de dicha capa segregando la mayoría de sus componentes para, posteriormente, ser extendidos sobre la superficie ocular por los párpados durante el parpadeo y recolectada por los canalículos lagrimales, el saco lagrimal y el conducto nasolacrimal, el cual conecta con el canal nasal inferior.

⁶⁹ Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol.* 2007;52(4):369-74.

⁷⁰ Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):347-60.

⁷¹ Chetty E, Gillan WDH. Reviewing the tear film's lipid layer. *S Afr Optom.* 2008;67(4):155-9.

⁷² Butovich IA, Uchiyama E, McCulley JP. Lipids of human meibum: mass-spectrometric analysis and structural elucidation. *J Lipid Res.* 2007;48(10):2220-35.

⁷³ Tiffany JM. The normal tear film. *Dev Ophthalmol.* 2008;41:1-20.

⁷⁴ Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye.* 2003;17(8):923-6.

⁷⁵ Johnson ME, Murphy PJ. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23(4):449-74.

⁷⁶ Mantelli F, Argüeso, P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(5):477-83.

Entre los electrolitos presentes en la lágrima destacan Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HB_2O_3^- y PO_4^{3-} siendo los responsables de mantener la osmolaridad lagrimal y regular su pH asegurando así la integridad del epitelio corneal y conjuntival^{77,78}.

Dentro de los más de 60 tipos de proteínas presentes en la capa acuomucinososa, se encuentran la lisozima, la lactoferrina, la lipocalina y la inmunoglobulina IgA⁷⁹, además de marcadores inflamatorios como las interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 y el factor de necrosis tumoral TNF- α . Dichos marcadores se hayan en mayor concentración en situaciones patológicas como en el caso de la enfermedad de ojo seco^{80,81,82,83,84,85,86,87}.

Es necesario resaltar, la presencia de vitamina A y de los factores de crecimiento TGF- β (transforming growth factor β), EGF (epithelial growth factor) y HGF (hepatocyte growth factor) ya que son vitales para un adecuado crecimiento del epitelio de la superficie ocular. De hecho, el déficit de vitamina A está asociado con queratinización, disminución del número de células globet, aumento de la mitosis de células del epitelio conjuntival y alteraciones en los procesos de diferenciación de la mucosa, producción de mucinas y expresión genética de mucinas⁸⁸.

Sin embargo, el principal componente la capa acuomucinososa es la mucina. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular que contienen más de un 50% de carbohidratos. Tienen una cadena lineal polipeptídica formada por grupos repetidos de aminoácidos a la que se le unen cadenas laterales de polisacáridos. Las regiones ricas en serina y treonina son glicosiladas mientras que los dominios ricos en cisteína quedan libres para unirse a otras moléculas. Las mucinas oculares se dividen funcionalmente en dos grupos, mucinas transmembrana y mucinas de secreción⁸⁹.

⁷⁷ Carney LG, Hill RM. Human tear buffering capacity. *Arch Ophthalmol*. 1979;97(5):951-2.

⁷⁸ Bachman WG, Wilson G. Essential ions for maintenance of the corneal epithelial surface. *Invest Ophthalm Vis Sci*. 1985;26(11):1484-8.

⁷⁹ Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clin Chim Act*. 2006;369(1):17-28.

⁸⁰ Yoshino K, Garg R, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Production and secretion of transforming growth factor beta (TGF-beta) by the human lacrimal gland. *Curr Eye Res*. 1996;15(6):615-24.

⁸¹ Stern ME, Pflugfelder, SC. Inflammation in dry eye. *Ocul Surf*. 2004;2(2):124-30.

⁸² De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, Pitcher JD, Fang B, Zheng X, *et al*. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol*. 2009;2(3):243-53.

⁸³ Chauhan SK, El Annan J, Ecoiffier T, Goyal S, Zhang Q, Saban DR, *et al*. Autoimmunity in dry eye is due to resistance of Th17 to Treg suppression. *J Immunol* 2009;182(3):1247-52.

⁸⁴ Chauhan SK, Dana R. Role of Th17 cells in the immunopathogenesis of dry eye disease. *Mucosal Immunol*. 2009;2(4):375-8.

⁸⁵ Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreno E, García-Vázquez C, *et al*. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis*. 2010;16:862-73.

⁸⁶ Albertsmeyer AC, Kakkassery V, Spurr-Michaud S, Beeks O, Gipson IK. Effect of pro-inflammatory mediators on membrane-associated mucins expressed by human ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2010;90(3):444-51.

⁸⁷ De Paiva CS, Hwang CS, Pitcher JD, Pangelinan SB, Rahimy E, Chen W, *et al*. Age-related T-cell cytokine profile parallels corneal disease severity in Sjogren's syndrome-like keratoconjunctivitis sicca in CD25KO mice. *Rheumatology*. 2010;49(2):246-58.

⁸⁸ Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(11):1595-639.

⁸⁹ Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):379-88.

Las mucinas transmembrana forman parte del glicocálix de las células apicales del epitelio corneal y conjuntival (MUC-1, MUC-4, MUC-16, MUC-20), alisando las irregularidades de su superficie. Estructuralmente, presentan grandes dominios extracelulares, un dominio que abarca la membrana hidrófoba y un dominio citoplasmático corto. Los grupos hidrofílicos quedan libres favoreciendo la retención de agua sobre la membrana de estas células y formando una barrera epitelial protectora. De este modo el epitelio corneal hidrófobo pasa a ser una superficie hidrófila, la cual puede ser humectada por la fase acuosa de la película precorneal, favoreciéndose la lubricación de la córnea y facilitándose el deslizamiento de los párpados sobre ella⁹⁰. Otras de las mucinas transmembrana localizadas en la capa acuomucinoso de la película lagrimal son: MUC-13, MUC-15 y MUC-17^{91,92}.

Dentro del grupo de las mucinas de secreción, existen dos subgrupos: las mucinas formadoras de gel y las mucinas solubles. Las primeras, presentan dominios ricos en cisteína por lo que, al ser zonas libres de cadenas laterales, pueden unirse a otras moléculas otorgándoles la capacidad de formar moléculas poliméricas o tipo gel⁹³ facilitando la retención de agua en su estructura. Entre ellas destaca la MUC-5AC, mucina secretada por las células caliciformes del epitelio conjuntival que presenta 4 dominios ricos en cisteína, lo cuales permiten la creación de enlaces disulfuro entre diferentes moléculas de MUC-5AC dando lugar a la formación de redes de mucina. La formación de un gel mucoso muy hidratado contribuye a la hidratación de la superficie epitelial además de otorgar a la película lagrimal un comportamiento pseudoplástico por el cual, la viscosidad de la misma disminuye durante el parpadeo y aumenta cuando la película se encuentra en reposo^{94,95}.

En cuanto a las mucinas solubles (MUC-7 y MUC-9), son mucinas de menor tamaño secretadas por las glándulas lagrimales. Al no presentar dominios ricos en cisteína, no establecen uniones intramoleculares encontrándose en forma de monómeros. En las glándulas salivares tienen acción antimicrobiana siendo probable que desempeñen la misma función en las glándulas lagrimales^{96,97}.

⁹⁰ Sumiyoshi M, Ricciuto, J., Tisdale, A., Gipson, I.K., Mantelli, F., Argüeso P. Antiadhesive character of mucin O-glycans at the apical surface of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(1):197-203.

⁹¹ Argüeso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res.* 2001;73(3):281-9.

⁹² Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argüeso P. Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(1):114-22.

⁹³ Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye.* 2003;17(8):923-6.

⁹⁴ Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I. Assay of mucins in human tear fluid. *Exp Eye Res.* 2007;84(5):939-50.

⁹⁵ Argüeso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjögren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1004-11.

⁹⁶ Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):379-88.

⁹⁷ Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(5):477-83.

Durante el parpadeo, el mucus es arrastrado por el párpado superior sobre la superficie ocular junto con posibles bacterias, restos de células y cuerpos extraños que se queden acumulados en él, formándose una fibra mucosa (fibras gruesas dispuestas en haces). Estas fibras son transportadas durante el parpadeo hasta el *canthus* interno del ojo y expulsadas sobre la piel.

En resumen, la capa acuomucinoso de la película lagrimal participa en el aporte de oxígeno y nutrientes al epitelio corneal y en la eliminación por arrastre mecánico de las sustancias de desecho que en él se producen, además de tener acción microbiana. Así mismo, gracias a la presencia de las mucinas, mantiene la hidratación de la superficie ocular allí donde el glicocálix es defectuoso, asegura una adecuada calidad visual, otorga propiedades viscoelásticas a la lágrima, protege la superficie ocular de daños externos y facilita los movimientos de los párpados al evitar que la superficie conjuntival de estos quede adherida a la superficie corneal durante el parpadeo o el sueño (función lubricante)⁹⁸.

Por lo tanto, cualquier alteración en la composición de alguna de las dos capas que constituyen la película lagrimal o en los sistemas de segregación o aclaramiento de la lágrima regulados por la unidad funcional lagrimal puede dar lugar a infecciones oculares, trastornos funcionales de la agudeza visual^{99,100} u otras patologías oculares como la enfermedad ojo seco^{101,102,103}.

⁹⁸ Sumiyoshi M, Ricciuto, J., Tisdale, A., Gipson, I.K., Mantelli, F., Argüeso P. Antiadhesive Character of Mucin O-glycans at the Apical Surface of Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(1):197-203.

⁹⁹ Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. *Br J Ophthalmol.* 1992;76(3):157-8.

¹⁰⁰ Rolando M, Lester M., Macrí A., Calabria G. Low spatial-contrast sensitivity in dry eyes. *Cornea.* 1998;17(4):376-9.

¹⁰¹ Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol.* 2007;52(4):369-74.

¹⁰² McCulley JP, Shine WE. Eyelid disorders: the meibomian gland, blepharitis, and contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2003 Jan;29(1 Suppl):S93-5;discussion S115-8, S192-4.

¹⁰³ McCulley JP, Shine WE. Meibomian gland and tear film lipids: structure, function and control. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506 (Pt A):373-8.

2.3. NUEVOS PREPARADOS TÓPICOS OCULARES

2.3.1. Vías de administración

Cuando se busca un efecto terapéutico en el ojo, se puede administrar el fármaco utilizando vías que impliquen efecto sistémico o local. A pesar de que las vías con acción sistémica son más cómodas y económicas, en general, no resultan adecuadas para el tratamiento de enfermedades oculares ya que las barreras hematoacuosa y hemoretiniana limitan la llegada de las sustancias activas al interior del globo ocular. En cambio, las vías oftálmicas de administración local mejoran la eficacia y la seguridad del tratamiento pudiéndose clasificar en:

- **Vía tópica:** administración del fármaco sobre la superficie ocular.
- **Vía periocular:** administración del fármaco en las zonas adyacentes a la esclera. Puede ser útil para tratamientos de enfermedades del segmento anterior y/o posterior del ojo.
- **Vía intraocular:** depósito directo del fármaco en el humor acuoso (intracameral) o vítreo (intravítrea). Este tipo de administración presenta una mayor eficacia que las vías de administración anteriores, pero muestra riesgo de producir infecciones oculares, como por ejemplo endoftalmitis, además de poder ocasionar desprendimiento de retina o perforación del globo ocular.

De todas estas vías de administración local, la más empleada es la vía tópica por ser la menos invasiva y la más segura, económica y de fácil aceptación por parte de los pacientes, mejorando su adherencia al tratamiento. Sin embargo, la biodisponibilidad del fármaco suele ser baja debido a los siguientes motivos, pudiéndose poner en riesgo la eficacia de la terapia^{104,105}.

- *Baja dosis de administración:*

Por la anatomía del *cul de sac*, la cantidad a administrar se limita a 7 – 10 µL.

- *Rápida eliminación del fármaco de la región precorneal:*

El tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular está limitado por la acción del parpadeo y la continua renovación de la película precorneal. Así mismo, parte de la dosis aplicada puede ser absorbida por la conjuntiva pasando a circulación sistémica y parte puede ser degradada por acción enzimática. De este modo, prácticamente el 90% de la dosis administrada es eliminada de la superficie ocular en aproximadamente 2 minutos siendo solamente el 1 – 5 % de la dosis capaz de atravesar las barreras corneales y acceder al interior del ojo^{106,107}.

¹⁰⁴ Gaudana R, Jwala J, Boddu S, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res.* 2009;26(5):1197-216.

¹⁰⁵ Gaudana R, Ananthula H, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. *AAPS J.* 2010;12(3):348-60.

¹⁰⁶ Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(7):558–62.

- *Presencia de barreras que dificultan la llegada del fármaco a su lugar de acción:*

El ojo presenta un gran número de barreras fisiológicas como mecanismo de protección. Por ejemplo, la córnea es una barrera altamente selectiva. De sus 5 capas, tanto el epitelio corneal como el estroma son selectivos frente al paso de sustancias. En concreto, el epitelio corneal, al ser lipofílico y tener fuertes uniones intercelulares, limita el paso de sustancias hidrófilas. En cambio, el estroma al ser hidrofílico, limita la penetración de moléculas lipófilas.

2.3.2. Nuevas estrategias utilizadas en el desarrollo galénico

En los últimos años han aparecido nuevas estrategias encaminadas a conseguir aumentar la incorporación del principio activo a nivel ocular, así como su permanencia en la superficie ocular.

a) Uso de promotores o potenciadores de la penetración

El flujo transmembrana del principio activo puede ser favorecido al usar promotores o potenciadores de la penetración. Estas sustancias aumentan la permeabilidad de la córnea al alterar las uniones intercelulares de las células corneales y la bicapa lipídica de la membrana celular. Sin embargo, su empleo está desaconsejado en terapias a largo plazo, ya que además de dañar la superficie del epitelio corneal, penetran al interior del ojo pudiendo causar alteraciones importantes¹⁰⁸.

Destaca el uso de los agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y los surfactantes como el cloruro de benzalconio (BAC).

b) Uso de profármacos

Los profármacos son sustancias parcialmente activas o inactivas que pasan a ser activas al cambiar estructuralmente por acción de una enzima. Las enzimas presentes en la película precorneal son capaces de metabolizar al profármaco transformándolo en la sustancia activa.

Como ejemplo de profármaco tenemos la Dipivefrina, molécula más lipofílica que el fármaco, la Epinefrina, por lo que es capaz de atravesar la córnea con mayor facilidad y, por tanto, mejorar la eficacia del tratamiento¹⁰⁹.

¹⁰⁷ Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(11):1131-5.

¹⁰⁸ Kaur IP, Smitha R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. *Drug Dev Indl Pharm.* 2002;28(4):353-69.

¹⁰⁹ Zimmerman TJ, Kooner KS, Kandarakis AS, Ziegler LP. Improving the therapeutic index of topically applied ocular drugs. *Arch Ophthalmol.* 1984;102(4):551-3.

c) Insertos oculares tópicos y/o lentes de contacto terapéuticas

Son sistemas diseñados para controlar la cesión del principio activo, incrementar el tiempo de contacto y disminuir la frecuencia de administración.

Generalmente, los insertos oculares tópicos están constituidos por vehículos poliméricos en los que se incorpora la sustancia activa que se va liberando gradualmente (Ocuser[®], NODS[®], minidiscos, etc.). En la práctica clínica se han dejado de utilizar al no tener buena aceptación por parte del paciente ya que crean la sensación de cuerpo extraño interfiriendo con la visión.

Las lentes de contacto de hidrogel de silicona, al igual que los insertos oculares tópicos, presentan un alto contenido en agua pudiendo regular la liberación de sustancias activas hidrofílicas. Su uso está recomendado en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco cuando el tratamiento de elección ha fracasado¹¹⁰ ya que, además de actuar como sistemas de liberación controlada, pueden reducir la desecación ocular y favorecer la cicatrización corneal al proteger físicamente la superficie ocular del medio externo^{111,112,113,114,115,116}.

d) Uso de agentes viscosizantes

El empleo de agentes viscosizantes, naturales o sintéticos, es uno de los recursos más frecuentemente usados para lograr aumentar el tiempo de permanencia de la formulación en la región precorneal¹¹⁷.

Destacan los polímeros mucoadhesivos o bioadhesivos, los cuales se unen por enlaces no covalentes (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas) con las mucinas de la película precorneal logrando aumentar el tiempo de retención. De este modo se incrementa el tiempo de acción del preparado sobre la superficie ocular mejorándose la eficacia terapéutica del tratamiento.

Su uso está especialmente recomendado en lágrimas artificiales ya que en la estructura polimérica formada quedan retenidas moléculas de agua lo que favorece la humectación de la superficie ocular.

¹¹⁰ No authors listed. Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of Dry Eye WorkShop. *Ocul Surf.* 2007;5(2):163-78.

¹¹¹ Jones L, May C, Nazar L, Simpson T. *In vitro* evaluation of the dehydration characteristics of silicone hydrogel and conventional hydrogel contact lens materials. *Cont Lens Anterior Eye.* 2002;25(3):147-56.

¹¹² González-Méijome JM, López-Alemay A, Almeida JB, Parafita MA, Refojo MF. Qualitative and quantitative characterization of the *in vitro* dehydration process of hydrogel contact lenses. *J Biomed Mater Res B Appl Bio-mater.* 2007;83(2):512-26.

¹¹³ Chalmers RL, Hunt C, Hickson-Curran S, Young G. Struggle with hydrogel CL wear increases with age in young adults. *Cont Lens Anterior Eye.* 2009;32(3):113-9.

¹¹⁴ Brennan NA, Coles ML, Ang JH. An evaluation of silicone-hydrogel lenses worn on a daily wear basis. *Clin Exp Optom.* 2006;89(1):18-25.

¹¹⁵ King-Smith PE, Nichols JJ, Nichols KK, Fink BA, Braun RJ. Contributions of evaporation and other mechanisms to tear film thinning and break-up. *Optom Vis Sci.* 2008;85(8):623-30.

¹¹⁶ Morgan PB, Efron N. *In vivo* dehydration of silicone hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2003;29(3):173-6.

¹¹⁷ Wegener AR, Meyer LM, Schönfeld CL. Effect of viscous agents on corneal density in dry eye disease. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015;31(8):504-8.

La capacidad mucoadhesiva del polímero depende de su capacidad de hidratación o grado de hinchazón, de su peso molecular, de los grupos funcionales presentes, de la conformación molecular o de la flexibilidad y movilidad de la cadena polimérica y de su concentración^{118,119,120}.

- *Grado de hidratación:* depende del estiramiento, enredamiento o trenzado de las macromoléculas del polímero. En función de ello, las zonas de enlace quedarán más o menos expuestas viéndose afectado el grado de interacción del polímero con las mucinas y su difusión dentro de la capa de mucus. Cuando el polímero está hidratado su capacidad de incorporarse a la capa mucoacuosa es mayor al verse favorecidas las interacciones agua-polímero sobre las interacciones polímero-polímero.
- *Peso molecular:* está relacionado con la longitud de sus cadenas, siendo de gran importancia al influir en la penetración y unión molecular de éste con la capa de mucus. Para una adecuada interacción y difusión el peso molecular del polímero ha de ser superior 100.000 Da pero, una longitud excesiva puede provocar alto grado de entrecruzamiento pudiendo modificar la conformación del polímero, disminuir la uniones polímero-mucus y/o dificultar su difusión dentro de la capa mucoacuosa.
- *Grupos funcionales:* determinan las interacciones intra e intermoleculares del polímero. En general, los polímeros con carga aniónica o catiónica presentan mejor capacidad mucoadhesiva (unión al mucus de la película lagrimal) que los no iónicos. Por otro lado, los polímeros de alto peso molecular y con diferentes grupos funcionales (carboxílico, hidroxilo, amino y sulfato) forman puentes de hidrógeno sin atravesar las membranas biológicas por lo que suelen actuar como sistemas de liberación controlada.
- *Flexibilidad y movilidad de la cadena:* para una adecuada interacción y difusión del polímero con la capa de mucus es necesario que las cadenas poliméricas sean flexibles. A mayor movilidad de las cadenas, mayor interacción y penetración del polímero dentro de la estructura del mucus. De hecho, el enrollamiento de las cadenas poliméricas debido al pH o a la osmolaridad del medio lagrimal, puede provocar un “ocultamiento” los grupos activos encargados de la interacción del polímero con el mucus.
- *Concentración:* es necesario considerar que altas concentraciones de polímero pueden provocar irritación, visión borrosa, sensación pegajosa y de parpadeo pesado.

¹¹⁸ Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1595-639.

¹¹⁹ Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1556-68.

¹²⁰ Asane GS, Nirmal SA, Rasal KB, Naik AA, Mahadik MS, Rao YM, *et al.* Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008;34(11):1246-66.

Los polímeros mucoadhesivos que más se emplean en las formulaciones oftálmicas son los derivados de celulosa, carbómeros, alcohol polivinílico, polisacáridos (hipromelosa, carmelosa y ácido hialurónico), acrilatos, povidona y quitosano. Las propiedades de algunos de ellos se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Resumen de los polímeros mucoadhesivos empleados en formulaciones oftálmicas.

Polímero mucoadhesivo	Propiedades	Ventajas	Desventajas
Éteres de celulosa (hipromelosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa = carmelosa)	Polisacáridos viscoelásticos. Aumentan la viscosidad de la lágrima. A veces se formulan en soluciones hipotónicas. Capaces de controlar la liberación del principio activo en injertos (hidroxipropilcelulosa).	Aumentan el tiempo de retención en la superficie ocular. Se mezclan bien con otros componentes empleados en la formulación oftálmica. Su viscosidad no dificulta el parpadeo.	Aportan beneficios sólo en el caso de deficiencias acuosas en la lágrima.
Carbómeros (ácido poliacrílico)	Polímeros sintéticos. Presentan alta viscosidad en reposo que disminuye con el parpadeo o movimiento ocular.	Aumentan el tiempo de retención en la superficie ocular.	Tendencia a producir visión borrosa. En algunos pacientes provocan molestias.
Alcohol polivinílico	Polímero sintético. Presentan baja viscosidad, pero óptima capacidad de humectación a la concentración del 1,4%.	Es soluble en agua por lo que no causa visión borrosa.	Corto tiempo de retención en la superficie ocular. No se mezcla bien con otros componentes de la formulación.
Ácido hialurónico	Mucopolisacárido natural. Comportamiento viscoelástico. Biodegradable, biocompatible, no tóxico y bioadhesivo.	Aumenta el tiempo de retención en la superficie ocular. Beneficioso para la cicatrización de heridas en la córnea. Alta capacidad de humectación y lubricación.	-
Povidona (polivinilpirrolidona)	Polímero sintético. Presenta alta capacidad de humectación cuando es coformulado con alcohol polivinílico.	Beneficioso para las patologías que cursan con déficit de mucinas.	Poca experiencia clínica.
Quitosano	Polímero natural catiónico. Biodegradable, biocompatible, no tóxico y bioadhesivo. Comportamiento viscoelástico.	Beneficioso para la cicatrización de heridas en la córnea.	Poca experiencia clínica.

De entre todos los polímeros descritos anteriormente destaca el ácido hialurónico, polímero natural presente en tejido conectivo, humor vítreo y cordón umbilical y frecuentemente empleado en formulaciones tópicas oftálmicas como son las lágrimas artificiales^{121,122,123,124} por ser biodegradable, biocompatible y no tóxico.

Estructuralmente, es un polisacárido formado por uniones repetidas del ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina cuyo peso molecular varía en función del número de repeticiones de dichas unidades estructurales (**Figura 4**). En solución acuosa posee estructura de doble hélice, estabilizada por la formación de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, que permite la presencia de enlaces intermoleculares y la unión consigo mismo¹²⁵.

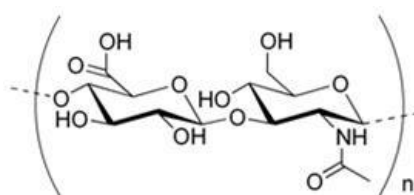


Figura 4: Estructura química del ácido hialurónico.

Por sus propiedades físicas, el ácido hialurónico se asemeja a las mucinas de la película precorneal por lo que es capaz de interactuar con ellas¹²⁶ incorporándose a la capa mucoacuosa de la película lagrimal estabilizándola y reteniendo agua en su interior. Además, también se une a las células del epitelio corneal mediante interacciones químicas y/o bioquímicas por la fibronectina y al receptor CD44^{127,128,129}.

El ácido hialurónico suele emplearse en forma de sal sódica como hialuronato sódico, el cuál es soluble en agua. En función de la concentración y el peso molecular empleados, dicho polímero puede mostrar un comportamiento no-newtoniano o pseudoplástico¹³⁰, con alta

¹²¹ Papa V, Aragona P, Russo S, Di Bella A, Russo P, Milazzo G. Comparison of hypotonic and isotonic solutions containing sodium hyaluronate on the symptomatic treatment of dry eye patients. *Ophthalmologica*. 2001;215(2):124-7.

¹²² Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M, Milazzo G. Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(2):181-4.

¹²³ Brignole F, Pisella PJ, Dupas B, Baeyens V, Baudouin Cl. Efficacy and safety of 0.18% sodium hyaluronate in patients with moderate dry eye syndrome and superficial keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005;243(6):531-8.

¹²⁴ Vogel R, Crockett RS, Oden N, Laliberte TW, Molina L. Demonstration of efficacy in the treatment of dry eye disease with 0.18% sodium hyaluronate ophthalmic solution (Vismed, Rejena). *Am J Ophthalmol*. 2010;149(4):594-601.

¹²⁵ Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruysse KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Control Release*. 1998;53(1-3):93-103.

¹²⁶ Georgiev GA, Yokoi N, Ivanova S, Dimitov T, Andreev K, Krastev R, et al. Surface chemistry study of the interactions of hyaluronic acid and benzalkonium chloride with meibomian and corneal cell lipids. *Soft Matter*. 2013;9(45):10841-56.

¹²⁷ Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol*. 1992;116(4):1055-62.

¹²⁸ Isacke CM, Yarwood H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(7):718-21.

¹²⁹ Mochizuki H, Yamada M, Hato S, Nishida T. Fluorophotometric measurement of the precorneal residence time of topically applied hyaluronic acid. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(1):108-11.

¹³⁰ Pisarcik M, Bakos D, Ceppan M. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. *Colloids Surf A* 1995;97(3):197-202.

viscosidad entre parpadeos y mayor fluidez durante el cizallamiento que se produce en éste. Su utilización permite aumentar el tiempo de permanencia de la formulación en la superficie ocular, incrementar el tiempo de ruptura de la película lagrimal y favorecer la humectación y lubricación de la superficie ocular^{131,132,133}. Además, por el hecho de aumentar el tiempo de contacto, puede facilitar la penetración de la sustancia activa a través de las membranas celulares. Así mismo, interviene en el proceso inflamatorio mostrando actividad antiinflamatoria y presenta acción antioxidante y propiedades regenerativas al promover la proliferación de las células epiteliales de la córnea y conjuntiva mejorando la cicatrización de heridas sin disminuir la producción de colágeno^{134,135,136,137,138}.

Es altamente recomendable el uso de ácido hialurónico en formulaciones tópicas oftálmicas que contienen cloruro de benzalconio como conservante ya que permite reducir la citotoxicidad de dicho componente al atraparlo en su estructura molecular¹³⁹.

e) Uso de hidrogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales capaces de retener gran cantidad de agua en su estructura cuando están en estado de hinchamiento¹⁴⁰. Gracias a ello, presentan una gran similitud con los tejidos biológicos mostrando una buena biocompatibilidad. Además, al ser estructuras blandas y elásticas, son bien tolerados en el ojo¹⁴¹.

Según su origen se clasifican en naturales, sintéticos o híbridos pudiendo estar reticulados químicamente por enlaces covalentes y/o no covalentes¹⁴². Considerando su estado físico, los hidrogeles se diferencian en dos grupos, los denominados geles “clásicos” y los sistemas de gelificación *in situ* o sistemas de transición de fase.

¹³¹ Snibson GR, Greaves JL, Soper ND, Tiffany JM, Wilson CG, Bron AJ. Ocular surface residence times of artificial tear solutions. *Cornea*. 1992;11(4):288-93.

¹³² Nakamura S, Okada S, Umeda Y, Saito F. Development of a rabbit model of tear film instability and evaluation of viscosity of artificial tear preparations. *Cornea*. 2004;23(4):390-7.

¹³³ Johnson ME, Murphy PJ, Boulton M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(1):109-12.

¹³⁴ Inoue M, Katakami C. The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(7):2313-5.

¹³⁵ Daull P, Feraille L, Elena PP, Garrigue JS. Comparison of the anti-inflammatory effects of artificial tears in a rat model of corneal scraping. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016;32(2):109-18.

¹³⁶ Park Y, Cho S, Linhardt RJ. Exploration of the action pattern of streptomyces hyaluronate lyase using high-resolution capillary electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1337(2):217-26.

¹³⁷ Jedrzejak MJ, Mello LV, de Groot BL, Li S. Mechanism of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. Structures of complexes with the substrate. *J Biol Chem*. 2002;277(31):28287-97.

¹³⁸ Kim Y, Moon CH, Kim BY, Young S. Oral Hyaluronic Acid Supplementation for the Treatment of Dry Eye Disease: A Pilot Study. *J Ophthalmol*. 2019;2019:5491626.

¹³⁹ Debbasch C, De La Salle SB, Brignole F, Rat P, Warnet JM, Baudouin C. Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(11): 3409-15.

¹⁴⁰ Peppas NA, Khare AR. Preparation, structure and diffusional behaviour of hydrogels in controlled release. *Adv Drug Deliv Rev*. 1993;11(1-2):1-35.

¹⁴¹ Mark HF (Ed). (2014). *Encyclopedia of polymer science and technology*, New Jersey, USA: Wiley Interscience.

¹⁴² Roorda WE, Boddé HE, De Boer AG, Bouwstra JA, Junginger HE. Synthetic hydrogels as drug delivery systems. *Pharm Weekbl Sci*. 1986;8(3):165-89.

Los sistemas de gelificación *in situ* se aplican en forma líquida y, al entrar en contacto con la superficie ocular, se transforman en un sólido-gel viscoelásticos logrando de este modo aumentar el tiempo de contacto del activo con la superficie ocular. El proceso de cambio de fase puede estar regulado por modificaciones en el pH, temperatura o electrolitos de las lágrimas. Al ser líquidos antes de ser instilados, presentan una administración más sencilla, precisa y reproducible que los hidrogeles “clásicos”, lo cuales, como su nombre indica, presentan desde el inicio un estado sólido-gel.

El uso de hidrogeles aumenta el tiempo de permanencia del fármaco en la superficie ocular al adherirse al mucus de la película lagrimal pudiendo lograrse hasta casi 24 horas de contacto con los sistemas de gelificación *in situ*. De este modo, se consigue reducir el régimen de dosificación a una vez al día mejorando la adherencia del paciente al tratamiento y disminuir la concentración de fármaco requerida reduciéndose el riesgo de efectos adversos.

Teóricamente, al aumentar la concentración polimérica incrementa la posibilidad de interacción de las cadenas del polímero con la capa de mucus prolongándose el tiempo de retención. Sin embargo, además de que el uso de altas concentraciones aumenta el riesgo de visión borrosa, sensación pegajosa, irritación y discomfort provocando un mayor grado de lagrimeo, existe un máximo de concentración efectiva a partir de la cual las cadenas del polímero se vuelven poco flexibles, disminuyendo su interacción con la superficie ocular¹⁴³.

A pesar de las ventajas anteriormente citadas, estos sistemas presentan ciertos inconvenientes tales como el no ser adecuados para la liberación de sustancias lipofílicas y el no ser capaces de controlar la velocidad de liberación del fármaco incorporado¹⁴⁴. Con el fin de lograr crear sistemas de liberación controlada a base de hidrogeles, se está fomentando el desarrollo de geles que incluyan complejos solubles, micelas o liposomas capaces de retener al fármaco o unir éste a la cadena polimérica a través de uniones covalentes o no covalentes.

Entre los polímeros utilizados para elaborar hidrogeles preformados o de formación *in situ* se encuentran los carbómeros, el ácido hialurónico, el ácido poliacrílico, el alcohol polivinílico, los derivados de celulosa, el quitosano, la goma gelano, el ácido algínico y los poloxámeros.

¹⁴³ Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1595-639.

¹⁴⁴ Nanjawade BK, Manvi FV, Manjappa AS. *In situ*-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. *J Control Release.* 2007;122(2):119-34.

f) Sistemas coloidales y vesiculares

Para mejorar la biodisponibilidad tópica ocular de los fármacos, se puede recurrir al empleo de nuevos sistemas farmacéuticos: liposomas, nanopartículas, dendrímeros y microemulsiones.

- Liposomas:

Son sistemas vesiculares constituidos por una o más bicapas lipídicas concéntricas y el mismo número de compartimentos acuosos. La capa lipídica, compuesta principalmente por fosfolípidos y colesterol, se forma espontáneamente en el medio acuoso debido a la naturaleza anfifílica de los fosfolípidos disponiéndose las cadenas de ácidos grasos del fosfolípido (cola) hacia el interior de la bicapa y colocándose la cabeza hidrofílica en el exterior para dar lugar a una vesícula cerrada. Para mejorar la formación de la bicapa lipídica y aumentar su tonicidad¹⁴⁵ se suelen incluir electrolitos en la solución acuosa.

Los liposomas permiten la formulación en forma de colirios de principios activos con baja absorción tanto de naturaleza hidrófila como lipofílica, distribuidos en el compartimento acuoso o en la bicapa lipídica respectivamente, mejorando su biodisponibilidad a nivel ocular¹⁴⁶. Así mismo, al estar constituidos por componentes similares a las membranas celulares, son sistemas biocompatibles y biodegradables.

Las características de las vesículas están condicionadas por el tamaño y número de capas del liposoma, lo cual depende del método de preparación empleado. Considerándose ambas variables¹⁴⁷, las vesículas lipídicas se clasifican en unilamelares pequeños (SUV) con un tamaño de entre 20 – 200 nm, unilamelares grandes (LUV) cuando su tamaño es mayor a 200 nm y multilamelares (MLV) formados por entre 5 y 25 bicapas y cuyo tamaño suele estar comprendido entre 500 nm y 1 μm (**Figura 5**). En la liberación controlada del fármaco también puede influir la carga del liposoma (positiva, neutra o negativa) la cual está en función de la composición de éste.

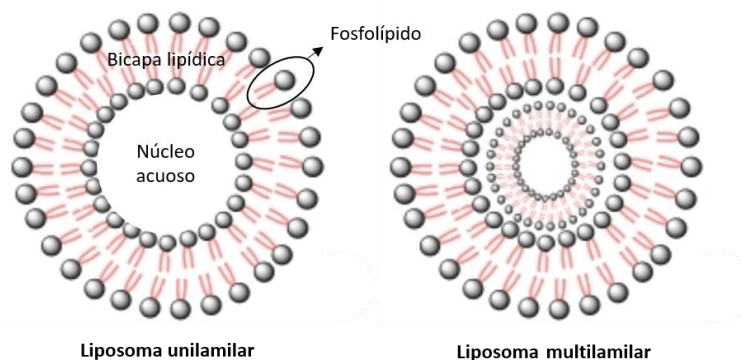


Figura 5: Representación esquemática de las estructuras y los tipos de liposomas.

¹⁴⁵ Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 1995;16(1):75-93.

¹⁴⁶ Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv.* 2011;2011:863734.

¹⁴⁷ Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv.* 2007;4(4):297-305.

Existen diferentes métodos de elaboración de las vesículas liposomales¹⁴⁸. Los dos más interesantes son el método de Bangham y el método de evaporación de fase reversa. En el primero de ellos, los fosfolípidos se disuelven en un solvente orgánico el cual es posteriormente eliminado formándose una fina película sólida de fosfolípidos que, finalmente, es dispersada en la solución acuosa consiguiéndose liposomas MLV. Tras su formación, el tamaño de estos liposomas puede reducirse a través de sonicación¹⁴⁹ y filtración (*método de Bangham "clásico"*) para dar lugar a liposomas SUV o por ciclos de congelación-descongelación en combinación con extrusión obteniéndose liposomas LUV (*método de congelación-descongelación*). En cambio, en el *método de evaporación en fase reversa* los fosfolípidos son solubilizados inicialmente en la fase orgánica y, sin evaporación de ésta, se adiciona la fase acuosa dando lugar a una emulsión. Finalmente se consigue eliminar el solvente orgánico en vacío y en presencia de nitrógeno formándose un gel semisólido en donde se encuentran las vesículas lipídicas tipo LUV.

La simplicidad de los métodos de fabricación descritos y su gran versatilidad justifica su posibilidad de uso en oftalmología. No obstante, el empleo de liposomas también tiene ciertos inconvenientes. Junto con su baja estabilidad en medio acuoso y la dificultad de ser esterilizados, presentan un reducido tiempo de contacto con la superficie ocular debido la constante renovación de la película lagrimal, siendo éste similar al de las soluciones acuosas.

Para incrementar el tiempo de retención y lograr una mayor absorción del fármaco se puede recurrir (1) al empleo de liposomas con carga positiva capaces de interactuar electrostáticamente con las cargas negativas del epitelio corneal^{150,151,152}, (2) a la dispersión de las vesículas liposomales en biopolímeros adhesivos (ácido hialurónico, quitosano o derivados de celulosa) o su recubrimiento con polímeros mucoadhesivos^{153,154,155} y (3) a la utilización de ligandos citoadhesivos o lectinas que aumentan el anclaje de los liposomas con la superficie corneal y conjuntival.

¹⁴⁸ Shishir MRI, Karim N, Gowd V, Zheng X, Chen W. Liposomal delivery of natural product: a promising approach in health research. *Trends Food Sci Technol.* 2019;85:177-200.

¹⁴⁹ Schroeder A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chem Phys Lipids.* 2009;162(1-2):1-16.

¹⁵⁰ Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 1995;16(1):75-93.

¹⁵¹ Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery: Corneal penetration and absorption. *J Control Release.* 2000;63(1-2):135-40.

¹⁵² Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv.* 2011;2011:863734.

¹⁵³ Greaves JL, Wilson CG. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 1993;11(3):349-83.

¹⁵⁴ Diebold Y, Jarrín M, Sáex V, Carvalho ELS, Orea M, Calonge M, *et al.* Ocular drug delivery by liposomes-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials.* 2007;28(8):1553-64.

¹⁵⁵ Lajavardi L, Camelo S, Agnely F, Luo W, Goldenberg B, Naud MC, *et al.* New formulations of vasoactive intestinal peptide using liposomes in hyaluronic acid gel for uveitis. *J Control Release.* 2009;139(1):22-30.

- **Nanopartículas:**

Las nanopartículas son sistemas coloidales poliméricos con un tamaño variable de entre 10 – 1.000 nm y empleados para aumentar la penetración corneal de sustancias activas.

Se pueden clasificar en nanocápsulas (sistemas reservorio constituidos por un núcleo rodeado por una capa de polímero) y nanoesferas (sistemas matriciales poliméricos en donde se encuentra dispersado el fármaco).

En el caso de usarse en formulaciones de administración tópica ocular se recurre al empleo de materiales biodegradables y transparentes para no producir molestias en los pacientes durante el momento de la aplicación¹⁵⁶. Después de su instilación, las nanopartículas deben quedar retenidas en el *cul de sac* y ser capaces de liberar la sustancia activa de forma progresiva.

- **Dendrímeros:**

Los dendrímeros son un nuevo sistema farmacéuticos con alto potencial para la administración de fármacos^{157,158,159}. Actualmente se encuentra en fase de investigación empleándose para favorecer la penetración de las sustancias activas a través de la córnea y para la transfección.

Se tratan de macromoléculas sintéticas tridimensionales cuya estructura se asemeja a la arquitectura de los árboles hiperramificados. Un dendrímero típico contiene tres elementos estructurales: (i) un núcleo central, (ii) una zona intermedia formada por unidades de ramificación y (iii) en la superficie grupos funcionales terminales^{160,161}. Las unidades ramificadas se organizan en capas llamadas “generaciones” y representan la unidad monomérica de repetición de estas macromoléculas¹⁶². Como resultado de la ramificación dendrítica, se obtienen estructuras desde semiglobulares a globulares con gran tamaño molecular (5.000 – 500.000 Da) pero bien definidas y baja polidispersión.

Al ser moléculas con una alta densidad de grupos terminales en superficie, estos compuestos se pueden funcionalizar con ligandos capaces de dirigir la molécula a un tejido deseado^{163,164,165}.

¹⁵⁶ Ding S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *Pharm Sci Technol Today*. 1998;1(8):328-35.

¹⁵⁷ Boas U, Heegaard PM. Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev*. 2004;33(1):43-63.

¹⁵⁸ Gillies ER, Fréchet JM. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today*. 2005;10(1):35-43.

¹⁵⁹ Svenson S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(3):445-62.

¹⁶⁰ Aulenta F, Hayes W, Rannard S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *Eur Polym J*. 2003;39:1741-71.

¹⁶¹ Gupta U, Agashe HB, Asthana A, Jain NK. A review on *in vitro* – *in vivo* investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers. *Nanomedicine*. 2006;2(2):66-73.

¹⁶² Bosman AW, Janssen HM, Meijer EW. About dendrimers: structure, physical properties and applications. *Chem Rev*. 1999;99(7):1665-88.

¹⁶³ Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today*. 2001;6(8):427-36.

- Microemulsiones:

Las microemulsiones son sistemas isotrópicos constituidos por una fase acuosa, otra oleosa y una combinación de surfactante y cosurfactante.

Visiblemente, son sistemas transparentes debido al pequeño tamaño de las gotículas que varía entre 10 – 150 nm¹⁶⁶.

Generalmente, las microemulsiones presentan baja tensión superficial y baja viscosidad con un comportamiento newtoniano lo que les permite mezclarse adecuadamente con las lágrimas y garantiza una buena extensibilidad sobre la superficie ocular. Su administración como colirios favorece el alto cumplimiento de los pacientes^{167,168}.

El hecho de ser sistemas termodinámicamente estables, que se preparan y se esterilizan fácilmente y que son capaces de incorporar fármacos de distinta naturaleza, les hace ser una atractiva alternativa a las formulaciones tópicas convencionales.

Por otra parte, gracias a la presencia de agentes tensioactivos que aumentan la permeabilidad de la película lagrimal, pueden ser empleados como potenciadores de la penetración del fármaco a través de la córnea.

La cantidad y el tipo de agentes tensioactivos y cotensioactivos requeridos para lograr la microemulsión es crítica y, además, para los sistemas de administración oftálmica, se debe garantizar su tolerancia ocular.

Los tensioactivos más empleados en la elaboración de microemulsiones de administración ocular son los tensioactivos no iónicos tales como los poloxámeros, polisorbatos y polietilenglicoles. En cambio, el uso de tensioactivos iónicos está restringido por ser tóxicos para la superficie ocular.

El cotensioactivo proporciona una mayor fluidez a la película interfacial y estabiliza la microemulsión. Los compuestos utilizados con mayor frecuencia son los glicoles y la lecitina¹⁶⁹.

¹⁶⁴ Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, Nigavekar SS, Majoros II, Thomas TP, *et al.* Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.* 2005;65(12):5317-24.

¹⁶⁵ Patri AK, Majoros II, Baker JR. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Curr Opin Chem Biol.* 2002;6(4):466-71.

¹⁶⁶ Kawakami K, Yoshikawa T, Moroto Y, Kanaoka E, Takahashi K, Nishihara Y, *et al.* Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. I. Prescription Design. *J. Control. Release.* 2002;81(1-2):65-74.

¹⁶⁷ Vandamme TF. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21(1):15-34.

¹⁶⁸ Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today.* 2018;13(3-4):144-51.

¹⁶⁹ López-Quintela MA, Tojo C, Blanco MC, García Rio L, Leis JR. Microemulsion dynamics and reactions in microemulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2004;9(3-4):264-78.

2.4. ENFERMEDAD DEL OJO SECO

La enfermedad de ojo seco (EOS) es uno de los motivos más frecuente de consulta médica, especialmente en atención primaria y en oftalmología, afectando a un 50% de la población mundial contabilizando los pacientes con síntomas, independientemente de la presencia o no de signos clínicos, y a hasta un 75% contabilizando los pacientes que presentan signos¹⁷⁰. Según la definición más reciente consensuada en 2017, se trata de una “enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por una pérdida de la homeostasis de la película lagrimal y acompañada por síntomas oculares, donde la inestabilidad e hiperosmolaridad de dicha película, la inflamación y el deterioro de la superficie ocular y las anomalías neurosensoriales desempeñan papeles etiológicos”¹⁷¹. El empleo del término “enfermedad multifactorial” permite reconocerla como un trastorno funcional significativo y complejo que no se puede caracterizar por un solo proceso, signo o síntoma. El término “superficie ocular” se refiere a que comprende las estructuras de la superficie ocular y los anejos, incluyendo la película lagrimal, las glándulas lagrimales y de Meibomio, la córnea, la conjuntiva y los párpados. Con el término de “homeostasis” describe un estado de equilibrio dinámico en el organismo con respecto a sus diversas funciones y a la composición química de los fluidos y tejidos.

El mecanismo central de la enfermedad de ojo seco es una pérdida de agua evaporativa que produce daños por hiperosmolaridad en los tejidos. Las investigaciones realizadas han revelado que ésto, ya sea de forma directa o por inducir inflamación, genera una pérdida tanto de células epiteliales como de células caliciformes. El consiguiente descenso de la humectabilidad de la superficie provoca una ruptura precoz de la película lagrimal y amplifica la hiperosmolaridad a través del círculo vicioso. El dolor en el ojo seco se debe a la hiperosmolaridad lagrimal, a la pérdida de lubricación, a los mediadores inflamatorios y a factores neurosensoriales, mientras que los síntomas visuales provienen de la irregularidad de la superficie lagrimal ocular.

Cualquier alteración de los componentes de la unidad funcional lagrimal, puede desestabilizar la película lagrimal y provocar daños en la superficie ocular, manifestándose como ojo seco. En ello influye las condiciones ambientales, tanto internas (fisiología del individuo) como externas (condiciones ambientales).

En el año 2007, tras el primer taller sobre la enfermedad de ojo seco de la TFOS, se clasificó dicha patología en dos grandes grupos atendiendo a criterios etiopatológicos, ojo seco por deficiencia acuosa (OSDA) y ojo seco evaporativo (OSE) (**Figura 6**)¹⁷².

¹⁷⁰ Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F *et al.* TFOS DEWS II Epidemiology report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):334-65.

¹⁷¹ Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C *et al.* TFOS DEWS II Definition and Classification report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):273-83.

¹⁷² No authors listed. 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.

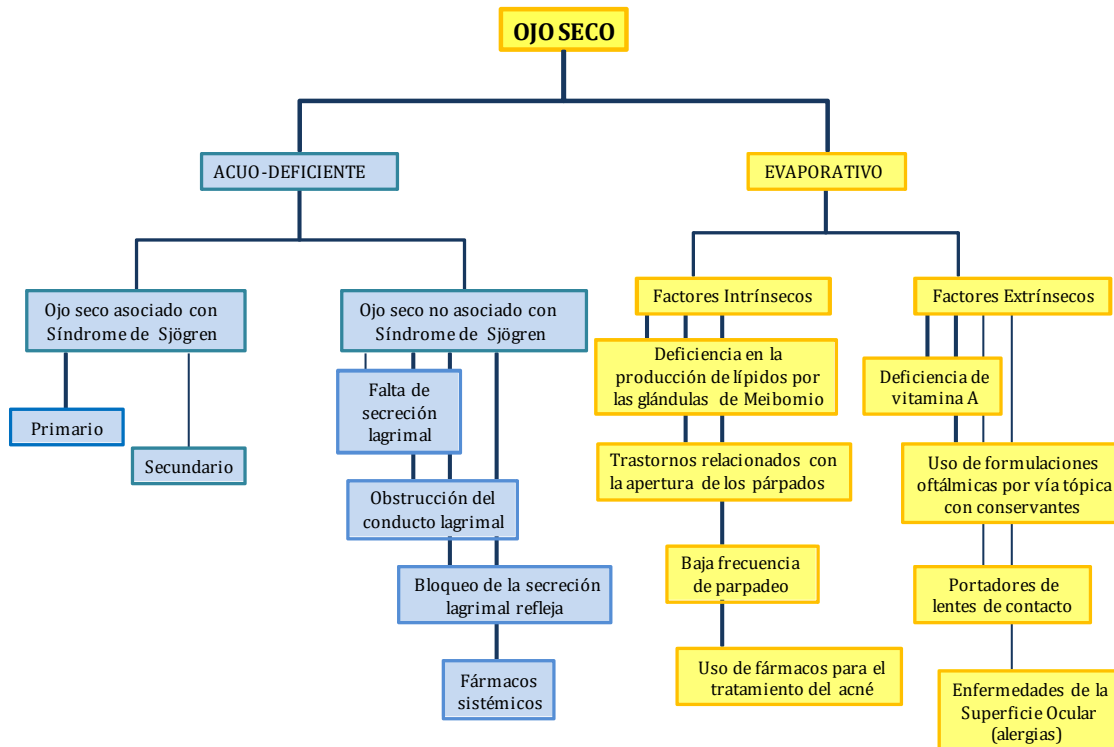


Figura 6: Clasificación de ojo seco según el informe de DEWS de 2007.

En cambio, la clasificación actual mantiene ambos grupos principales (OSDA y OSE) pero atiende a criterios fisiopatológicos, considerando como aspectos fundamentales para gestionar el tratamiento de la enfermedad los signos y síntomas clínicos observados (Figura 7).

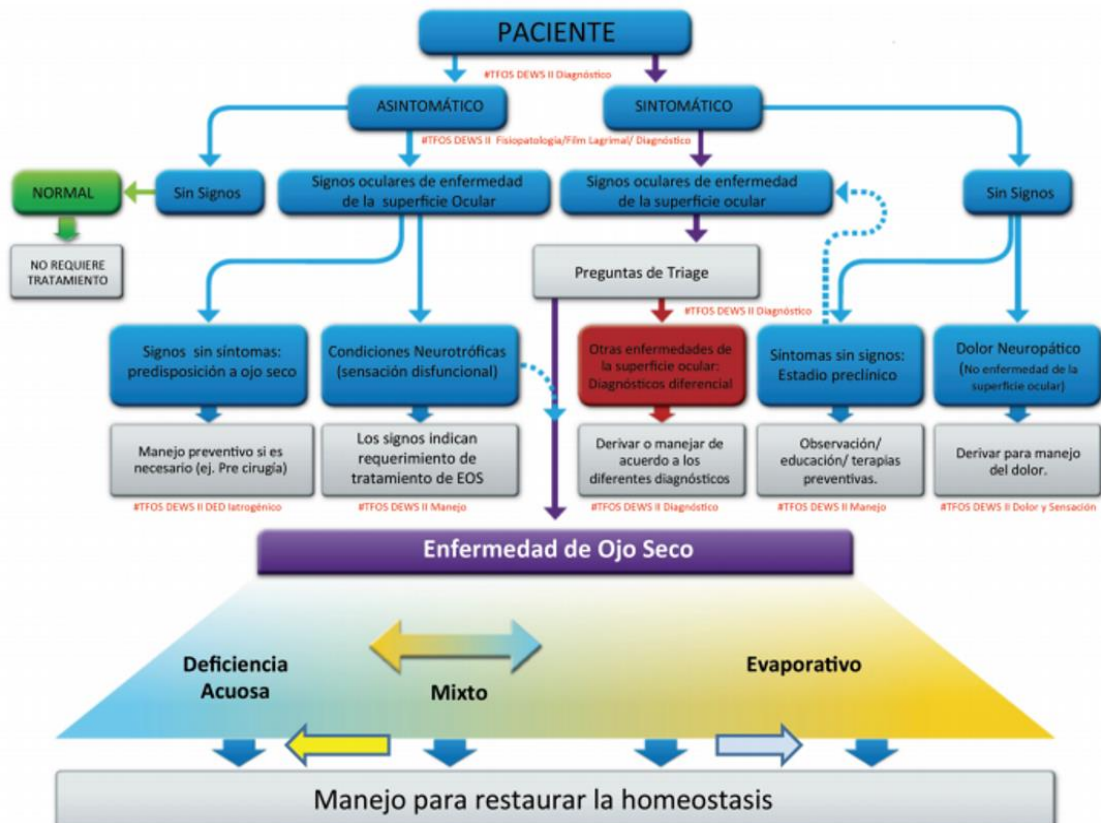


Figura 7: Clasificación de ojo seco según el informe de DEWS de 2017.

Para el diagnóstico de la enfermedad de ojo seco, TFOS DEWS II recomienda una secuencia de test diagnósticos, en el que primero se evalúa los síntomas explicados por el paciente a través de unas preguntas de triaje para después evaluar la severidad de los signos clínicos observados (**Figura 8**).

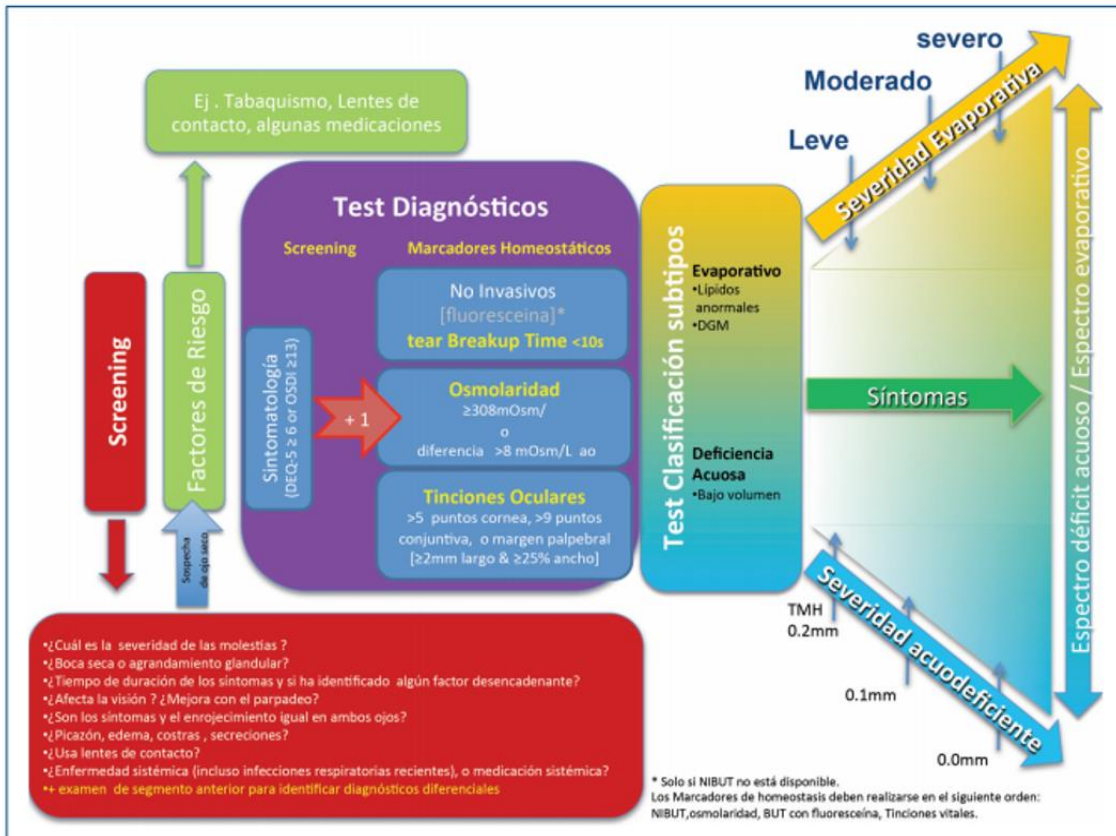


Figura 8: Enfoque de diagnóstico según TFOS DEWS II.

En cuanto a los síntomas apreciados por el paciente son difícilmente cuantificables por lo que se recurre al uso de cuestionarios que permiten estandarizarlos de forma global. Estos cuestionarios también son útiles para valorar la respuesta al tratamiento. Existen múltiples cuestionarios como por ejemplo: OSDI (Ocular Surface Disease Index) que incluye 12 preguntas relacionadas con la alteración visual; DEQ-5 (Dry Eye Questionnaire) que consta de 5 preguntas relacionadas con la distorsión visual y su fluctuación a lo largo del día; y otros como DEQS, IDEEL, etc.

Entre las pruebas de diagnóstico que estudian la inestabilidad de la película lagrimal se evalúan, como marcadores de la homeostasis, el tiempo de rotura lagrimal, la osmolaridad de la lágrima o el estudio del daño de la superficie ocular epitelio corneal entre otros.

La positividad en los cuestionarios OSDI y DEQ-5 junto con la positividad en al menos una prueba de diagnóstico clínico permite diagnosticar la enfermedad de ojo seco. En cambio, en el caso de los pacientes sintomáticos sin signos clínicos demostrables, se considera que no

pertenece al grupo de pacientes con enfermedad de ojo seco, clasificándolos como ojo seco preclínico o dolor neuropático. Y, a la inversa, los pacientes asintomáticos que presentan signos clínicos se clasifican como pacientes con sensibilidad corneal deficiente o con signos prodrómicos, los cuales corren el riesgo de desarrollar la enfermedad de ojo seco con el transcurso del tiempo o bajo condiciones ambientales adversas.

Es importante resaltar que la enfermedad de ojo seco se puede manifestar en cualquiera de estas dos clases (OSDA y OSE) siendo no excluyentes entre sí. De hecho, que la enfermedad se inicie dentro de un subgrupo principal no quiere decir que no pueda coexistir con otro o incluso llevar a eventos que causen ojo seco a través de otros mecanismos, siendo parte del círculo vicioso de interacciones existentes dentro de esta patología (**Figura 9**).

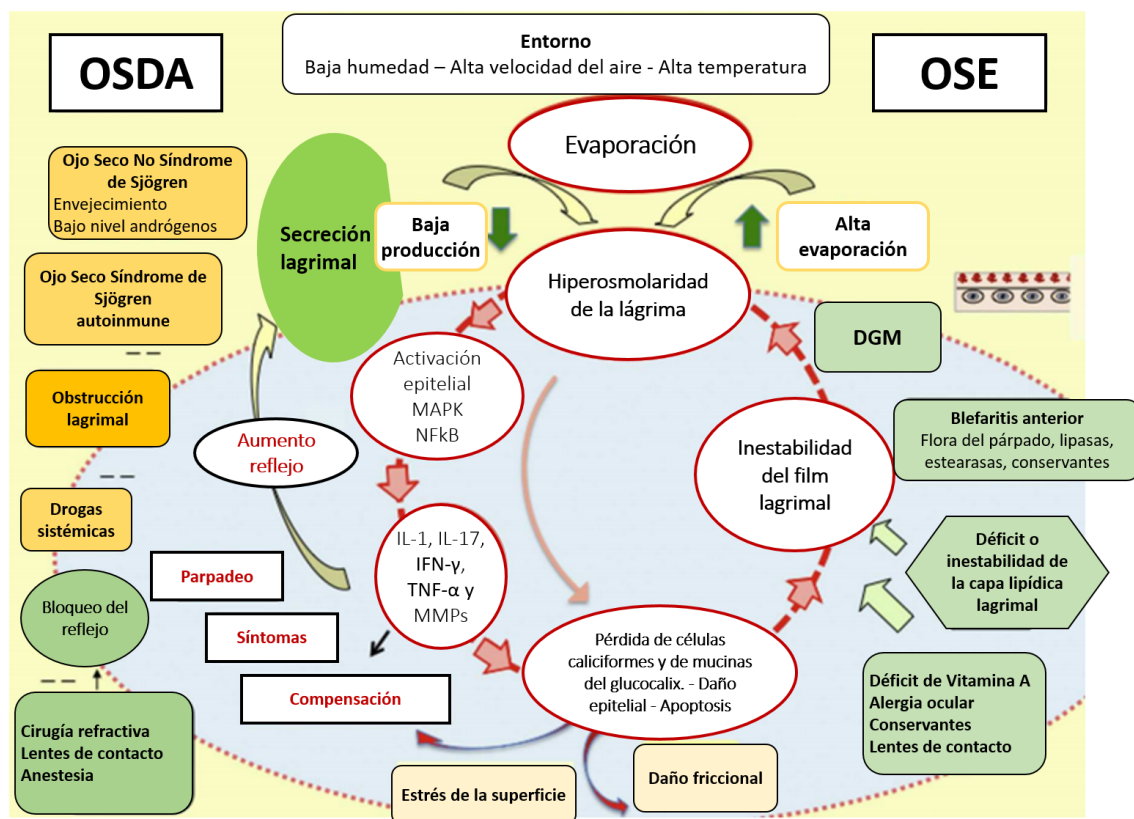


Figura 9: Mecanismos de desarrollo de ojo seco¹⁷³.

Tal y cómo se muestra en la **Figura 9**, el mecanismo esencial de la enfermedad de ojo seco es la hiperosmolaridad de la lágrima que daña la superficie ocular, tanto directa como indirectamente al iniciar una serie de acontecimientos en cadena. En los pacientes con OSDA, la hiperosmolaridad lagrimal se debe a un descenso de la secreción lagrimal en condiciones de evaporación normal del ojo. En cambio, en el OSE la hiperosmolaridad lagrimal está causada por una evaporación excesiva de la película lagrimal expuesta en presencia de una glándula lagrimal normofuncional.

¹⁷³ No authors listed. 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.

La hiperosmolaridad lagrimal provoca inflamación, diferenciación celular anormal, muerte celular programada y descamación acelerada en las células epiteliales de la superficie ocular lo que conduce a la activación precoz de las vías de señalización de estrés, MAPK y NFκB, iniciándose una cascada de acontecimientos en donde intervienen citocinas inflamatorias (IL-1), factores de necrosis tumoral (TNF-α) y proteasas (MMPs), favoreciendo la llegada de células inflamatorias (linfocitos T) a la superficie ocular, siendo una fuente adicional de mediadores inflamatorios. Esto da lugar a una disminución de la expresión de mucinas en el glucocálix, a la muerte apoptótica de las células epiteliales de la superficie y a la pérdida de células caliciformes. La alteración de la expresión de mucinas en el glucocálix es probablemente uno de los motivos por los que se produce tinción de la superficie ocular de pacientes con ojo seco (epiteliopatía puntiforme) y, dado que afecta a la humectación de la superficie ocular, conduce a una ruptura precoz de la película lagrimal. Esta ruptura exagera y amplifica la evaporación de la superficie ocular aumentando la hiperosmolaridad lagrimal y completándose de este modo el círculo vicioso.

El punto de partida de este círculo vicioso no tiene porqué ser la hiperosmolaridad lagrimal, de hecho, en trastornos como alergia ocular, xeroftalmia o déficit de vitamina A o toxicidad producida por conservantes tópicos oculares o el uso de lentes de contacto, el punto de partida de la enfermedad de ojo seco es la inestabilidad de la película lagrimal. En los casos de OSE relacionados con la disfunción de las glándulas de Meibomio (DGM), la hiperosmolaridad lagrimal proviene de una deficiencia de la capa lipídica de la película lagrimal.

En cuanto al origen de la enfermedad de ojo seco tipo OSDA puede estar relacionado con diversas causas como por ejemplo: (1) la infiltración inflamatoria de la glándula lagrimal observada en trastornos inmunológicos; (2) el bloqueo del tono sensorial hacia la glándula lagrimal lo que es esencial para mantener la homeostasis osmolar; (3) el uso de anestesia tópica bilateral, cirugía refractiva o daños en el trigémino que reducen la secreción lagrimal así como la frecuencia de parpadeo; (4) la obstrucción de los conductos lagrimales debida a enfermedades conjuntivales cicatriciales; (5) la disminución de la secreción lagrimal provocada por el envejecimiento o relacionada con el uso de diversos fármacos de uso sistémico, como por ejemplo antihistamínicos, bloqueantes β, antiespasmódicos, diuréticos y ciertos psicotrópicos que disminuyen la secreción lagrimal.

Las lesiones epiteliales y un glucocálix defectuoso, así como la pérdida de volumen de lágrima y de mucinas de las células caliciformes, conducen a un mayor daño friccional y a síntomas relacionados con la fricción. La hiperosmolaridad lagrimal y las lesiones epiteliales causadas por la patología de ojo seco estimulan las terminaciones nerviosas corneales, lo que conduce a síntomas de molestias, aumento de la frecuencia de parpadeo y, potencialmente, a un

incremento del reflejo compensatorio de secreción lagrimal. Esta secreción compensatoria es más probable en el OSE, dado que la funcionalidad lagrimal es potencialmente normal.

2.4.1. Ojo seco por deficiencia acuosa o acuodeficiente

El ojo seco acuodeficiente tiene como origen un descenso de la secreción lagrimal, no estando afectado el grado de evaporación del agua de la película lagrimal. Al reducirse la secreción lagrimal, disminuye la fase acuosa en el film lagrimal aumentando la osmolaridad en la lágrima y en las células epiteliales de la superficie ocular, iniciándose el proceso inflamatorio.

El ojo seco acuodeficiente se divide a su vez en dos grupos:

- **Ojo seco derivado del síndrome de Sjögren:** es un trastorno autoinmune que afecta en sus estadios iniciales a las glándulas lagrimales o salivares provocando ojo seco y/o boca seca (síndrome de Sjögren primario) para terminar afectando a otros tejidos y provocando enfermedades como artritis reumatoide, lupus eritematoso o linfoma de Hodgkin^{174,175} (síndrome de Sjögren secundario).
- **Ojo seco no derivado del síndrome de Sjögren:** la disminución de la fase acuosa de la lágrima se debe a una disfunción lagrimal no interviniendo ningún proceso autoinmune.

La alteración lagrimal más común se asocia con la edad; aunque también puede ser provocada por la obstrucción de los conductos de las glándulas lagrimales accesorias, hiposecreción lagrimal refleja y al uso de fármacos sistémicos (antihistamínicos, diuréticos, betabloqueantes, metildopamina, anticolinérgicos, opiáceos, inhibidores de la MAO, benzodiazepinas, fenotiazinas, antidepresivos tricíclicos, ciclobenzaprina, metocarbamol, efedrina, inhibidores de la anhidrasa carbónica)^{176,177}.

Así mismo, en determinadas patologías como por ejemplo la diabetes, se ve reducida la secreción lagrimal. Al estar alterado el metabolismo de la glucosa, aparecen alteraciones en la membrana celular del epitelio corneal y disminuye el número de células epiteliales reduciéndose su capacidad de epitelización. Por este motivo, los diabéticos tienen un mayor riesgo de sufrir lesiones corneales y queratitis microbianas, presentar una menor sensibilidad corneal y, como consecuencia, mostrar alteraciones relacionadas con la calidad y la cantidad de las lágrimas reflejas¹⁷⁸.

¹⁷⁴ Wallace DJ, (Ed). (2012). *The Sjogren's book*, New York, USA: Oxford University Press.

¹⁷⁵ Nguyen CQ, Peck AB. Unraveling the pathophysiology of Sjogren syndrome-associated dry eye disease. *Ocul Surf.* 2009;7(1):11-27.

¹⁷⁶ Moss SE, Klein R, Klein BE. Long-term incidence of dry eye in an older population. *Optom Vis Sci.* 2008;85(8):668-74.

¹⁷⁷ Mintzer J, Burns, A. Anticholinergic side-effects of drugs in elderly people. *J R Soc Med.* 2000;93(9):457-62.

¹⁷⁸ Cousen P, Cackett P, Bennett H, Swa K, Dhillon B. Tear production and corneal sensitivity in diabetes. *J Diabetes Complications.* 2007;21(5):371-3.

Igualmente, los pacientes que se han sometido a cirugías oculares refractivas o son usuarios de lentes de contacto muestran una menor sensibilidad corneal lo que puede favorecer la aparición del ojo seco al disminuir la secreción lagrimal refleja y/o verse reducida la frecuencia de parpadeo¹⁷⁹.

2.4.2. Ojo seco evaporativo

Tal y como indica su nombre, el ojo seco evaporativo se produce por una pérdida excesiva de agua de la superficie ocular habiendo una secreción lagrimal normal. Al igual que sucedía en el ojo seco acuodeficiente, la pérdida de agua genera hiperosmolaridad lagrimal provocando hiperosmolaridad en las células epiteliales de la superficie ocular iniciándose el proceso inflamatorio.

Este tipo de ojo seco puede producirse por causas intrínsecas que afectan a la estructura y a la dinámica de los párpados o por causas extrínsecas.

- **Causas intrínsecas:** son aquellas que están relacionadas con la anatomo-fisiología del individuo, como por ejemplo la capacidad de apertura de los párpados, la forma del ojo o la frecuencia de parpadeo. Una menor frecuencia de parpadeo, como sucede en la enfermedad de Parkinson¹⁸⁰, o una mayor apertura de los párpados incrementa el tiempo de exposición o el área de superficie ocular expuesta al medio externo, respectivamente.

Así mismo, se considera causa intrínseca la disfunción de la glándula de Meibomio o blefaritis posterior, siendo ésta la causa más común del ojo seco evaporativo. Las glándulas de Meibomio segregan los componentes lipídicos de la película lagrimal y evitan, entre otras cosas, la evaporación y el derramamiento de la lágrima¹⁸¹. Su obstrucción puede deberse a múltiples causas, como por ejemplo alteraciones en los niveles de hormonas sexuales (estrógenos y andrógenos). Ambas hormonas presentan receptores en las glándulas de Meibomio por lo que regulan su actividad. En concreto, los andrógenos participan en la síntesis lipídica y promueven la formación de la película lipídica¹⁸². Un descenso de los niveles de andrógenos, como sucede durante el embarazo, la lactancia y la menopausia, puede causar ojo seco^{183,184,185}.

¹⁷⁹ Heigle TJ, Pflugfelder SC. Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis. *Cornea*. 1996;15(2):135-8.

¹⁸⁰ Lawrence MS, Redmond DE, Elsworth JD, Taylor JR. The D1 receptor antagonist, SCH23390, induces signs of Parkinsonism in African green monkeys. *Life Sci* 1991;49(25):PL229-34.

¹⁸¹ Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BK, Dogru M, Tsubota K, *et al.* The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(4):1922-9.

¹⁸² Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, Kelleher RS, da Silveira LA, Toda I. Influence of gender, sex steroid hormones, and the hypothalamic-pituitary axis on the structure and function of the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol*. 1998;438:11-42.

¹⁸³ Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *JAMA*: 2001;286(17):2114-9.

¹⁸⁴ Krenzer KL, Dana MR, Ullman MD, Cermak JM, Tolls DB, Evans JE, *et al.* Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(12):4874-82.

¹⁸⁵ Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I, Dana MR. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(6):1261-5.

Otra de las causas intrínsecas es la edad, ya que el envejecimiento conlleva cambios fisiológicos que predisponen a padecer ojo seco, incluyendo menor volumen y flujo lagrimal, disminución en la estabilidad de la película lagrimal y alteraciones en la composición de los lípidos meibomianos^{186,187}.

- **Causas extrínsecas:** incluye las causas que provocan ojo seco y están relacionadas con condiciones ambientales y ocupacionales.

La localización geográfica (lugares con una humedad relativa baja o aquéllos caracterizados por tener vientos fuertes), el uso de aires acondicionados, la exposición a corrientes de aire (hornos de cocina, ventiladores) y el trabajo continuado con ordenadores favorecen que la evaporación del agua de la lágrima se realice de forma más rápida.

Así mismo se incluyen dentro de ésta clasificación, los trastornos de la superficie ocular que provocan una humectación imperfecta o ruptura temprana de la película lagrimal, como por ejemplo son la deficiencia de vitamina A (xeroftalmia), la cual es esencial para el desarrollo de la células caliciformes de la conjuntiva, la administración de fármacos por vía tópica con conservantes siendo especialmente grave en tratamientos crónicos, la aplicación de anestesia tópica, las alergias oculares^{188,189} y el uso de lentes de contacto por disminuir la cantidad de mucinas presentes en la lágrima favoreciendo la evaporación de la fase acuosa^{190,191}.

¹⁸⁶ Patel S, Farrell JC. Age-related changes in precorneal tear film stability. *Optom Vis Sci.* 1989;66(3):175-8.

¹⁸⁷ Sullivan BD, Evans JE, Dana MR, Sullivan DA. Influence of aging on the polar and neutral lipid profiles in human meibomian gland secretions. *Arch Ophthalmol.* 2006;124(9):1286-92.

¹⁸⁸ Stahl JL, Cook EB, Barney NP, Graziano FM. Pathophysiology of ocular allergy: the roles of conjunctival mast cells and epithelial cells. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2002;2(4):332-9.

¹⁸⁹ Baudouin C. Conditions bordering on allergy. *J Fr Ophtalmol.* 2007;30(3):306-13.

¹⁹⁰ Glasson MJ, Stapleton F, Keay L, Willcox MD. The effect of short term contact lens wear on the tear film and ocular surface characteristics of tolerant and intolerant wearers. *Contact Lens Anterior Eye.* 2006;29(1):41-7.

¹⁹¹ Ramamoorthy P, Nichols JJ. Mucins in contact lens wear and dry eye conditions. *Optom Vis Sci.* 2008;85(8):631-42.

2.5. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE OJO SECO

Durante el tratamiento de la enfermedad de ojo seco se pretende controlar la sequedad del ojo, aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida de los pacientes, minimizar los factores de riesgo y prevenir los daños oculares¹⁹² al reponer el equilibrio homeostático de la superficie ocular. Así mismo, se pretende evitar la recaída en el círculo vicioso de la enfermedad y la reaparición sus síntomas¹⁹³.

El tratamiento debe ir encaminado, por un lado, a tratar la etiología de la enfermedad y por otro, a corregir las consecuencias de la misma. Actualmente, la mayoría de las terapias empleadas son paliativas ya que no corrigen el proceso de la enfermedad subyacente, centrándose en reemplazar o conservar las lágrimas del paciente lo que provoca una mejoría de los signos y síntomas de la enfermedad y con ello la calidad de vida de los pacientes^{194,195}.

Gracias a los recientes avances realizados acerca del origen patológico de la enfermedad se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas. No obstante, aún no se ha conseguido un tratamiento eficaz debido a la naturaleza multifactorial de la enfermedad además de la compleja composición y el carácter dinámico de la película lagrimal.

Aparte de los procedimientos quirúrgicos que intentan preservar la lágrima existente a través de la oclusión temporal, semipermanente o permanente de los puntos lagrimales superiores e inferiores¹⁹⁶, existen otros tratamientos que incluyen (a) cambios conductuales, modificaciones ambientales y medidas de higiene; (b) la sustitución de la lágrima natural mediante saliva, lágrimas artificiales o suero autólogo; (c) la estimulación de una mayor producción lagrimal con fármacos secretagogos y; (d) el empleo de antiinflamatorios.

De todas las terapias no quirúrgicas descritas, la sustitución o estimulación de la lágrima natural se considera medida paliativa al intentar reemplazar o conservar la lágrima del paciente, no llegando a corregir la causa subyacente que provoca la enfermedad de ojo seco. En cambio, la aplicación de estrategias antiinflamatorias supone un gran avance ya que va enfocada a tratar una de las posibles causas y procesos que transcurren en dicha enfermedad: la inflamación.

Hasta ahora, la terapia a seguir venía marcada exclusivamente por la severidad de la enfermedad de ojo seco. Actualmente el tratamiento se basa en el diagnóstico previamente realizado, en donde se evalúa si el paciente muestra más síntomas y signos de ojo seco

¹⁹² Vibhute S, Kawtikwar P, Kshirsagar S, Sakarkar D. Formulation and evaluation of tear substitutes. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2010;2(1):17-20.

¹⁹³ Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, *et al.* TFOS DEWS II Management and therapy report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575-628.

¹⁹⁴ Murube J. (1996). *Avances en el manejo y tratamiento del ojo seco.* Highlights of ophthalmology. 22:12-6.

¹⁹⁵ O'Neil EC, Henderson M, Massaro-Giordano M, Bunya V. Advances in dry eye disease treatment. *Curr Opin Ophthalmol.* 2019;30(3):166-78.

¹⁹⁶ Qiu W, Liu Z, Ao M, Li X, Wang W. 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(10):2543-8.

evaporativo o acuodeficiente, además de considerarse el subtipo etiológico y la gravedad de la patología (**Figura 10**).

El plan de acción se subdivide en 4 etapas, no tratándose de un esquema secuencial rígido sino de una propuesta orientada a iniciar el tratamiento con aquellas medidas con mayor probabilidad de éxito en la mayoría de los pacientes para proseguir, en el caso de no obtener una respuesta positiva, con tratamientos más avanzados y específicos dirigidos a aspectos concretos de la fisiopatología de la enfermedad de ojo seco.

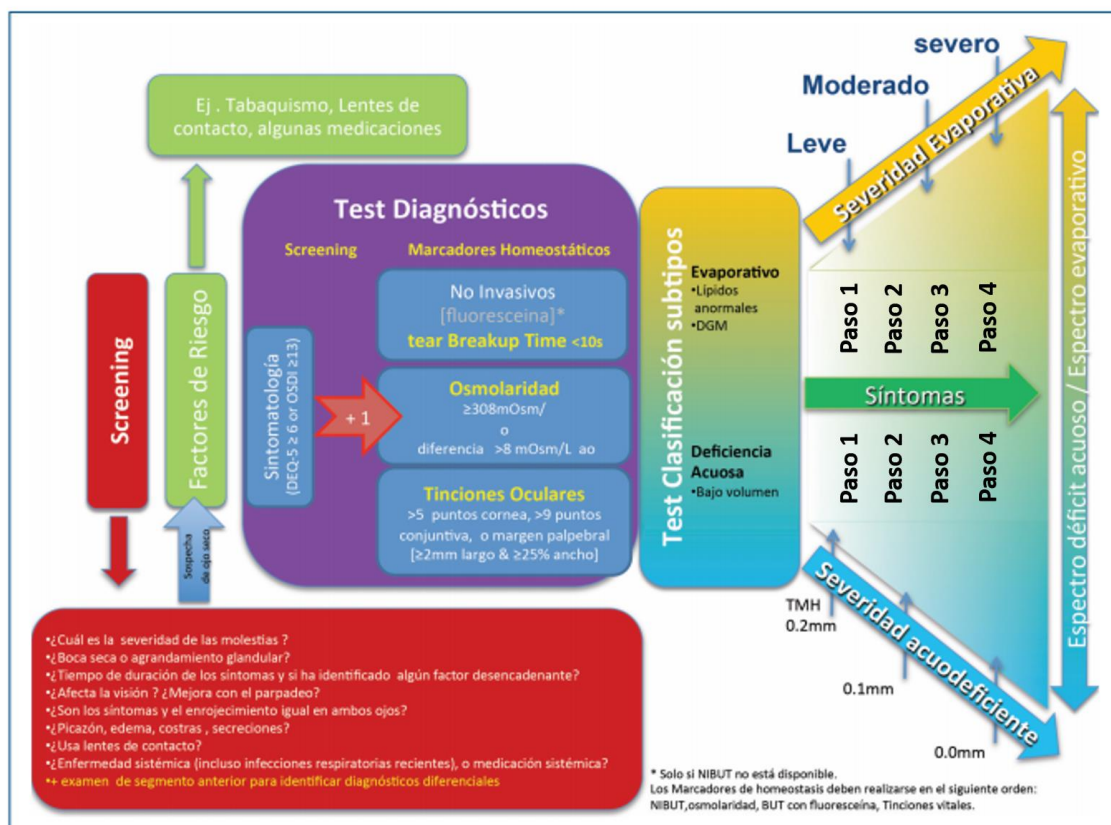


Figura 10: Diagrama de flujo a seguir en la gestión de la enfermedad de ojo seco¹⁹⁷.

Las recomendaciones generales en el tratamiento de la enfermedad dentro de cada uno de los grados o pasos indicados en la **Figura 10** son:

- **Paso 1:**

- Formación acerca de la enfermedad, su gestión, tratamiento y pronóstico.
- Modificación del entorno local.
- Formación sobre posibles modificaciones de la dieta.

¹⁹⁷ Craig JP, Nelson JD, Azar DT, Belmonte C, Bron AJ, Chauhan SK, et al. TFOS DEWS II Report executive summary. *Ocul Surf.* 2017;15(4):802-12.

- Identificación y posible modificación/eliminación de medicamentos sistémicos y tópicos perjudiciales.
- Mejora de la higiene del párpado y uso de compresas de calor.
- Uso de lubricantes oculares (con contenido lipídico en el caso de DGM).

- **Paso 2:**

Si las opciones anteriores son inadecuadas, promover:

- Conservación de las lágrimas: oclusión del conducto lagrimal, gafas con cámara de humedad, dispositivos de cámara de humedad, etc.
- Uso de lubricantes oculares sin conservantes y pomada en tratamientos nocturnos.
- Calentamiento físico en la consulta y expresión de las glándulas de Meibomio (incluidos tratamientos asistidos con dispositivo, como Lipiflow™).
- Tratamiento con luz pulsada intensa en la consulta para la DGM.
- Administración de fármacos con receta: antibióticos tópicos o combinación de antibióticos/esteroides, corticosteroides tópicos, secretagogos tópicos, fármacos inmunomoduladores no glucocorticoides tópicos, fármacos tópicos antagonistas de LFA-1, macrólidos orales o antibióticos con tetraciclina.

- **Paso 3:**

Si las opciones anteriores son inadecuadas, considerar:

- Uso de secretatogos orales.
- Administración de colirios de suero autólogos/allogénicos.
- Empleo de lentes de contacto terapéuticas: lentes blandas de vendaje o lentes esclerales rígidas.

- **Paso 4:**

Si las opciones anteriores son inadecuadas, recomendar:

- Corticosteroide tópico para mayor duración.
- Injertos de membrana amniótica.
- Oclusión quirúrgica de los conductos lagrimales.
- Otros enfoques quirúrgicos (tarsorrafía, trasplante de glándula saliva, etc.).

A grandes rasgos, lo más frecuente en los casos leves de ojo seco, en los cuales no hay signos de daño en conjuntiva o en córnea, es el empleo de lágrimas artificiales 4 veces al día. En los casos moderados, en donde se aprecian daños en zonas puntuales en conjuntiva o en córnea, se recurre al uso de lágrimas artificiales sin conservantes 12 veces por día y ungüentos lubricantes sin conservantes por la noche antes de que el paciente vaya a dormir. En cambio, para casos severos en los que ya existe queratinización en la conjuntiva o daños moderados o severos en la córnea, además de la administración de lágrimas artificiales y ungüentos lubricantes por la noche se requiere el empleo de otro tipo de terapias¹⁹⁸.

Es necesario enfatizar que el éxito del tratamiento depende en gran medida de la relación médico-paciente. El llamado tratamiento psicológico es de vital importancia en el caso de enfermedades crónicas, progresivas e incurables, no graves y que mejoran notablemente con tratamientos paliativos. Una correcta explicación de esta realidad por parte del médico al paciente facilita la comprensión, aceptación y adaptación por parte del paciente, además de mejorar su adherencia al tratamiento y, por lo tanto, el cumplimiento terapéutico.

A continuación, se comentan con mayor profundidad los tratamientos más relevantes.

2.5.1. Tratamiento ambiental

Ciertas condiciones ambientales que rodean al paciente pueden ser perjudiciales para la superficie ocular favoreciendo el desarrollo de la patología de ojo seco por lo que ayuda:

- *Evitar una exposición excesiva a radiaciones solares* ya que la radiación ultravioleta degrada la película lagrimal haciéndola más inestable¹⁹⁹. El daño causado es directamente proporcional al tiempo de exposición y a la intensidad de la radiación.
- *Evitar corrientes de aire directas sobre la superficie ocular* (aire acondicionados, ventiladores, el aire caliente de los hornos o conducir con las ventanas abiertas) ya que favorecen la evaporación de la lágrima.
- *Favorecer ambientes con una humedad relativa del 35 – 45 %* mediante el uso de humidificadores ambientales²⁰⁰ o gafas ajustadas o de cámara de humedad²⁰¹ y evitando un uso excesivo de calefacción.
- *Evitar la polución ambiental y otros irritantes* como el polvo, arena, tierra del campo y el humo del tabaco, además de prevenir agentes tóxicos o alérgenos debido a que estos factores favorecen la aparición de una película lagrimal disfuncional^{202,203}.

¹⁹⁸ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

¹⁹⁹ Murube J. (2005). *Manejo del ojo seco - Tratamiento no médico - Parte I.* Highlights of Ophthalmology. 33:2-3.

²⁰⁰ Hirayama M, Murat D, Liu Y, Kojima T, Kawakita T, Tsubota K. Efficacy of a novel moist cool air device in office workers with dry eye disease. *Acta Ophthalmol.* 2013;91(8):756-62.

²⁰¹ Yee RW, Sperling HG, Kattak A, Paukert MT, Dawson K, Garcia M, *et al.* Isolation of the ocular surface to treat dysfunctional tear syndrome associated with computer use. *Ocul Surf.* 2007;5(4):308-15.

Por todo ello, se recomienda el uso de gafas de protección con unos cristales de absorción adecuados y con una montura hermética o cerrada que se ajuste a la cara del paciente, ya que crean una especie de “microclima” que aísla al ojo de estas condiciones ambientales adversas.

2.5.2. Recomendaciones generales y medidas higiénicas

Los pacientes con ojo seco pueden poner en práctica diversas medidas encaminadas a mejorar el estado general de su superficie ocular.

- *Usar antifaz o un apósito nocturno* durante las horas de sueño ya que durante este periodo de tiempo se produce cierta sequedad ocular de origen hipotalámico. El uso de estos sistemas es especialmente recomendado en pacientes con mala oclusión nocturna (lagofthalmos)²⁰⁴.
- *Limpiar suavemente los bordes palpebrales* con una toallita, bastón de algodón prensado o disco desmaquillador impregnado en jabón neutro para eliminar los detritus celulares y lagrimales acumulados en esta zona. De este modo se consigue la descongestión de los orificios glandulares y se favorece la salida de los componentes lipídicos hacia la superficie ocular.
- *Emplear compresas calientes sobre los ojos cerrados*, ejemplo sistema LipiflowTM, lo que ayuda a fluidificar los componentes lipídicos lagrimales y facilitar su salida desde las glándulas de Meibomio hacia la superficie ocular²⁰⁵. Esta medida puede aplicarse varias veces al día y es especialmente útil en pacientes con blefaritis asociada al ojo seco.
- *Aplicar un masaje en los párpados* para aumentar la producción lagrimal por acción refleja y la liberación de los componentes acuosos, mucínicos y lipídicos desde las zonas reservorio hasta la superficie ocular. El masaje en el párpado superior se realiza con los ojos cerrados usándose los dedos índice y corazón y realizándose un movimiento en dirección horizontal, seguido de un movimiento descendente y, por último, un movimiento circular. En el caso de aplicar el masaje en los párpados inferiores puede hacerse con los ojos abiertos o cerrados, colocando los dedos en la parte inferior de los párpados inferiores y desplazándolos en dirección horizontal y

²⁰² Wakamatsu TH, Dogru M, Tsubota K. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71(6 Suppl):72-9.

²⁰³ Thomas J, Jacob GP, Abraham L, Noushad B. The effect of smoking on the ocular surface and the precorneal tear film. *Australas Med J.* 2012;5(4):221-6.

²⁰⁴ Murube J. (2005). *Manejo del ojo seco - Tratamiento no médico - Parte I.* Highlights of Ophthalmology. 33:2-3.

²⁰⁵ Finis D, Hayajneh J, König C, Borrelli M, Schrader S, Geerling G. Evaluation of an automated thermodynamic treatment (Lipiflow) system for meibomian gland dysfunction: a prospective, randomized, observed-masked trial. *Ocul Surf.* 2014;12(2):146-54.

ascendente. Es recomendable efectuar masajes varias veces al día y su efecto se ve potenciado si se realiza tras la aplicación de compresas calientes.

- *Forzar el parpadeo* a fin de facilitar la salida del sebo desde las glándulas de Meibomio al borde libre palpebral. Esta recomendación es especialmente útil en pacientes con ojo seco asociados a blefaritis o al síndrome de usuarios de pantalla de ordenador²⁰⁶.
- *Evitar posturas visuales forzadas* como por ejemplo mirar la pantalla del ordenador por debajo de la línea de posición primaria de la mirada en lugar de a zonas elevadas. Igualmente, es recomendable descansar cada cierto tiempo.
- *Usar correctamente las lentes de contacto* ya que, si no puede inducir la aparición o el empeoramiento de la enfermedad de ojo seco^{207,208,209}.

Las lentes de contacto están formadas por hidrogeles que absorben componentes presentes en el film lagrimal, especialmente proteínas, lípidos y mucinas²¹⁰. Dependiendo del material empleado así será el grado de absorción, el cual está directamente relacionado con la disminución de la capacidad visual, sequedad, discomfort y procesos inflamatorios derivados²¹¹.

En función de la carga y el contenido en agua del hidrogel, existen 4 grupos de lentes de contacto: no iónicas con bajo contenido en agua (grupo I), no iónicas con alto contenido en agua (grupo II), iónicas con bajo contenido en agua (grupo III) e iónicas con alto contenido en agua (grupo IV).

Los materiales con elevado contenido en agua son los que presentan mayor grado de absorción^{212,213}. En concreto, las lentes del grupo II son propensas a la absorción de lípidos mientras que las del grupo IV presentan mayor atracción por proteínas que por lípidos²¹⁴. Cuando las proteínas lagrimales, como la lisozima, se adhieren al material sufren cambios conformacionales y se desnaturalizan²¹⁵, lo que está directamente

²⁰⁶ Calonge M. The treatment of dry eye. *Surv Ophthalmol*. 2001;45(2):S227-39.

²⁰⁷ Nichols JJ, Ziegler C, Mitchell GL, Nichols KK. Self-reported dry eye disease across refractive modalities. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(6):1911-4.

²⁰⁸ Begley CG, Caffery B, Nichols KK, Chalmers R. Responses of contact lens wearers to a dry eye survey. *Optom Vis Sci*. 2000;77(1):40-6.

²⁰⁹ Fonn D, Situ P, Simpson T. Hydrogel lens dehydration and subjective comfort and dryness ratings in symptomatic and asymptomatic contact lens wearers. *Optom Vis Sci*. 1999;76(10):700-4.

²¹⁰ Bontempo AR, Rapp J. Protein and lipid deposition onto hydrophilic contact lenses in vivo. *CLAO J*. 2001;27(2):75-80.

²¹¹ Skotnitsky CC, Naduvilath TJ, Sweeney DF, Sankaridurg PR. Two presentations of contact lens-induced papillary conjunctivitis (CLPC) in hydrogel lens wear: Local and general. *Optom Vis Sci*. 2006;83(1):27-36.

²¹² Subbaraman LN, Glasier MA, Senchyna M, Sheardown H, Jones L. Kinetics of *in vitro* lysozyme deposition on silicone hydrogel, PMMA, and FDA groups I, II, and IV contact lens materials. *Curr Eye Res*. 2006;31(10):787-96.

²¹³ Suwala M, Glasier MA, Subbaraman LN, Jones L. Quantity and conformation of lysozyme deposited on conventional and silicone hydrogel contact lens materials using an *in vitro* model. *Eye Contact Lens*. 2007;33(3):138-43.

²¹⁴ Lorentz H, Jones L. Lipid deposition on hydrogel contact lenses: how history can help us today. *Optom Vis Sci*. 2007;84(4):286-95.

²¹⁵ Jones L, Senchyna M, Glasier MA, Schickler J, Forbes I, Louie D, et al. Lysozyme and lipid deposition on silicone hydrogel contact lens materials. *Eye Contact Lens*. 2003;29(1):S75-9.

relacionado con un incremento de procesos inflamatorios en la superficie ocular^{216,217,218}. De hecho, los usuarios de este tipo de lentes muestran un mayor grado de incidencia de la enfermedad de ojo seco asociada al uso de lentillas^{219,220}.

Debido a la deposición de estos materiales, la lente ve reducida su mojabilidad²²¹ siendo de suma importancia su correcta limpieza. Las soluciones desinfectantes más usadas son las de hidrógeno peróxido, pero si la concentración de peróxido residual en la lente es alta puede tener acción tóxica sobre la córnea y causar discomfort²²². En los últimos años, se han añadido otros componentes como tensioactivos o sustancias emolientes que mejoran la retención de agua y las propiedades humectantes de lentes de contacto.

Otro factor determinante a la hora de elegir el tipo de lentilla es su grado de deshidratación el cual viene determinado por las condiciones medioambientales, contenido de agua, capacidad de retención acuosa, espesor y periodo de uso^{223,224}. Independientemente del material, éste se deshidrata a medida que avanza el día²²⁵ y el tiempo desde iniciarse su uso siendo recomendable aumentar la frecuencia de cambio de las lentillas (caso ideal empleo de lentillas desechables diarias) y el empleo de lágrimas artificiales ya que favorece su humectación prolongando el tiempo de confort^{226,227}.

El grado de deshidratación es mayor en las lentes de contacto convencionales que en las lentillas de silicona, posiblemente por el menor requerimiento de agua de éstas últimas. Además, las lentes de silicona presentan una alta permeabilidad al oxígeno y, al proteger físicamente la superficie ocular del medio externo, reducen la desecación ocular y favorecen la cicatrización corneal^{228,229,230} siendo recomendadas en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco cuando los otros tratamientos han fracasado²³¹.

²¹⁶ Skotnitsky C, Sankaridrug PR, Sweeney DF, Holden BA. General and local contact lens induced papillary conjunctivitis (CLPC). *Clin Exp Optom*. 2002;85(3):193-7.

²¹⁷ Skotnitsky CC, Naduvilath TJ, Sweeney DF, Sankaridrug PR. Two presentations of contact lens-induced papillary conjunctivitis (CLPC) in hydrogel lens wear: Local and general. *Optom Vis Sci*. 2006;83(1):27-36.

²¹⁸ Subbaraman LN, Glasier MA, Varikooty J, Srinivasan S, Jones L. Protein deposition and clinical symptoms in daily wear of etafilcon lenses. *Optom Vis Sci*. 2012;89(10):1450-9.

²¹⁹ Ramamoorthy P, Sinnott LT, Nichols JJ. Treatment, material, care, and patient-related factors in contact lens-related dry eye. *Optom Vis Sci*. 2008;85(8):764-72.

²²⁰ Efron N, Brennan NA. A survey of wearers of low water content hydrogel contact lenses. *Clin Exp Optom*. 1988;71(3):86-90.

²²¹ Lorentz H, Rogers R, Jones L. The impact of lipid on contact angle wettability. *Optom Vis Sci*. 2007;84(10):946-53.

²²² Begley CG, Edrington TB, Chalmers R. Effect of lens care systems on corneal fluorescein staining and subjective comfort in hydrogel lens wearers. *Int Contact Lens Clin*. 1994;21(1-2):7-13.

²²³ Jones L, May C, Nazar L, Simpson T. *In vitro* evaluation of the dehydration characteristics of silicone hydrogel and conventional hydrogel contact lens materials. *Cont Lens Anterior Eye*. 2002;25(3):147-56.

²²⁴ González-Méijome JM, López-Aleman A, Almeida JB, Parafita MA, Refojo MF. Qualitative and quantitative characterization of the *in vitro* dehydration process of hydrogel contact lenses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(2):512-26.

²²⁵ Efron N, Young G. Dehydration of hydrogel contact lenses *in vitro* and *in vivo*. *Ophthalm Physiol Opt*. 1988;8(3):253-6.

²²⁶ Sindt CW, Longmuir RA. Contact lens strategies for the patient with dry eye. *Ocul Surf*. 2007;5(4):294-307.

²²⁷ Subbaraman LN, Bayer S, Glasier MA, Lorentz H, Senchyna M, Jones L. Rewetting drops containing surface active agents improve the clinical performance of silicone hydrogel contact lenses. *Optom Vis Sci*. 2006;83(3):143-51.

²²⁸ Brennan NA, Coles ML, Ang JH. An evaluation of silicone hydrogel lenses worn on a daily wear basis. *Clin Exp Optom*. 2006;89(1):18-25.

²²⁹ King-Smith PE, Nichols JJ, Nichols KK, Fink BA, Braun RJ. Contributions of evaporation and other mechanisms to tear film thinning and break-up. *Optom Vis Sci*. 2008;85(8):623-30.

2.5.3. Lágrimas artificiales

Independientemente del estadio de la enfermedad de ojo seco siempre es recomendable el administrar lubricantes oculares directamente sobre el epitelio córneo-conjuntival. Los productos de venta sin receta se denominan “lágrimas artificiales” y han de²³²:

- Ser estériles.
- No ser tóxicas.
- No inhibir la producción de los principales componentes de la lágrima natural.
- Estabilizar o restablecer la película lagrimal.
- Ser humectantes.
- Presentar un valor de viscosidad adecuado para lubricar y aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular sin interferir en la agudeza visual.

Las lágrimas artificiales son productos que intentan imitar a la lágrima natural al sustituir y/o suplementar la película lagrimal natural y favorecer la humectación de la superficie ocular además de lubricar el movimiento del parpadeo ayudando a reducir la sintomatología característica del ojo seco y mejorar la visión del paciente.

A pesar de ello, las lágrimas artificiales muestran ciertos inconvenientes al compararlos con la lágrima natural como son su administración intermitente lo que dista mucho de la producción continua basal de la lágrima natural y su incapacidad de reproducir la estructura de la película lagrimal (lípidos, agua y mucinas), la cual es vital para el funcionamiento del film lagrimal²³³. Así mismo, debido a la compleja composición de la lágrima natural (agua, sales minerales, hidratos de carbono, vitaminas, lípidos y proteínas)^{234,235}, aún no existe en el mercado ningún preparado artificial con idéntica composición, aunque cada vez es mayor el número de preparados lagrimales comerciales que incluyen en su composición componentes presentes en la lágrima natural (**Tabla 3**). Por ejemplo, existen formulaciones con vitamina A, la cual ha demostrado regular la proliferación de las células epiteliales, o preparados que incluyen compuestos capaces de mejorar las condiciones de la película precorneal desestabilizada, como es el caso de las vitaminas E y C y los polímeros hipromelosa y ácido hialurónico los cuales, gracias a su actividad oxidante, protegen a la superficie ocular de daños oxidativos originados por lesiones en la superficie ocular o la contaminación ambiental.

²³⁰ Morgan PB, Efron N. *In vivo* dehydration of silicone hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens*. 2003;29(3):173-6.

²³¹ No authors listed. Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of Dry Eye WorkShop. *Ocul Surf*. 2007;5(2):163-78.

²³² Torras J, Moreno S. Revisión: lágrimas artificiales. *Annals d'Oftalmologia*. 2006;14(2):70-84.

²³³ Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(4):369-74.

²³⁴ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol*. 2001;45(2):S227-39.

²³⁵ Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(11):1467-74.

Tabla 3: Composición de la lágrima natural humana.

	Lágrima natural
pH	7,4
Osmolaridad (DE)	298 (10)
EGF (ng/mL)	0,2 – 0,3
TGF- β (ng/mL)	2 – 10
Vitamina A (mg/mL)	0,02
Lisozima (mg/mL) (DE)	1,4 (0,2)
IgA (mg/mL) (DE)	1190 (904)
Fibronectina (mg/mL)	21

Al igual que ocurre con la lágrima natural (98,3%), el componente principal de los preparados lagrimales es el agua (97 – 99 %). Además, para poder emular las características fisicoquímicas de la lágrima natural (pH, osmolaridad, tensión superficial y viscosidad), es necesario añadir diferentes compuestos:

- *Valor de pH:* las formulaciones oftálmicas deben de presentar un valor de pH neutro o ligeramente alcalino (6,5 – 7,6)²³⁶ para que, tras su aplicación sobre la superficie ocular, se mantenga el pH de la lágrima humana en su valor natural (7,4)²³⁷ evitándose posibles molestias y asegurar el normal funcionamiento de las células de la superficie ocular.

Para ello, se añaden compuestos con acción tampón o buffer como son el bicarbonato (HCO_3^-), fosfatos (PO_4^{2-}), hidróxido sódico (NaOH), lactato sódico, ácido clorhídrico (HCl) o el ácido bórico.

- *Osmolaridad:* la osmolaridad fisiológica de la lágrima humana se encuentra en torno a 300 mOsm/L (270 – 315 mOsm/L)²³⁸ por lo que existen en el mercado una gran cantidad de productos lagrimales con valores de osmolaridad similares. Tras descubrir que la osmolaridad de la lágrima en pacientes con la enfermedad de ojo seco es ligeramente hiperosmolar, se ha incrementado el número de productos con valores hipoosmolares a fin de diluir la lagrima hiperosmolar de dichos pacientes y reestablecer la normosmolaridad fisiológica. No se recomiendan formulaciones con valores de osmolaridad inferiores a 150 mOsm/L o de soluciones hiperosmolares por dañar el epitelio conjuntival y provocan irritación y edema corneal²³⁹.

El ajuste de osmolaridad se realiza gracias al uso de electrolitos, siendo los más comunes los compuestos de sodio, potasio, calcio, magnesio y bicarbonato.

²³⁶ Vibhute S, Kawtikwar P, Kshirsagar S, Sakarkar D. Formulation and evaluation of tear substitutes. *Int J Pharm Sci Revi Res.* 2010;2(1):17-20.

²³⁷ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

²³⁸ Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul. Surf.* 2017;15:366-403

²³⁹ Torras J, Moreno S. Revisión: lágrimas artificiales. *Annals d'Oftalmologia.* 2006;14(2):70-84.

- *Tensión superficial*: gracias a la presencia de las mucinas, la tensión superficial de la lágrima natural está próxima a la tensión superficial crítica de la superficie ocular (38 mN/m) lo cual le permite extenderse fácilmente sobre ésta sin romperse. El agua, al presentar una tensión superficial mucho mayor (68 – 72 Mn/m)²⁴⁰, no logra extenderse adecuadamente sobre la superficie ocular mostrando baja humectabilidad. Para conseguir disminuir su tensión superficial, se recurre al uso de agentes surfactantes.

Como agentes surfactantes se pueden emplear lípidos, sustancias orgánicas formadas por ésteres de ácidos grasos e insolubles en agua, los cuales además de presentar propiedades lubricantes, son capaces de imitar a los componentes lipídicos polares y no polares que hay en la capa lipídica de la película lagrimal aportando moléculas interfaciales capaces de estabilizar la interfaz entre la capa lipídica y la acuomucinoso y actuando sobre la capa de mucinas.

Los lípidos más empleados pertenecen a las familias de los triglicéridos y fosfolípidos. Por ejemplo, Lipolac[®] es un preparado lagrimal que, además de incorporar carbómero como principio activo, incluye triglicéridos de cadena media como excipientes por parecerse a los componentes lipídicos presentes en la lágrima natural. Con el mismo objetivo, recientemente se ha lanzado Aquoral[®] Lipo, una formulación liposómica que incorpora un antioxidante y un polímero mucoadhesivo.

- *Viscosidad*: la viscosidad de la lágrima humana es ligeramente superior a la del agua (0,3 – 6 mPa·s)^{241,242}. Se recomienda el uso de sustituyentes lagrimales isoviscosos o ligeramente hiperviscosos (preferiblemente ≤ 12 mPa·s)²⁴³ por aumentar el tiempo de contacto del preparado con la superficie ocular simulando la producción continua basal de la lágrima natural y evitando los problemas derivados de una alta frecuencia de administración del preparado (aumento del incumplimiento terapéutico e incremento de la toxicidad asociada a la presencia de conservantes en ciertas formulaciones). En cambio, no se recomienda el uso de preparaciones con una viscosidad excesivamente alta por verse dificultada la extensión de la formulación en la superficie ocular teniendo el paciente una sensación pegajosa durante el parpadeo además de visión borrosa.

Para regular la viscosidad del preparado se recurre al uso de polímeros mucoadhesivos, sistemas gelificantes *in situ* o sistemas de fase de transición, o la incorporación de triglicéridos diseñando formulaciones semisólidas, como geles y ungüentos.

²⁴⁰ Liu L, Tiffany J, Dang Z, Dart JK, Watson SL, Daniels JT, *et al.* Nourish and nurture: development of a nutrient ocular lubricant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(6):2932-9.

²⁴¹ Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991;15(6):371-6.

²⁴² Gouveia SM, Tiffani JM. Human tear viscosity: an interactive role for proteins and lipids. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1753(2):155-63.

²⁴³ Vibhute S, Kawtikwar P, Kshirsagar S, Sakarkar D. Formulation and evaluation of tear substitutes. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2010;2(1):17-20.

Además de los diferentes componentes anteriormente citados, es frecuente la presencia de conservantes en las lágrimas artificiales comercializadas en presentaciones multidosis. Los conservantes aportan estabilidad a la formulación y aumentan la semivida del preparado al impedir o minimizar los riesgos asociados a la contaminación y el crecimiento bacteriano, micótico o ameboso en la formulación una vez abierto el recipiente. Los conservantes más empleados son los compuestos de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, cetrimida, bromamida de benzododecamonio), alcoholes (clorobutanol) y otros compuestos como clorhexidina, ácido bórico, potasio sorbato.

Al emplearse concentraciones bajas de conservante, la medicación tópica oftálmica con conservantes es segura y bien tolerada inicialmente²⁴⁴. Sin embargo, en las patologías crónicas como por ejemplo la enfermedad de ojo seco, la medicación ha de ser administrada regularmente durante largos periodos de tiempo, habiendo una continua presencia del conservante en la superficie ocular y riesgo de que se acumule en ella. Ambos hechos provocan alteraciones del film lipídico epitelial ocasionando daños celulares a nivel conjuntival y corneal acompañados de inflamación celular, siendo este daño directamente proporcional a la concentración de conservante. Una vez que el tratamiento se alarga considerablemente en el tiempo y se alcanzan concentraciones altas de conservante en la superficie ocular, el daño tras la administración de la lágrima artificial es inmediato, produciéndose irritación, discomfort y cambios en la visión pudiendo interferir en el cumplimiento terapéutico del paciente²⁴⁵. El riesgo de lesión ocular es mayor en pacientes que abusan de la medicación (más de 4 veces al día), en pacientes con terapias prolongadas o tratamientos múltiples, y en el caso de pacientes que tienen bloqueados los conductos lacrimales.

Los pacientes con ojo seco son especialmente vulnerables a los daños producidos por los conservantes ya que muestran una mayor inestabilidad del film lagrimal estando su epitelio corneal directamente expuesto. Además, mucho de estos pacientes presentan una producción lagrimal reducida lo que impide la dilución de los conservantes y dificulta su eliminación²⁴⁶. Tanto en pacientes sanos como en pacientes con daños en la superficie ocular, la eliminación de los conservantes de la superficie ocular es muy lenta, especialmente en el caso de los compuestos lipofílicos y las moléculas con estructura de amonio cuaternario, ya que se unen a los tejidos oculares inmediatamente después de la aplicación de la formulación pudiendo ser retenidos durante casi 7 días²⁴⁷. Precisamente son estos conservantes los que se usan con mayor frecuencia en las lágrimas artificiales, principalmente el cloruro de benzalconio.

²⁴⁴ Kaur IP, Lal S, Rana C, Kakkar S, Singh H. Ocular preservatives: associated risks and newer option. *Cutan Ocul Toxicol*. 2009;28(3):93-103.

²⁴⁵ Epstein SP, Ahdoon M, Marcus E, Asbell PA. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocu Pharmacol Ther*. 2009;25(2):113-9.

²⁴⁶ Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther*. 2001;18(5):205-15.

²⁴⁷ Kaur IP, Lal S, Rana C, Kakkar S, Singh H. Ocular preservatives: associated risks and newer option. *Cutan Ocul Toxicol*. 2009;28(3):93-103.

El cloruro de benzalconio, además de estabilizar al fármaco, presenta una gran eficacia contra la contaminación microbiana ya que es capaz de intercalarse en la membrana de las células emulsificando los lípidos de la pared celular y cambiando su resistencia iónica lo que provoca un aumento de su permeabilidad y la ruptura de las uniones intercelulares²⁴⁸. Al actuar sobre la permeabilidad de la membrana celular del microorganismo, se interrumpen diferentes procesos metabólicos celulares causando lisis celular y permitiendo la salida de sustancias vitales lo que provoca la muerte del microorganismo²⁴⁹. A concentraciones de 0,05 – 0,1 % induce necrosis mientras que produce apoptosis celular a concentraciones próximas a 0,001%.

Dicha capacidad detergente no sólo tiene lugar con células microbianas, sino que también ocurre con células eucarióticas por lo que el uso cloruro de benzalconio en formulaciones oculares favorece el paso del principio activo a la cámara anterior ocular. La consecuencia negativa de esta acción detergente en las células de la superficie ocular es su efecto tóxico incluso a concentraciones bajas de 0,0001 – 0,001 %²⁵⁰. Las consecuencias clínicas son una disminución del tiempo de rotura lagrimal y un aumento en la inestabilidad del film lagrimal²⁵¹.

A fin de solucionar dichos problemas de toxicidad se plantean cambios en la estructura de los conservantes ya existentes para disminuir su afinidad por la superficie ocular (caso del compuesto BDD de estructura similar al cloruro de benzalconio), diseñar nuevas moléculas con acción conservante pero menos tóxicas (conservante sofZia, Alcon[®])²⁵² o diseñar formulaciones sin conservantes en formatos monodosis o frascos multidosis con sistema ABAK[®]²⁵³.

Los envases monodosis contienen un volumen de lágrima artificial de entre 0,3 – 0,5 mL. Están pensados para una única aplicación, pero algunos de ellos permiten volver a cerrar el envase y aprovechar su contenido en una segunda vez no asegurando su esterilidad. El inconveniente de los envases monodosis es su alto coste en comparación con las presentaciones multidosis y la necesidad de que el paciente lleve consigo un número suficiente de viales.

El sistema ABAK[®] consiste en incorporar en el orificio de salida del recipiente multidosis un sistema de filtros de nylon con un tamaño de poro de 0,22 µm. Éste actúa como barrera antimicrobiana y garantiza la esterilidad del producto durante 2 meses sin la presencia de conservantes. Además, permite almacenar preparados con conservantes al retener el conservante en el filtro durante la instilación de la formulación, no llegando éste a la superficie ocular.

²⁴⁸ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

²⁴⁹ Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, Asbell PA. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocu Pharmacol Ther.* 2009;25(2):113-9.

²⁵⁰ Torras J, Moreno S. Revisión: lágrimas artificiales. *Annals d'Oftalmologia.* 2006;14(2):70-84.

²⁵¹ Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther.* 2001;18(5):205-15.

²⁵² Tu EY. Balancing antimicrobial efficacy and toxicity of currently available topical ophthalmic preservatives. *Saudi J Ophthalmol.* 2014;28(3):182-7.

²⁵³ Walsh K, Jones L. The use of preservatives in dry eye drops. *Clin Ophthalmol.* 2019;13:1409-25.

2.5.4. Suero autólogo

El suero, componente fluido que aparece al coagular la sangre, presenta una composición similar a la de la lágrima natural²⁵⁴ (**Tabla 4**), con factores de crecimiento (EGF y TGF-β), vitaminas (vitamina A), inmunoglobulina (IgG) y agentes antibacterianos (lisozima y lactoferrina) que le otorgan propiedades antimicrobianas.

Tabla 4: Comparativa entre la composición de la lágrima natural versus suero autólogo.

	Lágrima natural	Suero
pH	7,4	7,4
Osmolaridad (DE)	298 (10)	296
EGF (ng/mL)	0,2 – 0,3	0,5
TGF-β (ng/mL)	2 – 10	6 – 33
Vitamina A (mg/mL)	0,02	46
Lisozima (mg/mL) (DE)	1,4 (0,2)	6
IgA (mg/mL) (DE)	1190 (904)	2
Fibronectina (mg/mL)	21	205

La fibronectina, los factores de crecimiento y la vitamina A intervienen en procesos de proliferación, migración y diferenciación celular de los epitelios de la superficie ocular^{255,256,257}. Cuando sus niveles están disminuidos hay riesgo de sufrir alteraciones epiteliales que dificultan los procesos de cicatrización lo que compromete la integridad de la superficie ocular²⁵⁸.

Numerosos estudios realizados en diferentes modelos de cultivo celular, como por ejemplo células del epitelio corneal, muestran que la aplicación de suero permite mantener la morfología y los procesos de crecimiento y proliferación celular durante más tiempo que con el uso de preparados lagrimales^{259,260} además de aumentar la transcripción de ARN para el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el número de receptores de TGF-β. Así mismo, la aplicación de suero autólogo diluido al 20% en cloruro sódico durante 4 semanas en pacientes con ojo seco severo mejora los daños epiteliales de la superficie ocular y las pruebas clínicas de tinción con rosa de bengala, tinción con fluoresceína y determinación del tiempo de ruptura precorneal²⁶¹.

²⁵⁴ Geerling G, Maclennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(11):1467-74.

²⁵⁵ Wilson SE, Linag Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(10):2185-90.

²⁵⁶ Barton K, Nava A, Monroy DC, Pflugfelder SC. Cytokines and tear function in ocular surface disease. *Adv Exp Med Biol*. 1998;438:461-9.

²⁵⁷ Scardovi C, De Felice GP, Gazzaniga A. Epidermal growth factor in the topical treatment of traumatic corneal ulcers. *Ophthalmologica*. 1993;206(3):119-24.

²⁵⁸ Chiou AG, Florakis GJ, Kazim M. Management of conjunctival cicatrizing diseases and severe ocular surface dysfunction. *Surv Ophthalmol*. 1998;43(1):19-46.

²⁵⁹ Geerling G, Daniels JT, Dart JK, Cree IA, Khaw PT. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(5):948-56.

²⁶⁰ Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, *et al*. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(4):390-5.

²⁶¹ Kojima T, Ishida R, Dogru M, Goto E, Matsumoto Y, Kaido M, *et al*. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(2):242-6.

A pesar de los grandes beneficios anteriormente citados, su uso queda limitado a pacientes con ojo seco severo no tratable con la terapia convencional y a pacientes con defectos epiteliales persistentes secundarios (metaplasia escamosa, queratopatías neurotróficas y erosiones persistentes)²⁶² por presenta un mayor número de inconvenientes que el uso de lágrimas artificiales. En estos casos, la pauta recomendada es 1 gota de suero autólogo cada 2 o 4 horas.

Al problema práctico que supone la extracción de sangre del paciente hay que añadir la limitada estabilidad del suero autólogo, el riesgo de infección, las contraindicaciones de los donantes de sangre, el método de producción aún por estandarizar, los aspectos legales aún por definir y los altos costes en comparación con la obtención de lágrimas artificiales.

- *Estabilidad:* debido a la estabilidad comprometida de los compuestos del suero autólogo es necesario un correcto almacenamiento de éste una vez preparado (un mes a 4 °C y tres meses a -20 °C)²⁶³.
- *Riesgo de infección:* existe riesgo de inducir una infección a causa, por ejemplo, de la presencia de hepatitis o sífilis en el donante Para evitar el riesgo de transmisión viral, los pacientes que dan positivo en las pruebas de VIH, VHB, VHC y sífilis son excluidos del ensayo.

También, existe riesgo de contaminación microbiana al prolongar en exceso el uso de un mismo recipiente. Para minimizar el riesgo de contaminación, la muestra es preparada en condiciones estériles pero dicha esterilidad se pierde una vez abierto el recipiente de envase no siendo recomendable su uso a partir del tercer día desde su apertura a pesar de incluirse en él conservantes (0,5% Cloranfenicol) y máximo de una semana en el caso de ser manejado en un entorno hospitalario y por personal especializado^{264,265}. Por este motivo, es recomendable almacenar el suero autólogo en viales de dosificación de uso diario.

- *Contraindicaciones para los donantes de sangre:* quedan excluidos de la donación de sangre para la preparación de suero autólogo aquellos pacientes que presentan marcadores virales (hepatitis o sífilis), infección bacteriana activa, enfermedades cerebrovasculares o cardiovasculares graves y anemia (hemoglobina < 11 g/dL). Así mismo, hay que tener mucha precaución en el caso de pacientes que están en tratamiento con medicamentos antihipertensivos²⁶⁶.

²⁶² Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

²⁶³ Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, *et al.* Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(4):390-5.

²⁶⁴ Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and *in vitro* toxicity studies. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(11):1188-97.

²⁶⁵ Sauer R, Bluthner K, Seitz B. Sterility of non-preserved autologous serum drops for treatment of persistent corneal epithelial defects. *Ophthalmologie.* 2004;101(7):705-9.

²⁶⁶ Noble BA, Loh RS, MacLennan S, Pesudovs K, Reynolds A, Bridges LR, *et al.* Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomized controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(5):647-52.

- *Estandarización del proceso de fabricación y de administración:* por el momento no se ha estandarizado el protocolo a seguir para la producción del suero autólogo y su posterior aplicación, lo que parece ser una de las causas de la gran variedad de resultados obtenidos al valorar la eficacia de este tratamiento.

Durante el proceso de fabricación, algunos de los factores que mayor influencia tiene sobre los parámetros bioquímicos del suero son las condiciones de centrifugación empleadas (fuerza de giro y tiempo). La aplicación de una fuerza de centrifugación alta durante 15 minutos conlleva una correcta separación entre el suero y coagulación de la sangre, sin inducir su hemólisis. En cambio, el uso de una fuerza de centrifugación baja o un corto tiempo de centrifugación conlleva la presencia de restos de membrana de las plaquetas en el sobrenadante que, a altas concentraciones, indica la existencia de procesos apoptóticos²⁶⁷.

Además, existe una gran variedad en las lágrimas de suero autólogo en cuanto a la concentración y diluciones empleadas (desde el 10% al 100% siendo lo más frecuente el empleo de diluciones al 20%), en los recipientes de envase empleados (siendo lo ideal el uso de envases desechable al final del día) y en la presencia o no de conservantes.

- *Costes:* elevado coste de obtención por su elaborado proceso de obtención y la mano de obra especializada que ello requiere.

2.5.5. Fármacos secretagogos

Los fármacos secretagogos o lacrimomiméticos son capaces de aumentar los niveles de AMPc o GMPc en la glándula lagrimal incrementando la producción de lágrima. Destacan los fármacos mucolíticos (Bromhexine y Ambroxol), agentes colinérgicos (Carbachol, Bethanecol, Pilocarpina, Cevimelina) o Eledoisin.

El tratamiento con fármacos secretagogos se realiza por vía oral existiendo un alto riesgo de haber efectos secundarios. Por ello, dicho tratamiento es aconsejado sólo en casos de estadios de ojo seco severo derivados del Síndrome de Sjögren^{268,269,270}. Es necesario indicar que su aplicación en pacientes donde la enfermedad ha causado daños en la glándula parénquima lagrimal o se ha bloqueado el conducto lagrimal por presencia de heridas en la conjuntiva, podría favorecer la secreción de lágrimas proinflamatorias lo que empeoraría la enfermedad²⁷¹.

²⁶⁷ Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(11):1467-74.

²⁶⁸ Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, LeVeque FG, Salisbury PL, Tran-Johnson TK, *et al.* Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren Syndrome: a randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. P92-01 Study Group. *Arch Intern Med.* 1999;159(2):174-81.

²⁶⁹ Petrone D, Condemi JJ, Fife R, Gluck O, Cohen S, Dalgin P. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of cevimeline in Sjögren's syndrome patients with xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum.* 2002;46(3):748-54.

²⁷⁰ Kruska P, O'Brian R. Diagnosis and management of Sjögren syndrome. *Am Fam Physician.* 2009;79(6):465-70.

²⁷¹ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

2.5.6. Empleo de antiinflamatorios

Multitud de estudios relacionan la patología de ojo seco con procesos de inflamación crónica, ya sea en el origen de la enfermedad o durante su desarrollo. Por ello, cada vez es más común el empleo de agentes antiinflamatorios capaces de modular la respuesta inflamatoria.

La terapia de elección para el tratamiento de ojo seco es la administración de corticoides por vía tópica o sistémica (en función de la gravedad de la lesión ocular) sin embargo, debido a sus múltiples efectos secundarios, cada vez es más frecuente el empleo de fármacos inmunomoduladores como la Ciclosporina A, la terapia hormonal sustitutiva y el uso de ácidos grasos ω -3 y ω -6. Teniendo en cuenta que el tratamiento suele prolongarse en el tiempo, es recomendable el empleo de colirios antiinflamatorios sin conservantes.

a) Corticoesteroides de aplicación tópica

El uso de corticoesteroides a nivel tópico ocular logra una inmunosupresión local eficaz al actuar sobre diferentes fases del proceso inflamatorio tales como (1) inhibición de la fosfolipasa A2 ciclooxigenasa y lipoxigenasa evitando la liberación de sustancias dañinas tales como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, (2) disminución de la liberación de citoquinas y quimiocinas, (3) inhibición de la síntesis de las metaloproteinasas y (4) supresión de la expresión de moléculas de adhesión que inducen la apoptosis de los linfocitos²⁷².

A pesar de reducir la inflamación eficazmente, su uso queda limitado al tratamiento puntual de procesos de ojo seco severo ya que puede ocasionar graves efectos adversos²⁷³ tales como hipertensión ocular al disminuir la salida del humor acuoso, cataratas, defectos epiteliales al interferir en la cicatrización corneal²⁷⁴ e infecciones secundarias como queratitis infecciosa.

Dentro del tratamiento tópico de la inflamación ocular destacan el uso de Prednisolona, Dexametasona, Fluorometalona y Medroxiprogesterona. De todos ellos, la Prednisolona en forma de Acetato de prednisolona en suspensión al 1% es el más efectivo. En el caso de prologar el tratamiento más de 4 semanas, se recomienda el uso de corticoesteroides con menor potencia antiinflamatoria pero con efectos secundarios más leves, como es el caso del Acetato de medroxiprogesterona, o una terapia combinada con Ciclosporina A²⁷⁵.

b) Tetraciclinas sistémicas

La administración oral de tetraciclinas o sus derivados es el tratamiento de elección en pacientes con blefaritis severa, especialmente si está asociada a queratoconjuntivitis²⁷⁶.

²⁷² Kumar V, Abbas AK, Aster JC. (2007). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*, Madrid, España: S.A. Elsevier.

²⁷³ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

²⁷⁴ Benítez del Castillo JM, Durán de la Colina J, Rodríguez Ares MT, (Eds) (2004) *Superficie Ocular*, Madrid, España: Mac Line, S.L.

²⁷⁵ Nelson JD, Helms H, Fiscella R, Southwell Y, Hirsch JD. A new look at dry eye disease and its treatment. *Adv Ther.* 2000;17(2):84-93.

²⁷⁶ Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol.* 2004;137(2); 337-42.

c) Hormonas sexuales

Se sabe de la participación de las hormonas sexuales, estrógenos y andrógenos, a nivel ocular por la presencia de receptores para ambas hormonas en las glándulas de Meibomio y, solo para el caso de los andrógenos, en las glándulas lagrimales.

Los estrógenos intervienen en la actividad funcional en las glándulas de Meibomio, córnea y conjuntiva mientras que los andrógenos desempeñan un papel fundamental en la morfología, bioquímica, fisiología, inmunología, biología molecular y en la capacidad secretora de las glándulas lagrimales además de poseer un efecto trófico, antiinflamatorio y antiapoptótico sobre dichas glándulas²⁷⁷.

La producción sistémica de andrógenos está directamente relacionada con la producción glandular del flujo acuoso. Niveles bajos de andrógenos causan una regresión de la glándula lagrimal originando desde sequedad ocular secundaria hasta insuficiencia acuosa. Por otro lado, los andrógenos regulan la función de las glándulas de Meibomio aumentando la calidad y/o la cantidad de los lípidos y promoviendo la formación de la película lipídica²⁷⁸ por lo que su déficit puede causar desde sequedad ocular secundaria hasta insuficiencia lipídica de la lágrima.

Los niveles de andrógenos están disminuidos de forma natural en diferentes estadios fisiológicos -embarazo, lactancia y menopausia- o por la administración de ciertos fármacos tales como antagonistas androgénicos (terapia habitual en pacientes con cáncer de próstata) y anticonceptivos estrogénicos. Todas estas situaciones se asocian con hiposecreción de las glándulas seroacuosas y lipídicas y con una probabilidad mayor de desarrollar ojo seco^{279,280,281}.

Las mujeres son, en este sentido, más propensas a sufrir esta patología. Un estudio relativamente reciente indica que un 5,7% de las mujeres menores de 50 años y un 9,8% de las mayores de 75 años presentan síntomas de ojo seco severo²⁸².

El tratamiento sistémico con hormonas sexuales logra suprimir la inflamación y estimula la función de las glándulas lagrimales. En general, se prefiere la terapia con andrógenos ya que los resultados obtenidos con la administración sistémica de estrógenos son controvertidos. Para evitar efectos no deseados derivados de la terapia sistémica y conseguir una acción localizada, se recomienda la administración de dichos principios activos por vía tópica ocular.

²⁷⁷ Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I, Dana MR. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(6):1261-5.

²⁷⁸ Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, Kelleher RS, da Silveira LA, Toda I. Influence of gender, sex steroid hormones, and the hypothalamic-pituitary axis on the structure and function of the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol*. 1998;438:11-42.

²⁷⁹ Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *JAMA*: 2001;286(17):2114-9.

²⁸⁰ Krenzer KL, Dana MR, Ullman MD, Cermak JM, Tolls DB, Evans JE, *et al*. Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(12):4874-82.

²⁸¹ Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I, Dana MR. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(6):1261-5.

²⁸² Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol*. 2003;136(2):318-26.

d) Ciclosporina A

La Ciclosporina A es un derivado peptídico de origen fúngico²⁸³ empleado en un primer momento como antifúngico y posteriormente, como inmunomodulador en la prevención del rechazo inmunológico después de un trasplante de órgano o de tejido y en el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes como la psoriasis y la artritis reumatoide²⁸⁴.

Su actividad inmunomoduladora se debe a que actúa como inhibidor de la calcineurina, proteína encargada de iniciar el proceso de translocación nuclear de los factores de transcripción citoplasmática requeridos para la producción de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, de la IL-2, y posterior activación de las células T^{285,286}. Además, favorece la apoptosis de linfocitos e inhibe la apoptosis de células epiteliales en la conjuntiva y en la glándula lacrimal^{287,288}.

Debido a que el efecto inmunológico de la Ciclosporina A aparece al mes de iniciarse el tratamiento, es recomendable administrarla conjuntamente con corticoesteroides, al menos durante el primer mes. Desde el primero hasta el sexto mes de tratamiento se observa un aumento progresivamente del número de células globet y una disminución significativa de diferentes marcadores inflamatorios y apoptóticos en las células del epitelio conjuntival^{289,290,291}.

Su eficacia en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco fue testada inicialmente en perros con queratoconjuntivitis seca (KCS) de desarrollo espontáneo observándose que su administración tópica ocular, además de inhibir los procesos inflamatorios, lograba aumentar la producción lagrimal, revertir la neovascularización corneal, disminuir la pigmentación corneal alterada, reducir la conjuntivitis y acelerar la cicatrización de úlceras corneales crónicas^{292,293}.

En base a estos buenos resultados salió al mercado en 1996 Optimune[®], una pomada de uso oftálmico con 0,2% de Ciclosporina A indicada para el tratamiento de queratoconjuntivitis idiopática seca crónica en perros por funcionar como inmunosupresor con propiedades

²⁸³ Borel JF. Pharmacology of cyclosporine (sandimmune). IV. Pharmacological properties in vivo. *Pharmacol Rev.* 1990;41(3):259-371.

²⁸⁴ Nelson JD, Helms H, Fiscella R, Southwell Y, Hirsch JD. A new look at dry eye disease and its treatment. *Adv Ther.* 2000;17(2):84-93.

²⁸⁵ Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(3):321-38.

²⁸⁶ Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):119-25.

²⁸⁷ Gao J, Schwalb TA, Addeo JV, Ghosn CR, Stern ME. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporine A therapy. *Cornea.* 1998;17(6):654-63.

²⁸⁸ Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 2002;84(2-3):153-66.

²⁸⁹ Brignole F, Pisella PJ, De Saint Jean M, Goldschild M, Goguel A, Baudouin C. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6 months treatment with topical cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):90-5.

²⁹⁰ Turner K, Pflugfelder SC, Ji Z, Feuer WJ, Stern M, Reis BL. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea.* 2000;19(4):492-6.

²⁹¹ Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, Smith JA, Gipson IK. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol.* 2000;118(11):1489-96.

²⁹² Morgan RV, Abrams KL. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199(8):1043-6.

²⁹³ Olivero DK, Davidson MG, English RV, Nasisse MP, Jamieson VE, Gerig TM. Clinical evaluation of 1% cyclosporine for topical treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199(8):1039-42.

lacrimomiméticas y antiinflamatorias²⁹⁴. Posteriormente, la eficacia de la Ciclosporina A fue evaluada en otros modelos animales (conejos, gatos y caballos) y en humanos, tanto en individuos inmunodeprimidos como en individuos sanos, mostrando igualmente resultados positivos^{295,296}.

Diferentes emulsiones con Ciclosporina A al 0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,4% fueron testadas en pacientes con ojo seco severo-moderado, en los que no hay grandes daños en la glándula lagrimal. Todas ellas demostraron ser seguras, bien toleradas, incluso en tratamientos prolongados²⁹⁷, y eficaces al reducir significativamente los eventos inflamatorios presentes en conjuntiva y glándula lagrimal, mejorando así los síntomas y signos típicos de dicha patología. De las formulaciones ensayadas, la dosis de 0,1% de Ciclosporina A fue la que presentó mayor eficacia frente a los signos de la enfermedad mientras que la fórmula con 0,05% aportó una mayor mejoría de los síntomas del paciente^{298,299}. En el año 2003, fue aprobada la comercialización del Restasis®, una formulación de administración tópica oftálmica con 0,05% de Ciclosporina A dirigida al tratamiento de la inflamación asociada a ojo seco crónico.

Los efectos adversos derivados de la administración tópica ocular de formulaciones con Ciclosporina A son poco frecuentes, leves (picor, rojez ocular, escozor, sensación de quemazón) y transitorios. En su mayoría están en relación con el tipo de vehículo empleado ya que, al tener la Ciclosporina A un marcado carácter lipófilo, se recurre al uso de aceites o emulsiones para poder favorecer su absorción a través de la córnea. Actualmente, para evitar dichos efectos secundarios y favorecer aún más su absorción y biodisponibilidad, se recurre al empleo de liposomas, nanopartículas y microemulsiones como sistemas de vehiculización. A su vez, estos preparados pueden estar dispersos en soluciones poliméricas con propiedades mucoadherentes lo que incrementa el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular y, consecuentemente, la absorción, biodisponibilidad y eficacia de la Ciclosporina A^{300,301}.

²⁹⁴ <http://www.msd-salud-animal.mx/productos/rojo/perros/optimmune>

²⁹⁵ Williams DL. A comparative approach to topical cyclosporine therapy. *Eye*. 1997;11(4):453-64.

²⁹⁶ Toshida H, Nakayasu K, Kanai A. Effect of cyclosporine a eyedrops on tear secretion in rabbit. *Jpn J Ophthalmol*. 1998;42(3):168-73.

²⁹⁷ Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol*. 2004;137(2):337-42.

²⁹⁸ Stevenson D, Tauber J, Reis BL. Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group. *Ophthalmology*. 2000;107(5):967-74.

²⁹⁹ 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(4):631-9.

³⁰⁰ Pleyer U, Elkins B, Rückert D, Lutz S, Grammer J, Chou J, *et al*. Ocular absorption of cyclosporine A from liposomes incorporated into collagen shields. *Curr Eye Res*. 1994;13(3):177-81.

³⁰¹ Milani JK, Pleyer U, Dukes A, Chou HJ, Lutz S, Rückert D, *et al*. Prolongation of corneal allograft survival with liposome-encapsulated cyclosporine in the rat eye. *Ophthalmology*. 1993;100(6):890-6.

e) Vitamina A tópica

Por el nombre de vitamina A se engloban diversas sustancias de estructura muy similar (retinol, retinal y ácido retinoico) que poseen actividad semejante. Se incorpora al organismo a través de la dieta cómo retinol o cómo provitamina caroteno. Ambas formas se absorben a nivel intestinal y, en las células de la mucosa intestinal, los carotenos se convierten en retinol. El retinol es esterificado con ácido palmítico obteniéndose palmitato de retinol, el cual viaja por el sistema linfático hasta el hígado en donde es almacenado. Cuando se requiere vitamina A, el palmitato de retinol es hidrolizado obteniéndose retinol, que viaja a través de la sangre unido a la proteína RBP (retinol-binding protein) hasta llegar a los tejidos en donde es requerido³⁰².

A nivel ocular, la vitamina A es transportada a la glándula lacrimal, la cual secreta la mayor parte del retinol recibido al fluido lagrimal (0,07 IU/mL)³⁰³. Por lo tanto, daños en la glándula lacrimal pueden ocasionar niveles bajos de retinol en la superficie ocular.

Además de actuar como precursor de los pigmentos fotosensibles (conos y bastones) en la retina, la vitamina A interviene en la síntesis de ARN y glicoproteínas en las células del epitelio conjuntival por lo que participa en la proliferación y diferenciación de las células epiteliales siendo imprescindible para un correcto estado de la mucosa conjuntival y del estroma corneal³⁰⁴. Su déficit puede dar lugar a ceguera nocturna y alteraciones conjuntivales y corneales. Las manifestaciones conjuntivales más frecuentes son xerosis conjuntival (sequedad persistente en conjuntiva) y manchas de Bitot por queratinización de células conjuntivales observándose un descenso en el número de células goblet, disminución de la secreción mucosa de dichas células y metaplasia escamosa de las células del epitelio conjuntival, principalmente de las zonas temporal, interparpebral y bulbar. A nivel corneal, su carencia provoca inestabilidad en la película lagrimal precorneal desencadenando xerosis y queratitis corneal. En el caso de no tratarse dicho déficit, se pueden producir alteraciones en el epitelio que den lugar a edemas del estroma, queratinización de las fisuras interparpebrales, úlceras, infecciones bacterianas secundarias y queratomalacias, y ésto provocar ceguera parcial o completa.

La aplicación tópica de derivados de vitamina A ha demostrado ser eficaz en pacientes con estadios de ojo seco muy severo, en donde se observa una mejora significativa de la metaplasia escamosa y la queratinización de la superficie ocular^{305,306}. Sin embargo, en pacientes con ojo

³⁰² Toshida H, Odaka A, Koike D, Murakami A. Effect of retinol palmitate eye drops on experimental keratoconjunctival epithelial damage induced by n-heptanol in rabbit. *Curr Eye Res.* 2008;33(1):13-8.

³⁰³ Kobayashi TK, Tsubota K, Takamura E, Sawa M, Ohashi Y, Usui M. Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: a cytological evaluation. *Ophthalmologica.* 1997; 211(6):358-61.

³⁰⁴ Smith J, Steinemann TL. Vitamin A deficiency and the eye. *Int Ophthalmol Clin.* 2000;40(4):83-91.

³⁰⁵ Toshida H, Odaka A, Koike D, Murakami A. Effect of retinol palmitate eye drops on experimental keratoconjunctival epithelial damage induced by n-heptanol in rabbit. *Curr Eye Res.* 2008;33(1):13-8.

³⁰⁶ Kim EC, Choi JS, Joo CK. A comparison of vitamin a and cyclosporine a 0.05% eye drops for treatment of dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(2):206-13.

seco moderado no se aprecian resultados significativamente positivos, posiblemente debido a que en dichos estadios de la enfermedad no se observan tales cambios en la superficie ocular.

f) Ácidos grasos omega-3 y omega-6

Los ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6 (ω -3 y ω -6, respectivamente) intervienen en las reacciones inflamatorias del organismo. El incremento sistémico de ω -3 promueve el aumento de prostaglandinas antiinflamatorias (PGE₁ y PGE₃) mientras que niveles elevados de ω -6 conllevan el incremento de prostaglandinas proinflamatorias (PGE₂).

La relación ideal entre ambos ácidos grasos esenciales es de 1:4 (ω -3: ω -6), observándose que su descompensación desencadena la activación de reacciones inflamatorias y enfermedades asociadas tales como la artritis reumatoide y la enfermedad de ojo seco³⁰⁷. Por ello, uno de los tratamientos de estas patologías es el ajuste de los niveles sistémicos de ω -3: ω -6³⁰⁸.

Los ácidos grasos esenciales son incorporados al organismo a través de la ingesta de alimentos ya que el cuerpo humano no es capaz de sintetizarlos. En los últimos años, se ha disparado el consumo de productos ricos en ω -6, especialmente en los países desarrollados, lo que provoca una descompensación del ratio ideal ω -3: ω -6 llegando a ser de hasta 1:25³⁰⁹.

La administración de suplementos dietéticos de ácidos grasos ω -3 ha tenido resultados positivos en pacientes con la patología de ojo seco^{310,311} ya que disminuye la inflamación asociada al (1) inhibir la transformación del ácido linoleico (un ácido graso ω -6) en ácido araquidónico, (2) regular la apoptosis de las células de las glándulas lagrimales inhibiendo la síntesis del TNF- α , (3) favorecer la síntesis de los lípidos por las glándulas de Meibomio además de (4) aumentar la secreción lagrimal³¹².

Otra forma de aportar ácidos grasos ω -3 para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco es la administración tópica ocular de preparados con ácido α -linolénico (ácido graso ω -3). Su administración en animales con ojo seco ha logrado mejorar la inflamación y signos asociados propios de dicha patología^{313,314}.

³⁰⁷ 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. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(4):887-93.

³⁰⁸ Aragona P, Bucolo C, Spinella R, Giuffrida S, Ferreri G. Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and PGE1 tear content in Sjögren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(12):4474-9.

³⁰⁹ Roncone M, Bartlett H, Eperjesi F. Essential fatty acids for dry eye: a review. *Cont Lens Anterior Eye.* 2010;33(2):49-54.

³¹⁰ 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. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(4):887-93.

³¹¹ Barabino S, Rolando M, Camicione P, Ravera G, Zanardi S, Giuffrida S, et al. Systemic linoleic and gamma-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea.* 2003;22(2):97-101.

³¹² Roncone M, Bartlett H, Eperjesi F. Essential fatty acids for dry eye: a review. *Cont Lens Anterior Eye.* 2010;33(2):49-54.

³¹³ Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, Barabino S, Schaumberg DA, Dana MR. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Arch Ophthalmol.* 2008;126(2):219-25.

³¹⁴ Li Z, Choi J-H, Oh H-J, Park S-H, Lee J-B, Yoon KC. Effects of eye drops containing a mixture of omega-3 essential fatty acids and hyaluronic acid on the ocular surface in desiccating stress-induced Murine dry eye. *Curr Eye Res.* 2014;39(9):871-8.

3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Tal y como se ha comentado, la enfermedad de ojo seco, independientemente de su origen, cursa con alteraciones en la película lagrimal y en la superficie ocular dando lugar a malestar, trastornos visuales, inestabilidad de la película lagrimal y daño potencial de la superficie ocular.

Actualmente, no existe ningún tratamiento curativo de la enfermedad estando enfocado a minimizar los factores de riesgo, controlar la sequedad ocular, aliviar los síntomas y signos clínicos que se manifiestan y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

La utilización de sustitutos artificiales de la lágrima natural se considera un pilar en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco, al emplearse en cualquiera de sus estadios. Cómo su nombre indica, dichos preparados intentan sustituir y/o suplementar la película lagrimal natural. Para lograrlo, las lágrimas artificiales contienen diversos componentes que actúan sobre una o varias de las capas de la película precorneal.

A pesar de estar comercializados una gran variedad de preparados lagrimales, ninguno de ellos logra asemejarse totalmente a la lágrima natural debido a su compleja composición, estructura de bicapa (lipídica y acuomucinoso) y producción continua basal.

El objetivo de este trabajo es el diseño y la evaluación de nuevas formulaciones tópicas oculares orientadas a mejorar sustancialmente los síntomas y signos asociados a la enfermedad de ojo seco.

Dada la importancia de la película lagrimal y su alta inestabilidad en pacientes con enfermedad de ojo seco, se ha desarrollado una formulación hipoosmolar orientada a la reposición de dicha película. Para ello, se incluyen en una misma formulación lípidos en forma de vesículas liposomales junto con polímeros bioadhesivos, con estructura análoga a las mucinas. De este modo, se logra reponer la capa lipídica de la película precorneal y dar estabilidad a la capa acuomucinoso disminuyendo la evaporación superficial de agua. Además, gracias a la presencia de los polímeros, se incrementa el tiempo de permanencia de la formulación sobre la superficie ocular.

Así mismo y con el fin de lograr una mejora sustancial con respecto a los productos actualmente comercializados, se ha desarrollado una nueva formulación liposomal hipoosmolar que incluye agentes con actividad regenerativa, antioxidante y osmoprotectora (vitamina A, vitamina C y trehalosa, respectivamente).

Ambas vitaminas están presentes en la lágrima natural. La vitamina A interviene en la proliferación y diferenciación del epitelio corneal, habiéndose demostrado su capacidad de revertir los procesos de metaplasia escamosa y queratinización de la córnea. Por su parte la vitamina C, además de poseer propiedades antioxidantes, participa en la producción lagrimal.

Para testar la eficacia de las formulaciones elaboradas se ha desarrollado un modelo animal de ojo seco y poniéndose a punto un protocolo mediante el cual se gradúa y evalúa objetivamente los signos clínicos de la enfermedad.

Por último, teniendo en cuenta la importancia de los procesos inflamatorios en la enfermedad de ojo seco, se ha desarrollado una nueva formulación que incorpora Ciclosporina A como agente inmunomodulador con propiedades antiinflamatorias.

El planteamiento de esta memoria experimental es el siguiente:

1. Desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de los diferentes componentes utilizados en las lágrimas artificiales desarrolladas.
2. Diseño, desarrollo y caracterización de una formulación hipoosmolar con componentes lipídicos (nanosistemas liposomales) y un polímero mucoadhesivo con características similares a la película precorneal.
3. Diseño, desarrollo y caracterización de una lágrima artificial (nanosistemas liposomales) para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco que incluya agentes con actividad regenerativa, antioxidante y osmoprotectora (vitamina A, vitamina C y trehalosa, respectivamente).
4. Diseño, desarrollo y caracterización de una nueva formulación liposomal hipoosmolar con Ciclosporina A como agente inmunomodulador.
5. Desarrollo y caracterización de un modelo animal de ojo seco en el cuál evaluar la eficacia de las nuevas formulaciones desarrolladas.
6. Puesta a punto de un procedimiento para la evaluación objetiva de los signos clínicos producidos durante el desarrollo del modelo animal de ojo seco y la reversión de la enfermedad a lo largo del tratamiento de dicha patología con los diferentes preparados elaborados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES

El componente principal de las formulaciones liposomales ha sido la fosfatidilcolina de soja comercializada como Phospholipon 90G[®]. El Phospholipon 90G[®] es una forma purificada de la lecitina de soja cuyo contenido en fosfatidilcolina se encuentra entre el 94% y el 102% (Phospholipid GmbH, Colonia, Alemania).

El colesterol, la vitamina E, el acetato de retinol, el ascorbato sódico, el palmitoil-L-ascórbico, la sal trisódica del ácido 2-fosfo-L-ascórbico, el ácido bórico y el tetraborato de sodio decahidratado fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, España).

La Ciclosporina A fue distribuida por Fagron Iberica S.A.U (Barcelona, España) y la trehalosa por Cymit Química S.L. (Barcelona, España). El cloroformo fue adquirido en Panreac Química S.A. (Madrid, España).

El polímero hialuronato sódico utilizado presenta un peso molecular comprendido entre 400.000 – 800.000 Da siendo adecuado para uso oftálmico (Abaran Materias Primas S.L., Barcelona, España).

Además, se ha usado agua purificada Milli-Q obtenida en el equipo Milli-Q[®] gradient A10.

4.2. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE ACTIVOS

4.2.1. Cuantificación de la vitamina E por HPLC

Para la determinación de la vitamina E o α -tocoferol se ha utilizado un método de cromatografía líquida de alta resolución (en inglés High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) que ha sido puesto a punto basándonos en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación.

a) **Equipo y condiciones analíticas**

El método analítico se ha llevado a cabo en un equipo que consta de los siguientes módulos:

- *Bomba*: Waters 510E
- *Inyector automático*: Waters 717 plus
- *Detector*: Waters 490E
- *Ordenador interfase y programa de integración de datos*: Empower TM

Las condiciones del análisis cromatográfico han sido las siguientes:

- *Fase estacionaria:* cartucho Mediterranean Sea[®] C18, 15 x 4 cm (Teknokroma S.A., Barcelona, España).
- *Precartucho:* Guardcartridge Sea 18, 10 x 4 mm (Teknokroma S.A., Barcelona, España).
- *Fase móvil:* metanol y agua purificada Milli-Q en una proporción 95:5, respectivamente. La fase móvil se filtra previamente por membranas de policarbonato con un diámetro de poro de 0,45 µm en un equipo de filtración con bomba de vacío. El metanol empleado es reactivo calidad HPLC (Panreac Química S.A., Madrid, España).
- *Fase lavado:* agua purificada Milli-Q al 100%. La fase de lavado se filtra previamente por membranas de policarbonato con un diámetro de poro de 0,45 µm en un equipo de filtración con bomba de vacío.
- *Longitud de onda (λ):* 292 nm
- *Flujo:* 1 mL/min
- *Volumen de inyección:* 20 µL
- *Tiempo de retención:* aproximadamente 20 minutos
- *Temperatura de trabajo de la columna:* 40 °C
- *Temperatura de trabajo del inyector:* 20 °C
- *Sensibilidad del detector:* 0,05 AUFS

b) Validación del método

Este método se ha desarrollado para determinar vitamina E en formulaciones liposomales y se ha validado de acuerdo con los criterios de linealidad, exactitud y precisión. Cada muestra se inyecta por duplicado, exigiéndose que el coeficiente de variación (CV) entre los resultados de las inyecciones sea menor del 3%.

En el ensayo de linealidad se han analizado seis muestras de diferentes concentraciones en 3 días distintos. Cada día de análisis se han preparado muestras de 2,5; 5; 10; 20; 30 y 40 µg/mL de concentración. Por otro lado, para estudiar la exactitud y la precisión del método (repetibilidad y precisión intermedia), se ha trabajado a dos niveles de concentración, 5 y 30 µg/mL. Para cada uno de los niveles, se han utilizado 6 muestras independientes y el estudio se ha repetido en 3 días diferentes. Se ha validado el método utilizando para cada serie dos soluciones de referencia de distinta concentración (5 y 30 µg/mL) que se van a analizar tanto al principio como al final de la serie.

c) Tratamiento de las muestras liposomales en vehículo acuoso

Las muestras ensayadas corresponden a dispersiones acuosas de liposomas que contienen vitamina E sin la presencia del polímero hialuronato sódico.

- Preparación de muestras de referencia:

Cada día de ensayo se preparan las soluciones madre de vitamina E en una mezcla de diclorometano y etanol en proporción 1:4, que incorporan una cantidad aproximada de 22 mg de vitamina E. Con el fin de ajustar la concentración de vitamina E se ha realizado la dilución conveniente con la mezcla de solventes descrita, obteniéndose una solución intermedia de 100 µg/mL de concentración de vitamina E.

Las muestras de referencia finales con las concentraciones de vitamina E anteriormente descritas (2,5; 5; 10; 20; 30 y 40 µg/mL) se obtienen por dilución de las soluciones intermedias con los siguientes solventes: agua purificada Milli-Q, diclorometano y etanol, siendo la proporción de estos disolventes en la muestra final de 1:4:16 respectivamente.

Una vez preparadas las muestras se centrifugan a una velocidad de 15.000 rpm y temperatura de 4 °C durante 15 minutos. Después del proceso de centrifugación no se ha apreciado ningún precipitado ni separación entre los diferentes disolventes empleados. Finalmente, las muestras se inyectan y se analizan por HPLC.

- Preparación de muestras a partir de dispersiones acuosas liposomales con vitamina E

Para determinar el contenido total de vitamina E en la dispersión acuosa liposomal sin el polímero de hialuronato sódico, se toman 250 µL de la muestra liposomal problema y se diluyen con una mezcla de diclorometano y etanol, obteniéndose en la muestra tratada la misma proporción de disolventes empleada en las muestras de referencia (1:4:16).

Posteriormente, se centrifugan las muestras aplicando el mismo procedimiento que para las muestras de referencia, es decir, centrifugación durante 15 minutos a una velocidad de 15.000 rpm y 4 °C de temperatura.

Tras el proceso de centrifugación no se ha observado ningún precipitado ni separación entre los diferentes disolventes empleados. A continuación, las muestras se inyectan y se analizan por HPLC.

4.2.2. Cuantificación de la vitamina C por HPLC

La determinación de la vitamina C, añadida en forma de la sal trisódica del ácido 2-fosfo-L-ascórbico (SAP), se ha realizado por HPLC. El método ha sido puesto a punto y validado para las distintas condiciones de trabajo en base al método de cuantificación descrito por Foco A *et al.*³¹⁵.

a) Equipo y condiciones analíticas

El equipo empleado para la valoración del SAP es el mismo que el utilizado en el método analítico de cuantificación de la vitamina E, habiendo sido descritos los módulos de los que consta en el apartado 3.2.1.

Las condiciones del análisis cromatográfico han sido las siguientes:

- *Fase estacionaria*: cartucho Nucleosil 100 NH₂, 5 µm, 25 x 0,4 cm (Teknokroma S.A., Barcelona, España).
- *Fase móvil*: solución buffer fosfato de concentración 0,15 M y acetonitrilo en una proporción 60:40, respectivamente. La fase móvil se filtra previamente por membranas de policarbonato con diámetro de poro de 0,45 µm en un equipo de filtración con bomba de vacío. La solución buffer fosfatos de concentración 0,15 M (pH 4) se prepara con NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄ (Panreac Química S.A., Madrid, España). El acetonitrilo empleado es calidad HPLC (Panreac Química S.A., Madrid, España).
- *Fase lavado*: agua purificada Milli-Q y acetonitrilo en una proporción 80:20, respectivamente. La fase móvil se filtra previamente por membranas de policarbonato con diámetro de poro de 0,45 µm en un equipo de filtración con bomba de vacío.
- *Longitud de onda (λ)*: 258 nm
- *Flujo*: 1 mL/min
- *Volumen de inyección*: 10 µL
- *Tiempo de retención*: aproximadamente 12 minutos
- *Temperatura de trabajo de la columna*: temperatura ambiente
- *Temperatura de trabajo del inyector*: 20 °C
- *Sensibilidad del detector*: 0,05 AUFS

³¹⁵ Foco A, Gasperlin M, Kristl J. Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection. *Int J Pharm.* 2005;291(1-2):21-9.

b) Validación del método

Este método se ha desarrollado para la cuantificación de SAP incluido en una formulación liposomal. El método de cuantificación se ha validado de acuerdo con los criterios de linealidad, exactitud y precisión siguiendo los mismos protocolos descritos en el apartado 3.2.1.

Las concentraciones de SAP analizadas para el ensayo de linealidad han sido de 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 y 15 µg/mL; mientras que para los estudios de exactitud y precisión se evaluaron dos niveles de concentración: 5 y 12,5 µg/mL.

Cada muestra se inyecta por duplicado, exigiéndose que el coeficiente de valoración entre inyecciones sea inferior al 3%.

c) Tratamiento de las muestras liposomales en vehículo acuoso

Las muestras corresponden a dispersiones acuosas liposomales que contienen SAP sin el polímero hialuronato sódico.

- **Preparación de muestras de referencia:**

Cada día de ensayo se preparan las soluciones madre de SAP en agua purificada Milli-Q de concentración 500 µg/mL. A partir de cada solución madre se obtiene una solución intermedia de 50 µg/mL por dilución con agua purificada Milli-Q.

Para simular las condiciones de extracción del SAP en las formulaciones liposomales problema, las muestras patrón se obtienen a partir de las soluciones intermedias por dilución con agua purificada Milli-Q y tetrahidrofurano, siendo la proporción final de agua purificada Milli-Q y tetrahidrofurano de 1:2 respectivamente. El tetrahidrofurano empleado es de calidad HPLC (Teknokroma S.A., Barcelona, España). Antes de ser analizadas por HPLC, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a una velocidad de 10.000 rpm y temperatura de 4 °C, no habiéndose apreciado ningún precipitado ni separación entre el disolvente acuoso y orgánico tras dicho proceso.

- **Preparación de muestras a partir de dispersiones acuosas liposomales con SAP**

Para determinar el contenido total de SAP en la formulación liposomal problema se sigue el mismo protocolo aplicado en la preparación de las muestras patrón. Se toman 150 µL de la muestra liposomal problema que son diluidos con agua purificada Milli-Q y tetrahidrofurano, obteniéndose una muestra tratada con un volumen final de 1,5 mL y una proporción de disolventes agua purificada Milli-Q y tetrahidrofurano de 1:2 respectivamente. Antes de analizar las muestras por HPLC, éstas son sometidas a centrifugación, aplicándose las mismas condiciones de trabajo empleadas en la obtención de las muestras de referencia.

4.2.3. Cuantificación de la Ciclosporina A por HPLC

La determinación de Ciclosporina A se ha realizado por HPLC. El método usado se basa en el descrito por Kahn GC *et al.*³¹⁶ habiendo sido validado para nuestras condiciones de trabajo.

a) Equipo y condiciones analíticas

Para el método analítico se ha empleado el mismo equipo utilizado para la cuantificación de vitamina E, descrito en el apartado 3.2.1. Las condiciones analíticas generales son:

- *Fase estacionaria:* Tracer Extrasil ODS, 5 μm , 25 x 0,4 cm (Teknokroma S.A., Barcelona, España).
- *Fase móvil:* acetonitrilo y agua purificada Milli-Q en una proporción 95:5 respectivamente. Previo a su uso, la fase móvil se filtra por una membrana de policarbonato de 0,45 μm en un equipo de filtración con bomba de vacío.
- *Fase lavado:* acetonitrilo y agua purificada Milli-Q en una proporción 20:80 respectivamente. Al igual que la fase móvil, se filtra previamente por una membrana de policarbonato con diámetro de poro de 0,45 μm .
- *Longitud de onda (λ):* 210 nm
- *Flujo:* 1 mL/min
- *Volumen de inyección:* 10 μL
- *Tiempo de retención:* aproximadamente 4 minutos
- *Temperatura de trabajo de la columna:* 40 °C
- *Temperatura de trabajo del inyector:* 20 °C
- *Sensibilidad del detector:* 0,5 AUFS

b) Validación del método

Este método se ha desarrollado para la cuantificación de Ciclosporina A en formulaciones liposomales en vehículo acuoso sin polímero. La validación ha sido realizada de acuerdo con los criterios de linealidad, exactitud y precisión descritos en el apartado 3.2.1.

En el ensayo de linealidad se prepararon muestras con una concentración de Ciclosporina A de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g/mL}$. Para los estudios de exactitud y precisión se analizaron dos niveles de concentración, 100 y 250 $\mu\text{g/mL}$. Cada muestra se inyecta por duplicado, exigiéndose que el coeficiente de variación entre inyecciones sea menor del 3%.

³¹⁶ Kahn GC, Shaw LM, Kane MD. Routine monitoring of cyclosporine in whole blood and kidney tissue using high performance liquid chromatography. *J Anal Toxicol.* 1986;10(1):28-34.

c) Tratamiento de las muestras liposomales en vehículo acuoso

Las muestras ensayadas corresponden a dispersiones acuosas de liposomas que contienen Ciclosporina A sin la presencia del polímero hialuronato sódico.

- **Preparación de muestras de referencia:**

Cada día de ensayo se preparan las soluciones madre de Ciclosporina A en acetonitrilo con una concentración 1 mg/mL de Ciclosporina A. Cada solución madre ha sido diluida con una mezcla de agua purificada Milli-Q y acetonitrilo obteniéndose muestras patrón de Ciclosporina A de una concentración comprendida entre 50 y 300 µg/mL, siendo la proporción de disolventes agua purificada Milli-Q y acetonitrilo de 1:3 respectivamente.

Posteriormente, las muestras se agitan en el vórtex durante 3 minutos y se centrifugan durante 5 minutos (4 °C) a una velocidad de 15.000 rpm. Tras dicho proceso, no se observó ningún precipitado ni separación entre el disolvente acuoso y orgánico.

Finalmente, las muestras han sido analizadas por HPLC.

- **Preparación de muestras a partir de dispersiones acuosas liposomales con Ciclosporina A:**

Para determinar el contenido total de Ciclosporina A en la formulación liposomal problema sin el polímero hialuronato sódico se sigue el protocolo aplicado en la preparación de muestras patrón, realizándose una dilución 1:4 con acetonitrilo.

A continuación, la muestra es sometida a agitación y centrifugación según las condiciones de trabajo aplicadas en las muestras patrón de referencia. Al igual que ocurría en dichas muestras, no se ha apreciado ningún precipitado ni separación entre el disolvente acuoso y orgánico.

Posteriormente, la muestra problema es analizada por HPLC.

4.2.4. Cuantificación del cloroformo residual por HS-SPME-GCMS.

Para la cuantificación de cloroformo se utilizó un método de cromatografía de gases - espectrometría de masas que se encuentra acoplado a una microextracción en fase sólida (en inglés Headspace Solid Phase Microextraction – Gas Chromatography Mass Spectrometry, HS-SPME-GCMS).

Estos ensayos fueron realizados en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de espectrometría de masas de la Universidad Complutense de Madrid.

a) Equipo y condiciones analíticas

Por indicación del responsable técnico del CAI, se emplearon las siguientes condiciones analíticas generales de valoración:

- *Fibra seleccionada:* 85 µm Carboxen/Polydimethylsiloxane
- *Acondicionador de fibras:* NURKA390 (España, Madrid). La fibra se acondiciona a 280 °C durante 30 minutos.
- *Temperatura de extracción:* 50 °C
- *Tiempo de adsorción:* 15 minutos
- *Tiempo/temperatura de desorción:* 15 min/240 °C
- *Fase estacionaria:* VF-624 ms, 1,4 µm, 60 m x 250 µm (Varian Inc., Madrid, España).
- *Temperatura del inyector:* 240 °C
- *Temperatura del horno:* rango de temperaturas a lo largo del análisis (**Tabla 5**).

Tabla 5: Rango de temperaturas en el horno durante el análisis de cloroformo por HS-SPME-GCMS.

Temperatura del horno (°C)	Gradiente de subida (°C/min)	Tiempo de duración (min)
35	-	15
35 – 50	2	-
50 – 240	20	-
240	-	6

A continuación, se indican las condiciones del módulo detector empleadas:

- *Modo:* Scan 25-650 Da
- *Temperatura de la fuente de ionización:* 230 °C
- *Temperatura del cuadrupolo:* 120 °C
- *Ionización:* 70 eV

b) Validación del método

Se han utilizado rectas de calibrado con concentraciones de 0,5; 2,5 y 10 ppm de cloroformo. El método se ha utilizado para la determinación de cloroformo en las formulaciones liposomales en vehículo acuoso sin polímero.

4.3. PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES

Las dispersiones liposomales desarrolladas se han elaborado de acuerdo con la técnica de hidratación de la película lipídica de fosfolípidos descrita por Bangham AD *et al.*³¹⁷ y adaptada por Vicario-de-la-Torre M *et al.*³¹⁸ a nuestras condiciones de trabajo. Dicha técnica consiste en solubilizar los componentes lipídicos de la formulación en un solvente orgánico volátil, para posteriormente eliminarlo y redispersar la capa lipídica formada en un medio acuoso, obteniéndose espontáneamente vesículas liposomales.

Los componentes lipídicos básicos empleados en la elaboración de las diferentes formulaciones liposomales han sido fosfatidilcolina, colesterol y vitamina E. En el proceso de preparación se pesan 400 mg de fosfatidilcolina, 50 mg de colesterol y 4 mg de vitamina E y se solubilizan en 25 mL de cloroformo. La relación final de los diferentes componentes ha sido de 8:1:0,08 respectivamente.

La evaporación del disolvente orgánico se realiza gracias al empleo de un rotavapor Buchi R-205 (Büchi®, Suiza) aplicándose como condiciones de trabajo: (1) una presión reducida de 200 mba durante 30 minutos y 100 mba durante otros 30 minutos, (2) velocidad de giro del matraz de 150 rpm y (3) una temperatura en el baño de 33 °C. Al evaporarse el disolvente orgánico, se forma una fina película lipídica adherida a las paredes interiores del matraz evaporador. Posteriormente, para la eliminación de posibles trazas de cloroformo en la película lipídica, se aplica gas nitrógeno durante al menos 5 minutos.

Posteriormente se rehidrata la película lipídica por agitación continua durante 15 minutos a 200 rpm con una solución acuosa hipotónica de boratos y trehalosa (solución A), desprendiéndose en su totalidad la película lipídica de las paredes del matraz rotavapor y formándose espontáneamente los liposomas. La composición de la solución A empleada para la dispersión fue de ácido bórico (H_3BO_3) al 8,38%, tetraborato de sodio ($Na_2B_4O_7$) al 0,755% y trehalosa al 16%. La concentración resultante de lípidos en la dispersión formada expresada en concentración de FC resulta de 40 mg/mL.

Los liposomas formados se mantienen en reposo durante dos horas para conseguir un grado de hidratación óptimo. Dichos liposomas presentan una estructura multilamilar caracterizada por ser de gran tamaño y tener varias bicapas lipídicas.

A fin de obtener vesículas liposomales con una estructura unilamilar y disminuir y homogeneizar el tamaño de dichas vesículas, la formulación se somete a sonicación en un baño

³¹⁷ Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965;13(1):238-52.

³¹⁸ Vicario de la Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome de ojo seco. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2011.

de ultrasonidos (Ultrasons-H) durante 15 minutos a una temperatura de entre 5 – 10 °C logrando desestabilizar las vesículas y así facilitar el posterior proceso de extrusión realizado con un equipo de extrusión automático (Lipex Extruder®, Lippex Biomembranes Inc., Vancouver, Canadá). En dicho proceso se fuerza a pasar la dispersión liposomal por unas membranas de policarbonato (Whatman® Nuclepore Track-Etched Membranes, Sigma-Aldrich Chemical Co., Madrid, España) gracias a la ayuda de gas nitrógeno a presión. Se emplean ciclos de trabajo en cascada, realizándose en primer lugar 10 pases con un filtro de un tamaño de poro de 0,8 µm y, posteriormente, otros 10 pases por una membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm.

Para lograr el equilibrio del sistema, la dispersión liposomal obtenida se mantiene en reposo, en condiciones de refrigeración (2 – 8 °C) y protegida de la luz durante 24 horas.

Una vez finalizado dicho proceso, la formulación liposomal se diluye con una solución acuosa hipotónica, siendo la concentración de fosfatidilcolina en la dispersión liposomal final de 20 mg/mL. Se han empleado dos tipos de soluciones acuosas hipotónicas diferentes por lo que se obtienen dos tipos distintos de dispersiones liposomales en vehículos acuosos.

- *Formulación liposomal sin polímero (FL_{sin}):*

La dispersión liposomal con una concentración inicial de fosfatidilcolina de 40 mg/mL se diluye 1:2 con una solución acuosa hipotónica de boratos y trehalosa de igual composición que la empleada en la redispersión de la capa lipídica (solución A).

- *Formulación liposomal con polímero (FL_{con}):*

La dispersión liposomal con una concentración inicial de fosfatidilcolina de 40 mg/mL se diluye 1:2 con una solución acuosa hipotónica de boratos, trehalosa y polímero (solución B). La composición de la solución B es idéntica que la de la solución A pero con la incorporación del polímero hialuronato sódico (HaNa) al 0,8%. Para una correcta preparación de la solución B es necesario mantenerla en agitación mecánica a temperatura ambiente durante un mínimo de 12 horas consiguiéndose que las cadenas del polímero se humecten adecuadamente. La dispersión liposomal final presenta una concentración de fosfatidilcolina de 20 mg/mL y de 0,4% de hialuronato sódico.

Finalmente, los preparados liposomales con y sin polímero se almacenan en nevera (2 – 8 °C) protegidos de la luz.

Para asegurar la esterilidad de las formulaciones liposomales elaboradas se trabaja bajo condiciones asépticas. Además, el material empleado se esteriliza en estufa, las soluciones acuosas se filtran por membranas con un diámetro de poro de 0,45 µm y se esterilizan por calor húmedo en autoclave (Raypa AH-21, Barcelona, España) a 121 °C durante 20 minutos y las

dispersiones liposomales finales se esterilizan por filtración mediante el empleo de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 0,22 μm .

En la **Figura 11** se ilustra el método de fabricación descrito anteriormente.

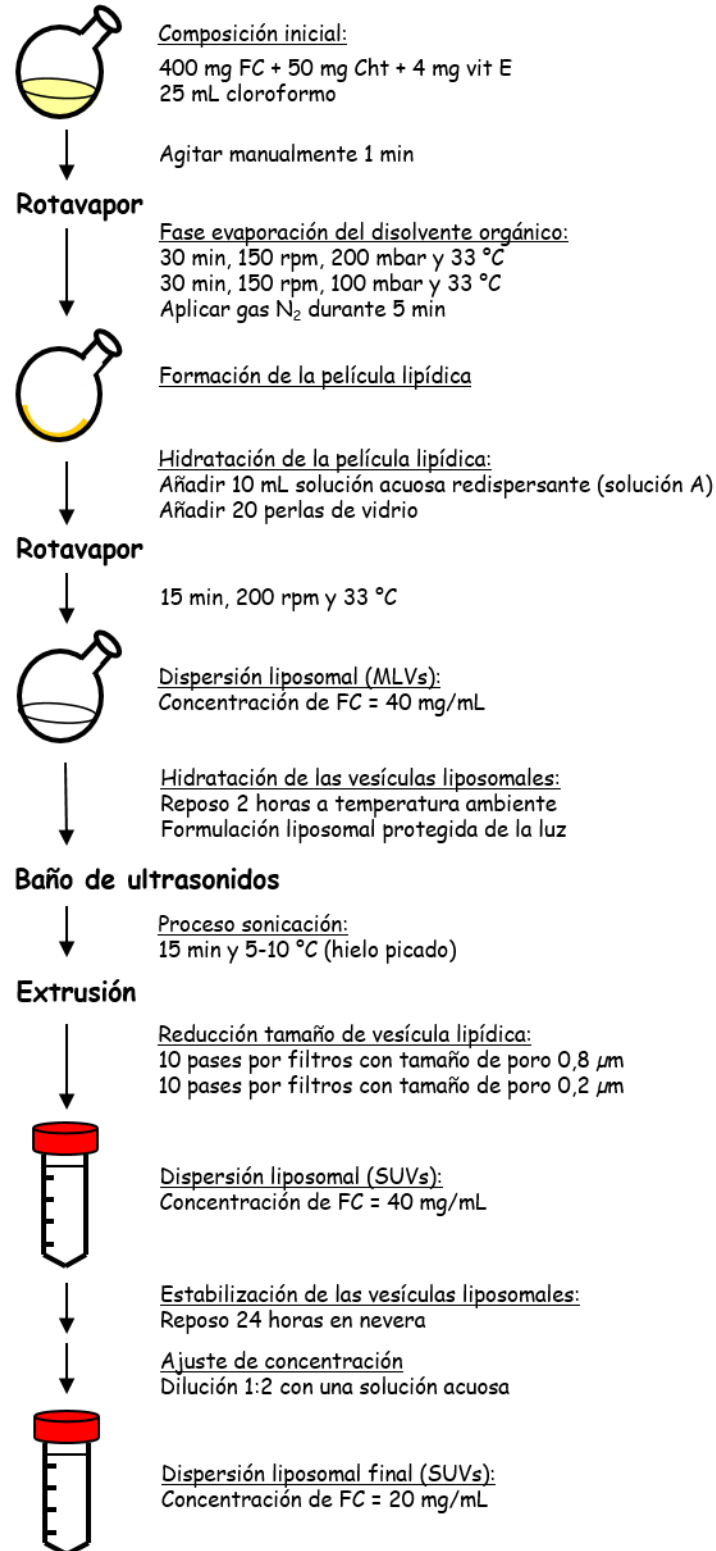


Figura 11: Esquema de la preparación general de las dispersiones liposomales.

4.3.1. Elaboración de la formulación liposomal enriquecida

Para desarrollar la lágrima artificial enriquecida o formulación liposomal enriquecida (**FL-E**) se ha seguido el método general de elaboración de formulaciones liposomales descrito anteriormente.

En la lágrima artificial enriquecida, además de la fosfatidilcolina, el colesterol y la vitamina E como componentes básicos, se incluyen dos vitaminas: una liposoluble, la vitamina A o retinol (Vit A) en forma de acetato de retinol y otra hidrosoluble, la vitamina C o ácido ascórbico (Vit C) en forma de la sal trisódica del ácido 2-fosfo-L-ascórbico (SAP).

En la primera etapa del proceso de elaboración, los componentes lipofílicos (400 mg de fosfatidilcolina, 50 mg de colesterol, 4 mg de vitamina E y 460 ng de acetato de retinol) se han solubilizado en 25 mL de cloroformo. Tras la evaporación del disolvente orgánico, se ha realizado la redispersión de la capa lipídica con una solución de boratos, trehalosa y SAP. Dicha solución se obtiene al disolver 4,4 mg de SAP en 10 mL de solución A. La relación de los diferentes componentes lipídicos (FC:Cht:Vit E:acetato de retinol) ha sido de 8:1:0,08:0,000008 respectivamente. La concentración de lípidos, expresada en concentración de fosfatidilcolina, ha sido de 40 mg/mL. El SAP se encuentra en una concentración de 440 µg/mL, equivalente a 200 µg/mL de ácido ascórbico.

Tras haber realizado los procesos de sonicación, extrusión y reposo descritos en el apartado 3.3, se han obtenido dos tipos de lágrima artificial enriquecida, una sin polímero y otra con polímero. En ambas la concentración final de fosfatidilcolina ha sido de 20 mg/mL.

- *Formulación liposomal enriquecida sin polímero (FL-E_{sin}):*

La lágrima artificial enriquecida inicial, con una concentración de fosfatidilcolina de 40 mg/mL, ha sido diluida con una la solución acuosa hipotónica de boratos y trehalosa (solución A). De este modo, la lágrima artificial enriquecida finalmente presenta una concentración de fosfatidilcolina de 20 mg/mL, 20 ng/mL de retinol y 100 µg/mL de ácido ascórbico.

- *Formulación liposomal enriquecida con polímero (FL-E_{con}):*

La dilución 1:2 se ha realizado con una solución acuosa hipotónica de boratos, trehalosa e hialuronato sodico (solución B). De este modo, la lágrima artificial enriquecida con polímero presenta una concentración de 20 mg/mL de fosfatidilcolina, 20 ng/mL de retinol, 100 µg/mL de ácido ascórbico y 0,4% de hialuronato sódico.

4.3.2. Elaboración de una formulación liposomal con Ciclosporina A al 0,1%

Para la elaboración de la formulación liposomal con Ciclosporina A al 0,1% (**FL-CsA**) se ha seguido el método general descrito anteriormente en el apartado 3.3.

La Ciclosporina A por ser un componente de carácter lipofílico es incorporada en la primera fase del proceso de fabricación junto con la fosfatidilcolina, el colesterol y la vitamina E. La cantidad de Ciclosporina A incorporada ha sido de 20 mg. Tras la fase de evaporación del disolvente orgánico, la proporción de dichos componentes en la formulación liposomal de Ciclosporina A (FC:Cht:Vit E:CsA) fue de 8:1:0,08:0,4 respectivamente. Una vez realizada la etapa de rehidratación de la película lipídica con la solución A, la concentración resultante de lípidos expresada en concentración de fosfatidilcolina ha sido de 40 mg/mL y la concentración de Ciclosporina A del 0,2%.

Con el objetivo de obtener una concentración de fosfatidilcolina de 20 mg/mL y Ciclosporina A al 0,1% en la formulación liposomal se ha realizado una dilución 1:2 de la dispersión liposomal. Para ello, se han empleado dos tipos diferentes de soluciones acuosas hipotónicas, una con polímero bioadhesivo y otra sin polímero, dando lugar a dos tipos distintos de formulaciones liposomales.

- *Formulación liposomal con Ciclosporina A sin polímero (**FL-CsA_{sin}**):*

La dispersión liposomal inicial con una concentración de fosfatidilcolina de 40 mg/mL y 0,2% de Ciclosporina A se diluye 1:2 con una solución acuosa hipotónica de boratos y trehalosa (solución A). Por consiguiente, la formulación liposomal **FL-CsA_{sin}** presenta una concentración de 20 mg/mL de fosfatidilcolina y Ciclosporina A al 0,1%.

- *Formulación liposomal con Ciclosporina A con polímero (**FL-CsA_{con}**):*

La dispersión liposomal inicial con una concentración de fosfatidilcolina de 40 mg/mL y 0,2% Ciclosporina A se diluye 1:2 con una solución acuosa hipotónica de boratos, trehalosa e hialuronato sódico (solución B). De este modo se obtiene la formulación liposomal **FL-CsA_{con}** que presenta una concentración de 20 mg/mL de fosfatidilcolina, 0,1% de Ciclosporina A y 0,4% de hialuronato sódico.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES

La caracterización de las diferentes formulaciones liposomales preparadas se ha realizado determinando las propiedades fisicoquímicas (pH, osmolaridad, tensión superficial y viscosidad), el tamaño de las vesículas lipídicas y a través de la realización de estudios de tolerancia *in vitro* e *in vivo*.

Para todas las evaluaciones se emplearon 3 lotes de cada formulación, excepto para los estudios de tolerancia *in vivo* en los que se empleó un lote de cada preparado liposomal.

Todos los estudios se han realizado a tiempo cero y, además, con el objeto de analizar la evolución en el tiempo de las propiedades fisicoquímicas, el tamaño de las vesículas y la tolerancia *in vitro* de los diferentes preparados liposomales, se han planteado dos estudios de estabilidad a dos temperaturas de almacenamiento distintas, temperatura ambiente (25 °C) y nevera (2 – 8 °C), evaluándose dichos parámetros a diferentes tiempos de estudio. En ambas condiciones de almacenamiento, las formulaciones se encontraron protegidas de la luz.

- *Formulación liposomal blanco o vehículo basal (FL):*

Las formulaciones liposomales blanco (**FL_{sin}** y **FL_{con}**) se han caracterizado a tiempo cero, 1, 6 y 12 meses para todos los parámetros indicados anteriormente, a excepción de los estudios de tolerancia *in vitro* que se ampliaron a tiempo 3 meses.

- *Formulación liposomal enriquecida (FL-E):*

Al igual que para el vehículo base, las formulaciones liposomales enriquecidas (**FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**) han sido caracterizadas a los tiempos cero, 1, 6 y 12 meses para todos los parámetros indicados anteriormente, con la salvedad de la tolerancia *in vitro*, evaluada también a tiempo 3 meses.

- *Formulación liposomal con Ciclosporina A (FL-CsA):*

A lo largo del estudio de estabilidad, las formulaciones liposomales con Ciclosporina A al 0,1% (**FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**) se han caracterizado a tiempo cero, 1 y 6 meses, ampliándose el estudio de tolerancia *in vitro* a tiempo 3 meses.

Además de las pruebas descritas anteriormente, fue cuantificado el contenido de vitamina E, vitamina C y Ciclosporina A en los preparados liposomales sin polímero **FL_{sin}**, **FL-E_{sin}** y **FL-CsA_{sin}** respectivamente, de acuerdo con los procedimientos descritos en el apartado 3.2.

4.4.1. Determinación del pH

El pH de las formulaciones se determina mediante el empleo de un pH-metro Mettler Toledo Sevensgo (Barcelona, España).

El equipo se calibra previamente con unas soluciones estándar de pH 4 y 7 (Crison, Alella, Barcelona, España). Cada muestra se ha medido por duplicado a temperatura ambiente (25 °C).

4.4.2. Determinación de la osmolaridad

El aparato empleado para determinar la osmolaridad ha sido el osmómetro de presión de vapor K-7000 (Knauer GmbH, Berlín, Alemania).

El principio fundamental de medida se basa en la diferencia de temperaturas que se registra entre dos termorresistencias que forman un puente de Wheatstone. Estas termorresistencias están dentro de una celda saturada con vapor del disolvente.

Al inicio, ambas termorresistencias tienen una gota de disolvente puro por lo que la diferencia de potencial entre ambas es cero. Durante la medición, en una de las resistencias se coloca una gota de la formulación problema. El vapor del disolvente se condensará en la gota de la formulación problema, tratando de diluir la solución e igualar su presión de vapor a la del disolvente puro (ley de Raoult: la presión de vapor de una solución es inferior que la de su disolvente puro). La variación de la presión de vapor en la gota conlleva un aumento de temperatura que es detectado por las termorresistencias, siendo directamente proporcional al número de partículas disueltas en la solución problema.

El control de la temperatura se hace automáticamente, con una exactitud de $\pm 0,001$ °C. La cabeza del osmómetro donde están colocadas las muestras también está termostatazada, y se recomienda que su temperatura sea dos grados superior a la temperatura de la celda. La temperatura elegida para la determinación de la osmolaridad en las formulaciones liposomales ha sido de $33,0 \pm 0,2$ °C con el objetivo de asemejar las condiciones de trabajo a la temperatura de la superficie corneal.

El osmómetro dispone de un software de evaluación de datos (EuroOsmo[®]) que permite controlar todos los parámetros de medición (temperatura, tiempo de detección, etc.).

Como solución de referencia se emplea una solución acuosa de cloruro sódico 400 mOsm/L. Los análisis de cada muestra se realizan por triplicado.

4.4.3. Determinación de la tensión superficial

Para las medidas de tensión superficial se utiliza un tensiómetro digital K11 (Krüss, Hamburg, Alemania) combinado con el software Krüss Laboratory Desktop versión 3.11.

La tensión superficial se define como la fuerza mínima necesaria para desprender una sonda mojable de la superficie del líquido en la que se encuentra parcialmente sumergida. La sonda mojable se suspende de una balanza de precisión y una plataforma de altura ajustable acerca la muestra líquida hasta ella. Tan pronto como la sonda mojable toca la superficie aparece una fuerza de atracción, dato que permite el cálculo de la tensión superficial.

La sonda mojable puede tener forma de anillo o de placa. Ha sido elegida la placa rectangular rugosa PL21 (Krüss, Hamburg, Alemania) de platino por tener una excelente humectación, haciendo que el ángulo de contacto sea prácticamente cero. Éste hecho es de gran relevancia porque así podemos calcular la tensión superficial de un líquido conociendo solamente la fuerza que actúa en el equilibrio y la longitud de la placa. Con este método no es necesario introducir correcciones de medida ni saber la densidad del líquido analizado.

A continuación, se describe el protocolo y las condiciones de medida establecidas para la determinación de la tensión superficial:

- Atemperar la muestra durante 3 minutos.
- Sumergir la placa en el seno del líquido a analizar a una profundidad de 3 mm y a una velocidad de 8 mm/min.
- La fuerza a realizar equivale al 90% de la fuerza necesaria para romper el menisco que se forma entre la placa y la superficie del líquido.
- Sumergir y elevar la placa sucesivas veces hasta lograr una desviación estándar (DE) en 10 medidas consecutivas, igual o inferior a 0,5 unidades.

El tensiómetro lleva asociado un baño termostatzado. Las medidas se realizan a una temperatura de $33,0 \pm 0,2$ °C para que las condiciones de trabajo se asemejen a la temperatura de la superficie corneal. Cada formulación se analiza por triplicado, limpiándose la placa entre cada medición. La placa se limpia en primer lugar con agua, después con acetona y, por último, se expone al fuego siendo calentada hasta que queda al rojo vivo.

Previo a la medición de tensión superficial en las formulaciones liposomales, el tensiómetro se controla con tres determinaciones consecutivas de agua purificada Milli-Q. Se exige que el valor promedio de tensión superficial obtenido se encuentre entre 68 – 73 mN/m y que la diferencia entre los valores individuales máximo y mínimo sea inferior a 2 unidades.

4.4.4. Determinación de la viscosidad

La reología es la ciencia que estudia cómo se deforma y fluye la materia cuando se somete a una presión que puede ser de tensión, compresión o fuerza de cizalla.

El parámetro más representativo del comportamiento reológico de un material es la viscosidad. Éste se define como la resistencia que ofrece un fluido a la acción de una fuerza aplicada. Dependiendo de la fricción interna entre las partículas de un sistema disperso así será la resistencia de las mismas a que se deslicen unas sobre otras al aplicar la fuerza. A mayor fricción, mayor resistencia y mayor viscosidad del sistema. Por el contrario, a menor fricción, menor resistencia y mayor fluidez.

Para evaluar la viscosidad se emplea un reómetro RheoStress RS-1 (Haake, Düsseldorf, Alemania). Para las determinaciones se utiliza el sistema plato-plato de 60 mm de diámetro y un espacio de separación de 0,5 mm. Al tratarse de preparados liposomales de muy baja viscosidad e intentar simular las condiciones de alto grado de cizallamiento a las que serán sometidas las formulaciones durante el proceso de parpadeo, se ha elegido un método de medida por etapas. Este método consiste en aumentar la velocidad de cizalla de 0 – 1000 s⁻¹ progresivamente, en 20 pasos. En cada una de las etapas se determina la viscosidad de la muestra una vez ésta ha alcanzado el estado de equilibrio correspondiente.

La temperatura de trabajo ha sido de 33,0 ± 0,2 °C y todas las medidas de cada formulación se han realizado por triplicado.

4.4.5. Determinación del tamaño de las vesículas liposomales

Para la evaluación del tamaño de las vesículas liposomales se emplea la técnica de espectroscopía de correlación fotónica usándose el equipo Zetatrak (Microtrac®, Florida, EEUU).

La técnica de espectroscopía de correlación fotónica se basa en hacer incidir un haz de luz monocromático procedente de un láser sobre las vesículas lipídicas. El tamaño de las vesículas se calcula a partir de las variaciones que experimenta la radiación cuando incide sobre las vesículas lipídicas.

El protocolo a seguir para realizar las medidas de tamaño ha sido atemperar la muestra a temperatura ambiente (25 °C), agitarla en el vórtex durante 30 segundos y realizar una dilución 1:20 (v:v) con agua purificada Milli-Q. Todas las medidas de cada formulación liposomal se han realizado por triplicado.

4.4.6. Ensayos de tolerancia *in vitro*

Con el objetivo de predecir la posible toxicidad de las formulaciones liposomales en las estructuras de la superficie ocular tras su administración tópica, se han realizado ensayos de tolerancia o viabilidad celular en las líneas celulares de córnea y conjuntiva humana.

Los ensayos de citotoxicidad se realizan en condiciones de esterilidad, empleándose una campana de flujo laminar. El material requerido para la realización de los estudios (tubos de 15 mL, tubos de 50 mL, frascos de cultivo de 75 mL, placas de cultivo de 96 pocillos, pipetas de 10 mL y placas Petri) es de plástico estéril y ha sido suministrado por Sarstedt S.A. (Barcelona, España). Los medios de cultivo de ambas líneas celulares han sido adquiridos en Life Technologies (Madrid, España).

La base de dichos ensayos consiste en cuantificar la respiración mitocondrial³¹⁹ de las células por la técnica colorimétrica de reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich Chemical Co., Madrid, España). Por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa presente en las mitocondrias, la sal de tetrazolio MTT (forma oxidada) de color amarillo se convierte en formazano de MTT (forma reducida) de color azul oscuro. La cantidad de cristales de formazán producidos es directamente proporcional a la cantidad de células vivas, pudiéndose, de este modo, estudiar la funcionalidad celular.

Los estudios de toxicidad celular en las líneas celulares de córnea y conjuntiva humanas han seguido la misma metodología de trabajo.

Después de la siembra celular en las placas estériles y con el objetivo de facilitar la adherencia de las células a la base de la placa, éstas se incuban durante 20 horas a 37 °C y una atmósfera del 95% de aire y 5% de CO₂. Posteriormente, se elimina el medio con el resto de las células no adheridas y es sustituido por las formulaciones a estudiar.

Con el objetivo de prever el efecto de los preparados liposomales desarrollados sobre la superficie ocular durante tratamientos breves y prolongados, se han analizado diferentes tiempos de exposición de las células con las formulaciones (15 minutos, 1 hora y 4 horas). El tiempo de contacto de 15 minutos simula exposiciones breves ya que se estima que en la administración tópica ocular el tiempo de residencia del preparado sobre la superficie ocular es inferior a 5 minutos, mientras que los tiempos de 1 y 4 horas intentan reflejar lo ocurrido en tratamientos prolongados.

Transcurridos los distintos tiempos de incubación, se elimina el medio y se añade en cada pocillo 20 µL de una solución estéril con 5 mg/mL de MTT en una solución tampón fosfato salino (en inglés phosphate buffered saline, PBS). A continuación, las células con el MTT son

³¹⁹ Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, *et al.* Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988;48(17):4827-33.

incubadas en las condiciones descritas anteriormente durante 3 horas. Tras la aspiración cuidadosa de la solución residual de MTT y con el fin de solubilizar los cristales de formazán formados, se añadieron a cada pocillo 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Chemical Co., Madrid, España). La cantidad de MTT reducido a formazán se ha cuantificado por espectrofotometría a 550 nm en un lector de placas (mod 6010152EU, Digiscan, Eugendorf, Austria).

Para cada día de ensayo, junto con los preparados a estudiar también se valoran un control positivo y otro control negativo. Para el control negativo se toma como referencia células en contacto con el medio de cultivo específico mientras que como control positivo se toma como referencia células tratadas con una solución de cloruro de benzalconio (Sigma-Aldrich Chemical Co.) al 0,005% en una solución salina de NaCl al 9%. Este compuesto presenta toxicidad sobre células de la superficie ocular por provocar a dicha concentración estrés oxidativo, apoptosis y muerte celular^{320,321,322,323,324,325}.

Los resultados de absorbancia obtenidos para estas células sin tratar (control negativo) representan el 100% de viabilidad celular. En cambio, para todas las formulaciones ensayadas, tanto las formulaciones problema como el control positivo, los resultados de viabilidad celular se expresan en porcentaje respecto los valores de tolerancia obtenidos en el control negativo.

Cada formulación problema se ha ensayado un mínimo de 3 veces por cada tiempo de contacto valorado.

En el siguiente esquema se representa la metodología seguida en los ensayos de citotoxicidad celular (**Figura 12**).

³²⁰ Brasnu E, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Warnet JM, Baudouin C. Comparative study on the cytotoxic effects of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines. *Mol Vis.* 2008;14:394-402.

³²¹ Baudouin C, Riancho L, Warnet JM, Brignole F. In vitro studies of antiglaucomatous prostaglandin analogues: travoprost with and without benzalkonium chloride and preserved latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4123-8.

³²² Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. In vitro study of inflammatory potential and toxicity profile of latanoprost, travoprost, and bimatoprost in conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(7):2444-50.

³²³ Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(3):642-52.

³²⁴ Geerling G, Daniels JT, Dart JK, Cree IA, Khaw PT. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(5):948-56.

³²⁵ Hattori Y, Nakanishi N. Effects of cyclosporin A and FK506 on nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in bacterial lipopolysaccharide-treated J774 macrophages. *Cell Immunol.* 1995;165(1):7-11.

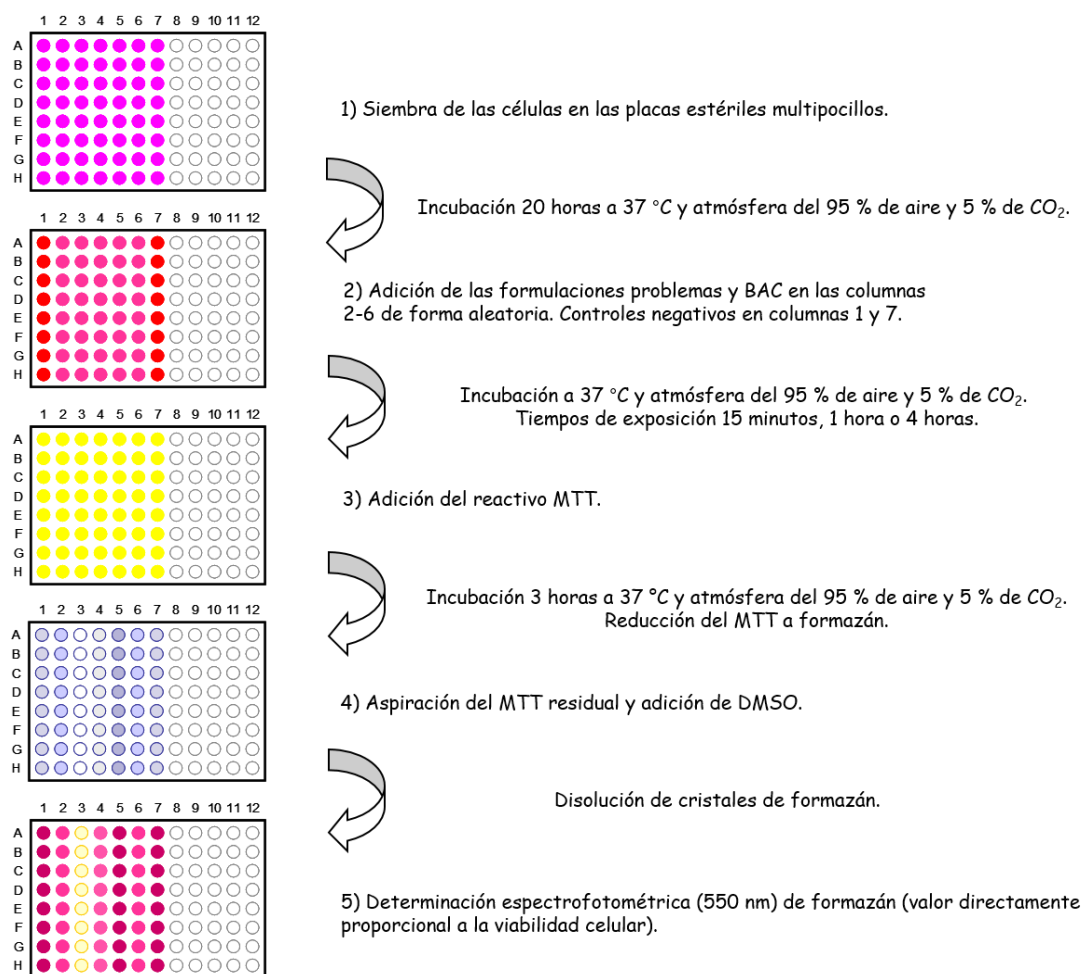


Figura 12: Metodología seguida en los ensayos de viabilidad celular.

a) Línea celular de córnea humana (HCLE)

La línea celular de córnea humana procede de la línea Human Corneal Limbal Epithelial (HCLE) cedida por la Dra. Ilene K. Gipson (Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, MA-EEUU)³²⁶.

Las células se han cultivado en frascos de 75 mL, en una incubadora a 37 °C en atmósfera humidificada con 95% de aire y 5% de CO₂. El medio de cultivo empleado ha sido EpiLife[®] Medium, aplicado junto con un suplemento para células de córnea humana (Human Corneal Growth Supplement), ambos suministrados por Life Technologies (Madrid, España).

Las células han sido despegadas de la base del frasco de cultivo con tripsina, centrifugadas a 10.000 rpm y temperatura ambiente y, finalmente, resuspendidas en su medio de cultivo. En el proceso de siembra se han empleado placas estériles de 96 pocillos habiéndose añadido alícuotas de 200 µL. La concentración del medio con células empleado ha sido de 0,15 x 10⁶ células/mL.

³²⁶ Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Tisdale A, Fong T, Russo CL. Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2496-2506.

b) Línea celular de conjuntiva humana

La línea celular de epitelio de conjuntiva humana se denomina IOBA-NHC³²⁷ y procede del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Valladolid, España.

Las células se han cultivado en frascos de 75 mL, en una incubadora a 37 °C en atmósfera humidificada con 95% de aire y 5% de CO₂. El medio de cultivo utilizado ha sido DMEM:F-12 (1:1, v:v) suplementado con diferentes compuestos: mezcla de penicilina y estreptomicina (Gibco[®], Life Technologies), suero bovino fetal (FBS) inactivado (Gibco[®], Life Technologies), insulina bovina sérica (Sigma-Aldrich Chemical Co.), hidrocortisona (Sigma-Aldrich Chemical Co.), fungizona (Gibco[®], Life Technologies) y toxina colérica (Gentaur[®], Kampenhout, Bélgica).

Al igual que las células de córnea humana, se separa las células de conjuntiva de la base del frasco de cultivo empleándose tripsina. Posteriormente, las células se resuspenden en su medio de cultivo y se siembran en una placa estéril de 96 pocillos, obteniéndose aproximadamente 40.000 células por pocillo.

4.4.7. Ensayos de tolerancia *in vivo*

Para la realización de los estudios de tolerancia *in vivo* se han empleado conejos machos albinos de Nueva Zelanda (2 – 2,5 Kg de peso) procedentes de la granja de San Bernardo (Navarra, España).

Estos ensayos se han realizado en el animalario de la facultad de medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) disponiéndose del correspondiente informe favorable tanto del Comité de Experimentación Animal de dicha universidad como del permiso de la Comunidad de Madrid (Ref. PROEX 011/16).

En el animalario, las condiciones ambientales del recinto están ajustadas a una temperatura de 20 – 24 °C, una humedad relativa del 55 ± 10% e iluminación artificial moderada con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas. Además, cada conejo se encuentra en una jaula individual, con libre acceso a comida y bebida.

Los protocolos de trabajo desarrollados han seguido la normativa establecida por ARVO para el uso de animales de experimentación (ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research³²⁸) y la directiva correspondiente de la Comunidad Europea (European Communities Council Directive 86/609/EEC).

³²⁷ Diebold Y, Calonge M, Enríquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Sáez V, *et al.* Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(10):4263-74.

³²⁸ www.arvo.org

En estos estudios se han empleado 6 animales. A cada animal se le ha administrado 30 µL de la formulación a evaluar (**FL_{sin}**, **FL_{con}**, **FL-E_{sin}**, **FL-E_{con}**, **FL-CsA_{sin}** o **FL-CsA_{con}**) en el ojo derecho, y en el ojo izquierdo, 30 µL de una solución salina isotónica estéril de NaCl al 9% que se utiliza como control. Las formulaciones se aplican en el *cul de sac* del ojo al tirar suavemente del párpado inferior del globo ocular. Posteriormente, se cierran los párpados cuidadosamente durante aproximadamente un segundo con el objeto de evitar la pérdida del preparado administrado. La aplicación de la formulación se repite cada 30 minutos durante un periodo de tiempo de 6 horas³²⁹.

Antes de iniciar el estudio de tolerancia *in vivo*, y por lo tanto, la administración de las formulaciones a evaluar, los dos ojos de cada animal han sido valorados realizando un examen macroscópico y una tinción con fluoresceína a fin de detectar posibles daños en la superficie ocular del animal tales como irritación, defectos o lesiones oculares. Los animales que han presentado cualquier tipo de alteración ocular fueron excluidos del estudio.

Una vez realizada la administración del preparado lagrimal, se evalúan los signos y síntomas clínicos que presentan los animales de experimentación a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), teniendo en cuenta las directrices establecidas por la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos)³³⁰. Se han valorado signos clínicos de dolor y/o angustia como son la presencia de alteraciones en el parpadeo o en el proceso de secreción lagrimal y se ha realizado un examen macroscópico con el objetivo de determinar posibles alteraciones en córnea, conjuntiva, iris y párpados. Además, la valoración se completa con la prueba de tinción con fluoresceína. Para establecer el grado de alteración de cada signo clínico se sigue los criterios recogidos en la **Tabla 6**, correspondiendo la numeración más baja a la ausencia de signos.

Tabla 6: Sistema de graduación de la evaluación macroscópica de los signos y síntomas de la superficie ocular para el estudio de tolerancia *in vivo*.

Grado	Molestias	Secreción	Córnea	Conjuntiva	Iris	Párpados
0	No hay reacción de disconfort	No hay secreción al administrar la formulación	No aparece ulceración u opacidad	Ausencia de alteraciones en la conjuntiva	Ausencia de alteraciones en el iris	No hay presencia de hinchazón
1	Parpadeo	Secreción intermedia sin que se humecte el pelo alrededor de los ojos del animal	Áreas dispersas o difusas de opacidad	Ligera hiperemia / Edema ligero	Pliegues del iris profundos / Hiperemia circuncorneal moderada / Iris reactivo a la luz	Ligero hinchazón
2	Parpadeo intenso / Lagrimeo / Vocalizaciones	Secreción destacada con humectación del pelo alrededor de los ojos del animal	Zona translúcida fácilmente detectada	Hiperemia moderada	Hemorragia / Destrucción visible / Ausencia de reacción ante la luz	Hinchazón moderada
3	-	-	Detalles del iris no apreciables / Tamaño de la pupila apenas discernible	Hiperemia intensa / Edema intenso / Hemorragia	-	Inflamación severa
4	-	-	Córnea opaca. No se discierne el iris a través de la opacidad	-	-	-

³²⁹ Enríquez-de-Salamanca A, Diebold Y, Calonge M, García-Vazquez C, Callejo S, Vila A, *et al.* Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(4):1416-25.

³³⁰ Organization for Economic Co-operation and Development. Test guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. 2 Oct 2012. Available on line at < <http://www.oecd.org>.

4.5. ENSAYOS DE EFICACIA *IN VIVO* DE LAS FORMULACIONES LIPOSOMALES

Se ha valorado la eficacia *in vivo* tanto para la formulación liposomal enriquecida como para la formulación liposomal con Ciclosporina A al 0,1%, ambas lágrimas artificiales con hialuronato sódico al 0,4% (**FL-E_{con}** y **FL-CsA_{con}**, respectivamente).

4.5.1. Ensayos de eficacia *in vivo* de la formulación liposomal enriquecida FL-E_{con}

Para poder evaluar la eficacia de la lágrima enriquecida **FL-E_{con}** en animales, previamente ha sido necesario desarrollar un modelo animal de ojo seco inducido. Posteriormente, fue valorada su eficacia en la salud de la superficie ocular en voluntarios humanos sanos.

a) **Ensayos de eficacia *in vivo* en un modelo animal de la enfermedad de ojo seco**

Dicho ensayo de eficacia ha constado de dos partes. Inicialmente ha sido necesario poner a punto del modelo animal de la enfermedad de ojo seco para, una vez instaurado el cuadro patológico, estudiar el tiempo de reversión de la enfermedad con ayuda de la administración tópica oftálmica de la lágrima enriquecida **FL-E_{con}**.

• Desarrollo y caracterización de un modelo animal de la enfermedad de ojo seco

El modelo animal de la enfermedad de ojo seco ha sido desarrollado y caracterizado con la colaboración de oftalmólogos expertos en superficie ocular de nuestro grupo de investigación (UCM n.º 920415) en cobayas Dunkin Hartley blancas hembras, con un peso comprendido entre 200 – 250 g y suministradas por Harlan Ibérica (IBERICA S.L., Barcelona, España)

Dichos ensayos se realizaron en el animalario de la facultad de medicina de la UCM teniendo la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la UCM y de la Comunidad de Madrid. En cada jaula se colocaron 3 cobayas las cuales tuvieron en todo momento acceso libre a comida y bebida. Antes de iniciar los experimentos, fueron sometidas a un periodo de adaptación de 15 días en las siguientes condiciones climáticas: 20 – 24 °C de temperatura, 55 ± 10 % de humedad relativa y ciclos controlados de luz moderada/oscuridad de 12 horas/12 horas.

Para valorar el estado de la superficie ocular en los animales de experimentación en cada una de las etapas del estudio se utilizaron diferentes pruebas clínicas. Las pruebas realizadas incluyen la determinación de (1) la osmolaridad de la lágrima, (2) la valoración de la secreción lagrimal mediante el uso de tiras de rojo de fenol, (3) tinción de la superficie ocular con fluoresceína y (4) la citología de impresión de células epiteliales de la superficie ocular; evaluándose con éstas dos últimas pruebas el estado de la superficie ocular.

- *Estudio de la osmolaridad lagrimal*

El estudio de osmolaridad lagrimal se emplea como marcador de la integridad de la película lagrimal ya que sus valores son directamente proporcionales a la severidad del cuadro patológico de ojo seco³³¹. En la enfermedad de ojo seco, la concentración de electrolitos en la superficie ocular se encuentra aumentada debido a un alto grado de evaporación de la lágrima o a una disminución en la secreción lagrimal, originándose una lágrima hiperosmolar. La presencia de una elevada concentración de electrolitos da lugar a estrés en las células corneales y conjuntivales de la superficie ocular.

Para medir la osmolaridad se ha empleado un osmómetro TearLab Osmolarity System® (San Diego, California, EEUU) que consta de un lápiz al que se le acopla un microchip de policarbonato no estéril y de un único uso, capaz de recolectar a través de un microcapilar un volumen de 50 nL de muestra lagrimal. Posteriormente, se conecta el lápiz al lector midiéndose de este modo la conductividad de la muestra y obteniendo un resultado de osmolaridad cuantitativo. Para evitar alteraciones en los valores de osmolaridad, la muestra se ha tomado teniendo en cuenta las siguientes indicaciones:

- La toma de muestra se ha realizado al menos dos horas después de la administración de las formulaciones oftálmicas de uso tópico.
- La recogida de muestra se ha realizado antes de aplicar cualquier tipo de tinción sobre la superficie ocular.
- La punta del lápiz se ha colocado en el borde lateral-temporal del párpado inferior a fin de recoger muestra del menisco de líquido lagrimal que se forma entre el párpado inferior y la superficie ocular. Durante el muestreo, no se ha desplazado la punta del lápiz por el borde del párpado para evitar el lagrimeo reflejo.

Tanto el valor promedio como la dispersión entre los valores individuales de osmolaridad son indicativos de posibles alteraciones en la película lagrimal. De hecho, cuando la diferencia entre medidas es mayor de 8 mOsm/L se considera que la película lagrimal es inestable³³².

- *Test de rojo de fenol*

Con la prueba de rojo de fenol se determina la cantidad de lágrima producida por el ojo. Consiste en el empleo de una tira de algodón de 70 mm impregnada en rojo de fenol (Zone-Quick, Showa Yakuhin Kako Co., LTD, Tokyo, Japón), un colorante pH-sensible que cambia de color, de amarillo a rojo, cuando se humedece con la lágrima.

³³¹ Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C *et al.* TFOS DEWS II Definition and Classification report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):273-83.

³³² www.tearlab.com

Con la ayuda de una pinza se doblan 3 mm de uno de los extremos de la tira y se inserta en el canto lateral del saco conjuntival inferior durante 1 minuto. Inmediatamente después de retirar la tira, se mide la zona humedecida ayudándonos de una escala en milímetros que hay en la misma caja del test.

El valor normal en cobayas para el test de rojo de fenol es de $16 \pm 4,7$ mm³³³.

- *Tinción con fluoresceína*

La fluoresceína en su sal sódica es un colorante hidrosoluble de color naranja. Al entrar en contacto con la película lagrimal (alcalina) se vuelve verde fluorescente y tiñe las zonas del estroma corneal que no tienen la cobertura lipídica natural (superficie hidrofílica) detectando de este modo daños en las células y alteraciones en las uniones celulares del epitelio corneal. Por lo tanto, la prueba clínica de tinción con fluoresceína es útil para evaluar la integridad de la superficie ocular.

Para la tinción se añaden con la ayuda de una micropipeta 2 µL de una solución de fluoresceína sódica al 1% (Colircusi Fluoresceina[®], Alcón Cusí S.A., Barcelona, España) en el interior del saco conjuntival inferior. Transcurridos 2 minutos, se evalúa macroscópicamente la superficie ocular usando una lámpara de hendidura (SL-15 Portable Slit Lamp, Kowa) y un filtro de luz azul cobalto.

Las muestras se clasifican en base al sistema de puntuación de Oxford³³⁴, clasificación semicuantitativa en donde se evalúa en orden creciente la intensidad de la tinción de 0 (ausencia de tinción o tinción negativa) a 4 (presencia de tinción o tinción positiva) (**Figura 13**). La ausencia de tinción indica que no existen alteraciones en la superficie ocular. En cambio, se considera que existen alteraciones en la superficie ocular cuando la tinción con fluoresceína es mayor de grado 0.

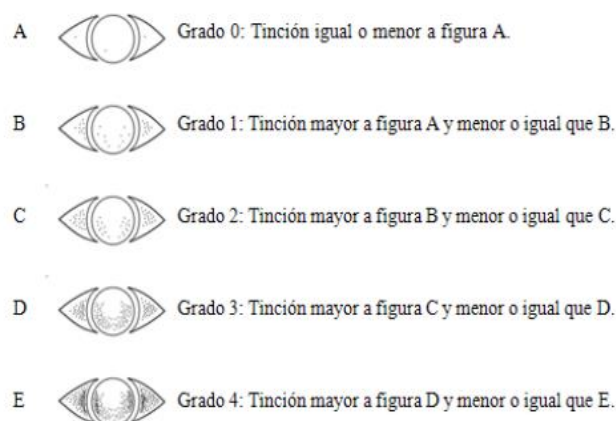


Figura 13: Escala Oxford para la evaluación de tinción corneal con fluoresceína.

³³³ Trost K, Skalicky M, Nell B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Vet Ophthalmol.* 2007;10(3):143-6.

³³⁴ Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea.* 2003;22(7):640-50.

- *Citología de impresión conjuntival (CIC):*

La citología de impresión conjuntival es una técnica mínimamente invasiva empleada para evaluar el grado de metaplasia escamosa, indicativo del estado de las capas más superficiales del epitelio conjuntival, corneal y límbico de la superficie ocular. El grado de lesión es directamente proporcional a la severidad de la enfermedad de ojo seco.

Las muestras han sido tomadas de la zona conjuntival bulbar superior al presionar ligeramente con la ayuda de la punta de una pinza una membrana de ésteres de celulosa (acetato y nitratos de celulosa) con un tamaño de poro de 4,5 µm (Immobilon-NC HAWP304F0, Millipore) durante 3 segundos, de manera que las células conjuntivales quedan adheridas al papel. Cada muestra es sumergida en etanol al 95% entre 15 minutos y 24 horas para fijar las células a la membrana. A continuación, se deposita la muestra sobre un portaobjetos y se tiñe con ácido peryódico de Schiff (PAS) y hematoxilina (método PAS-hematoxilina) siguiendo el protocolo descrito en la **Tabla 7**.

Tabla 7: *Protocolo de tinción para el estudio de las muestras de CIC.*

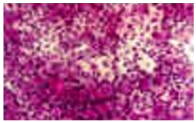
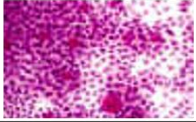
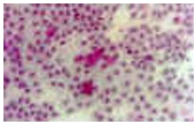
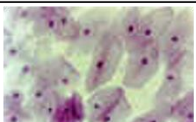
Fase	Material / Reactivo	Tiempo
1	Lavado en agua destilada	10 minutos
2	Ácido peryódico 1%	10 minutos
3	Lavado en agua destilada	10 minutos
4	Reactivo de Schiff puro	10 minutos
5	Lavado en agua destilada	10 minutos
6	Hematoxilina de Harris	2 minutos
7	Lavado en agua destilada	10 minutos
8	Lavado en agua destilada	10 minutos
9	Etanol 96%	10 minutos
10	Etanol 96%	10 minutos
11	Etanol 100%	10 minutos
12	Xilol 100%	10 minutos
13	Xilol:Etanol 100% (50:50)	10 minutos

Finalmente, dichas muestras se observan por microscopía óptica evaluándose el grado de metaplasia escamosa según el sistema de graduación de Nelson y las consideraciones descritas por Zuazo F *et al*³³⁵. En dicha evaluación se consideran diversos criterios citológicos de celularidad, tales como el contacto entre células, la relación núcleo/citoplasma celular, la cantidad de células caliciformes y la presencia de metaplasia o cambios en el aspecto de las células epiteliales³³⁶ (**Tabla 8**).

³³⁵ Zuazo F, López-Ponce DE, Salinas-Toro D, Valenzuela F. Citología de impresión conjuntival en pacientes con valores de OSDI normales y alterados. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2014;89(10):391-6.

³³⁶ Rivas L. Pruebas histológicas en el ojo seco. En: Murube del Castillo J, compilador. *Ojo seco*. Madrid: Tecnimedia Editorial; 1997:159-66.

Tabla 8: Graduación de Nelson para la metaplasia escamosa en las muestras de CIC.

Grado	Puntuación total criterios citológicos	Cambios celulares		Imagen de citología de impresión
		Células caliciformes	Células epiteliales	
Grado 0 o Grado normal	0 - 3	Abundantes Ovales y gruesas Citoplasma fuertemente PAS positivo	Pequeñas y redondas Límites celulares bien definidos Citoplasma eosinófilo No se aprecian espacios intercelulares Núcleo grande Relación núcleo/citoplasma: 1/1 o 1/2	
Grado 1 o Grado leve	4 - 5	Disminución ligera en número Mantienen forma oval Mantienen tinción PAS positiva	Ligeramente mayores y más poligonales Límites celulares bien definidos Citoplasma eosinófilo Aparición de ligeros espacios intercelulares Disminución del tamaño del núcleo Relación núcleo/citoplasma: 1/3	
Grado 2 o Grado moderado	6 - 9	Disminución marcada en número Disminución de tamaño Bordes poco definidos Tinción PAS menos intensa	Aumento de tamaño y son poligonales Límites celulares poco definidos Tinción variable del citoplasma Grandes espacios intercelulares Núcleo más pequeño Algunas células binucleadas Relación núcleo/citoplasma: 1/4 o 1/5	
Grado 3 o Grado severo	≥ 10	Gran disminución en número o ausencia Pueden estar queratinizadas y variar intensidad de tinción	Grandes, poligonales y polimorfos. Citoplasma basófilo Generalmente aisladas Núcleo pequeño Algunas células binucleadas, picnóticas o incluso sin núcleo Relación núcleo/citoplasma: 1/6	

Durante los experimentos realizados para el desarrollo del modelo animal de ojo seco se emplearon 9 cobayas creándose dos grupos, un grupo control y un grupo problema.

Las cobayas del grupo control, formado por 3 animales ($n = 6$ ojos), tanto en la primera fase de desarrollo del modelo como en la segunda fase de evaluación de la eficacia del tratamiento, recibieron dos veces al día en ambos ojos $10 \mu\text{L}$ de una solución isotónica de NaCl al 9‰. Mientras tanto, a las cobayas del grupo problema constituido por 6 animales ($n = 12$ ojos) se les sometió a diferentes pruebas a fin de inducir en ellas la enfermedad de ojo seco. Se emplearon las siguientes 3 técnicas:

- Incluir a los animales durante un periodo de 30 días dentro de una cámara climática con condiciones extremas de humedad relativa, temperatura y flujo de aire (modelo cámara climática de ambiente adverso).
- Instilación tópica ocular repetida durante un periodo de tiempo 30 días de una solución de cloruro de benzalconio al 0,1% (modelo BAC).
- Administración simultánea repetida durante un periodo de tiempo de 15 días de una solución de cloruro de benzalconio al 0,1% por vía tópica ocular e inyección subcutánea de Escopolamina (modelo BAC + Escopolamina).

Para la sujeción de las cobayas durante la realización de las pruebas clínicas anteriormente detalladas (osmolaridad lagrimal, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión celular), se envolvió al animal en un paño suave con el fin de conseguir su inmovilización pero sin someterlo a una situación intensa de estrés.

○ Modelo cámara climática de ambiente adverso

Este modelo animal de ojo seco está basado en someter al animal de experimentación a condiciones de sequedad ambiental durante 30 días. El ensayo se ha estructurado en dos partes, una primera parte en la que se evaluó el estado de la superficie ocular antes de iniciarse el tratamiento y una segunda parte en la que se desarrolló y caracterizó el modelo. La **Figura 14** muestra la distribución temporal del ensayo y los tiempos seleccionados para la realización de las pruebas clínicas que nos permiten caracterizar el modelo de ojo seco.

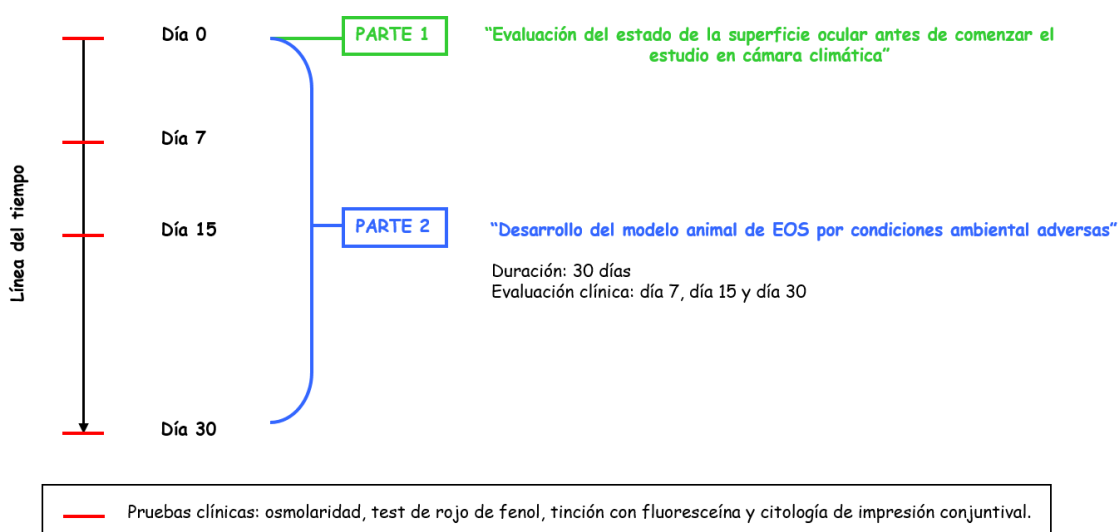


Figura 14: Organigrama utilizado para el desarrollo y caracterización de un modelo de ojo seco en cobayas inducido mediante condiciones climáticas adversas.

- *Parte 1:* "Evaluación del estado de la superficie ocular antes de iniciar el tratamiento".

El *status* de la superficie ocular se ha evaluado por las pruebas de osmolaridad lagrimal, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival.

- *Parte 2:* "Desarrollo del modelo animal de ojo seco inducido por condiciones climáticas adversas".

Esta parte del ensayo comienza el día 0 y termina el día 30. Para desarrollar la enfermedad de ojo seco, se ha introducido a las cobayas en una cámara climática cuyas condiciones de trabajo fueron de una humedad relativa inferior al 30%, temperatura de 30 °C y un flujo de aire entre 0,5 – 0,7 m/s (valor máximo que permite el equipo).

Para estudiar el desarrollo del modelo, se ha evaluado el estado de la superficie ocular al final de la primera, segunda y cuarta semana desde el inicio del tratamiento a través de los análisis de osmolaridad lagrimal, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival.

○ Modelo BAC

El desarrollo de un modelo animal de ojo seco basado en la administración tópica oftálmica de una solución de cloruro de benzalconio al 0,1% se debe a la acción tóxica que dicho compuesto tiene sobre la superficie ocular.

El ensayo ha tenido una duración de 30 días y se ha estructurado en dos partes, una primera parte en la que se evaluó el estado de la superficie ocular antes de iniciarse el tratamiento y una segunda parte en la que se desarrolló y caracterizó el modelo (**Figura 15**).



Figura 15: Organigrama utilizado para el desarrollo y caracterización de un modelo de ojo seco en cobayas inducido mediante la administración tópica oftálmica de una solución de BAC al 0,1%.

- *Parte 1: “Evaluación del estado de la superficie ocular antes de iniciar el tratamiento”.*

Se han realizado las pruebas anteriormente mencionadas de osmolaridad de la lágrima, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival.

- *Parte 2: “Desarrollo del modelo animal de ojo seco por la administración de BAC”.*

Esta parte del ensayo comienza el día 0 y termina el día 30. Para desarrollar la enfermedad de ojo seco, a las cobayas del grupo problema se les ha administrado dos veces al día (9:00 h y 18:00 h) en ambos ojos 10 μ L de BAC (Sigma-Aldrich Chemical Co., Madrid, España) al 0,1% en solución salina isotónica de NaCl³³⁷. La evaluación de la superficie ocular para hacer seguimiento del desarrollo del modelo se ha realizado mediante las pruebas clínicas anteriormente citadas a la primera, segunda y cuarta semana desde la fecha de inicio del tratamiento.

³³⁷ Xiong C, Chen D, Liu J, Liu B, Li N, Zhou Y, *et al.* A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(5):1850-6.

○ Modelo BAC + Escopolamina

El ensayo ha tenido una duración de 15 días y se ha estructurado en dos partes. La distribución temporal del ensayo y los tiempos seleccionados para la realización de las pruebas clínicas que nos permiten caracterizar el modelo de ojo seco desarrollado quedan recogidos en el siguiente organigrama (**Figura 16**).

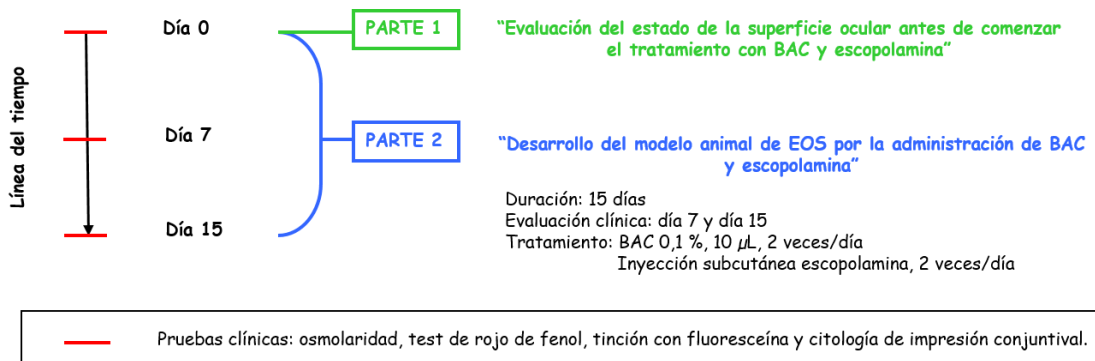


Figura 16: Organigrama utilizado para el desarrollo y caracterización de un modelo de ojo seco en cobayas inducido mediante la administración tópica oftálmica de una solución de BAC al 0,1% e inyecciones subcutáneas de Escopolamina.

- *Parte 1: “Evaluación del estado de la superficie ocular antes de iniciar el tratamiento”.*

Se han realizado las pruebas anteriormente mencionadas de osmolaridad lagrimal, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival.

- *Parte 2: “Desarrollo del modelo animal de ojo seco por la administración de BAC y escopolamina”.*

Esta parte del ensayo comienza el día 0 y termina el día 15. Para desarrollar la enfermedad de ojo seco, las cobayas del grupo problema han sido tratadas con BAC y Escopolamina. Al igual que en el anterior modelo, se les ha instilado 10 µL de la solución salina isotónica de NaCl con BAC al 0,1% en ambos ojos, dos veces al día (9:00 h y 18:00 h). Así mismo, por inyección subcutánea en la zona dorsal del animal, se les ha administrado 200 µL de una solución de Escopolamina de 7,5 mg/mL de concentración (Sigma-Aldrich Chemical Co., Madrid, España) dos veces al día (9:00 h y 18:00 h).

Para caracterizar el desarrollo del modelo de ojo seco se ha evaluado el estado de la superficie ocular de las cobayas a través de las pruebas clínicas anteriormente mencionadas (osmolaridad lagrimal, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival) a la semana y dos semanas después de haberse iniciado el tratamiento.

• Evaluación de la eficacia de FL-E_{con} en el modelo animal de la enfermedad de ojo seco

Tras generar la enfermedad de ojo seco en las cobayas Dunkin Hankley (modelo BAC), se ha evaluado la eficacia del preparado **FL-E_{con}** para, posteriormente, hacer seguimiento del estado de la superficie ocular de dichos animales tras 7 días sin tratamiento (**Figura 17**). En dicho estudio se emplearon 9 cobayas en el grupo problema y 3 cobayas como control, las cuales recibieron dos veces al día en ambos ojos 10 µL de una solución isotónica de NaCl al 9%.

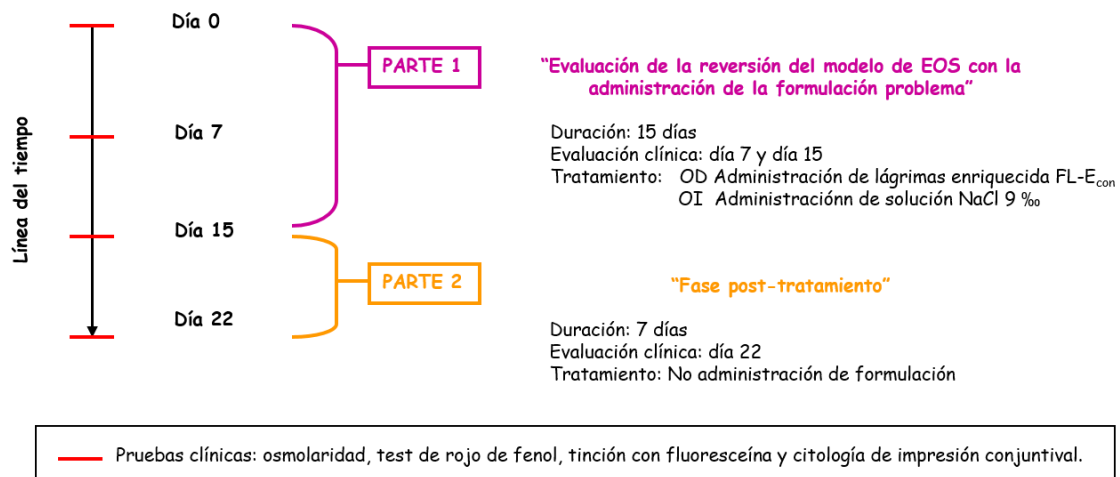


Figura 17: Organigrama utilizado para el desarrollo del ensayo de eficacia de la lágrima artificial enriquecida **FL-E_{con}** en el modelo animal de ojo seco inducido.

- *Parte 1:* "Evaluación de la reversión del modelo animal de la enfermedad de ojo seco con la administración de la formulación problema".

La eficacia de la formulación **FL-E_{con}** fue comparada con el efecto de una solución control. Para ello, a cada cobaya del grupo problema se le instiló con ayuda de una micropipeta ambos tratamientos, uno en cada ojo, durante un periodo de 15 días.

- o Ojo derecho (n = 6 ojos): instilación cuatro veces al día (9:00 h, 12:30 h; 15:30 h, 18:30 h) de 10 µL del preparado **FL-E_{con}**.
- o Ojo izquierdo (n = 6 ojos): instilación cuatro veces al día (9:00 h, 12:30 h; 15:30 h, 18:30 h) de 10 µL de la solución salina fisiológica NaCl al 9%.

Para caracterizar la reversión del modelo, se ha valorado el estado de la superficie ocular a los 7 y 15 días del inicio del estudio mediante las pruebas de osmolaridad, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival.

- *Parte 2:* "Fase post-tratamiento".

Comienza el día 15 y termina el día 22, no administrándose ningún tratamiento en ninguno de los ojos del animal. Al final de los 7 días, se ha evaluado el estado de la superficie ocular de las cobayas a través de las pruebas clínicas anteriormente citadas.

b) Ensayos de calidad de la visión en voluntarios sanos.

A fin de valorar la eficacia *in vivo* de la lágrima enriquecida **FL-E_{con}** en humanos, se ha realizado un ensayo clínico con 18 voluntarios sanos (n = 36 ojos).

El ensayo se ha diseñado de acuerdo con los requerimientos establecidos por la Declaración de Helsinki. Todos los participantes del ensayo fueron debidamente informados y firmaron el consentimiento informado correspondiente. Asimismo, se obtuvo un informe favorable por parte del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico San Carlos para la realización de este ensayo en voluntarios sanos (C.P. HCSC-USIO1-13 – C.I. 13/257-E).

Para valorar la tolerabilidad de la formulación desarrollada y su efecto en la salud de la superficie ocular y la calidad de la visión de los pacientes tratados se realizaron las siguientes pruebas clínicas, en el orden indicado, antes de la instilación de una gota de la lágrima artificial y a los 15 minutos, 1 hora y 2 horas después de su administración: evaluación subjetiva tras la instilación de la formulación ensayada, medición de la osmolaridad, determinación de la calidad óptica del ojo, análisis del tiempo de ruptura precorneal, estudio de la capa lipídica de la película lagrimal e hiperemia ocular y tinción con fluoresceína.

- *Evaluación subjetiva*

Tras la instilación del preparado, se preguntó a los pacientes por la sensación apreciada, valorándose la aparición de efectos adversos tales como picor o molestias oculares.

- *Estudio de la osmolaridad lagrimal*

La osmolaridad lagrimal se ha determinado según se describe en el apartado 3.5.1.

- *Determinación de la calidad óptica del ojo*

La calidad visual es cuantificable y objetivable a través del denominado índice de dispersión ocular (Oqas Scattering Index, OSI en sus siglas en inglés), medible por el equipo OQAS (Optical Quality Analysis system, Visiometrics S.L, Tarrasa, España).

La técnica se basa en la emisión de luz por un láser infrarrojo de 780 nm, filtrado y colimado, formándose una imagen sobre la retina del individuo. Al reflejarse en ésta, la luz cruza dos veces el medio ocular y un algoritmo analiza el tamaño y la forma del punto de luz reflejado. De este modo se obtiene información acerca de la calidad óptica del ojo a través de la medición del grado de intensidad y de resolución de la imagen, detectándose posibles aberraciones de orden superior u otras alteraciones.

Los valores de OSI se encuentran comprendidos entre 0 y 25. Valores próximos a 1 indican una buena calidad óptica. En cambio, valores mayores de 5 se relacionan con sistemas altamente dispersos en donde la calidad óptica del ojo está alterada.

- *Análisis del tiempo de ruptura precorneal*

El tiempo de ruptura de la película lagrimal (tear break up time, BUT por su siglas en inglés) se define como el intervalo de tiempo transcurrido entre un parpadeo y la aparición de un islote de desecación en la superficie corneal indicativo de la rotura de la película³³⁸. Valores de BUT inferiores a 10 segundos se relacionan con la presencia de una película lagrimal inestable^{339,340}.

Los inconvenientes de este parámetro de medida son su alta variabilidad y baja repetibilidad. Para obtener resultados más fiables, se ha empleado un equipo de medición topográfica Oculus Keratograph 5 (Oculus, Wetzlar, Alemania) además de fijar otras variables como son la concentración de fluoresceína empleada, el volumen de solución instilado y el tiempo de latencia tras la instilación.

A cada tiempo de estudio se instila en el fondo del saco conjuntival una gota de la solución oftálmica Colircusi Fluotest® (Alcon Cusi S.A., Barcelona, España) con fluoresceína a una concentración de 20 mg/mL. Después de unos segundos, el paciente sitúa la barbilla en la mentonera del topógrafo, parpadea 3 veces para, posteriormente, mantener el ojo abierto el mayor tiempo posible. La visualización de los islotes de desecación se realiza usando luz difusa azul de cobalto. El punto o línea de desecación aparece con un tono negro-azulado sobre el film lagrimal teñido de un color verde.

- *Estudio de la capa lipídica de la película lagrimal e hiperemia ocular*

El topógrafo Oculus Keratograph 5, además de determinar el BUT, es capaz de realizar un amplio número de exploraciones entre las que destaca la cuantificación del grado de hiperemia conjuntival y la evaluación dinámica de la capa lipídica de la película lagrimal mediante la técnica de reflexión de los discos de Plácido.

Hasta el momento, la valoración del grado de hiperemia conjuntival era subjetiva pasando a ser objetivable gracias al uso este topógrafo, al ser capaz de detectar los vasos de la conjuntiva, evaluar el grado de enrojecimiento y clasificar los resultados obtenidos en función de una escala creciente con valores comprendidos entre 0 y 4, coincidiendo el valor mínimo de 0 con la ausencia de hiperemia.

- *Tinción con fluoresceína*

Para la prueba de tinción con fluoresceína (Colircusi Fluotest®) ha seguido el procedimiento descrito en el apartado. 3.5.1.

³³⁸ Kallarackal GU, Ansari EA, Amos N, Martin JC, Lane C, Camilleri JP. A comparative study to assess the clinical use of fluorescein meniscus time (FMT) with tear break up time (TBUT) and Schirmer's tests (ST) in the diagnosis of dry eyes. *Eye*. 2002;16(5):594-600.

³³⁹ Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol*. 2001;45 Suppl 2:221-6.

³⁴⁰ Vico E, Quereda A, Benítez-Del-Castillo JM, Fernández Pérez C, García-Sánchez J. Estudio comparativo entre el hialuronato sódico al 0,15% y el alcohol polivinílico como tratamiento para el ojo seco. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2005;80(7):387-94.

4.5.2. Ensayos de eficacia *in vivo* realizados con la formulación liposomal FL-C_{sA}_{con}

La eficacia de la formulación liposomal con Ciclosporina al 0,1% (FL-C_{sA}_{con}) se ha valorado en perros, a través de un ensayo clínico observacional de un mes de duración en el que participaron un total de 6 perros diagnosticados con la enfermedad de ojo seco.

Los propietarios autorizaron la participación de sus mascotas en el estudio mediante un consentimiento informado. Los ensayos se han realizado en el Hospital Clínico Veterinario de la UCM con la colaboración de veterinarios expertos en superficie ocular que pertenecen a nuestro grupo de investigación (UCM n.º 920415).

Para evaluar la eficacia de la formulación liposomal ensayada, los perros fueron sometidos una exploración oftalmológica antes de comenzar el estudio (día 0) y 30 días después de haberse iniciado el tratamiento (día 30). Durante la exploración oftalmológica se ha valorado el estado de la conjuntiva y córnea de los pacientes y la producción lagrimal por el test de Schirmer, además de tomarse fotografías de la superficie ocular de todos los animales a los dos tiempos estudiados.

- *Exploración oftalmológica:*

Durante la exploración oftalmológica se ha valorado el estado de la conjuntiva y córnea de cada perro.

A nivel de la conjuntiva se observa el grado de secreción (aparición y tipo) y la existencia de hiperemia tanto bulbar como palpebral. Los criterios de clasificación se recogen en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Sistema de graduación de la exploración oftalmológica en conjuntiva para el estudio de la eficacia *in vivo* de la formulación FL-C_{sA}_{con} en perros con ojo seco.

Grado	Secreción	Hiperemia bulbar y palpebral
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

En cambio, en la exploración corneal se valora la presencia de (1) opacidad y (2) la integridad del epitelio corneal.

La opacidad corneal depende de:

- Número de neovasos o troncos vasculares que cruzan el limbo corneal.
- Cantidad de superficie inflamada al dividir la córnea en 8 sectores circulares partiendo desde el centro de la misma, en donde un 1/8 de la superficie equivale al 12,5% del área corneal (**Figura 18**).
- Cantidad de superficie pigmentada al dividir la córnea en 4 sectores circulares partiendo desde el centro de la misma, en donde un 1/4 de la superficie representa el 25% del área corneal. (**Figura 18**).

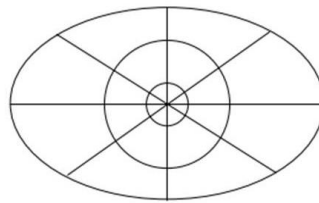


Figura 18: Representación gráfica de la división en sectores circulares de la superficie corneal.

Para la evaluación de la integridad del epitelio corneal se utiliza una solución oftálmica con fluoresceína sódica al 2% (Colircusi Fluoresceína®). Los resultados de esta prueba junto con los de la opacidad corneal permiten establecer el sistema de graduación recogido en la **Tabla 11**.

Tabla 11: Sistema de graduación de la exploración oftalmológica en córnea para el estudio de la eficacia in vivo de la formulación **FL-CsA** con perros con ojo seco.

Grado	Opacidad corneal			Integridad del epitelio corneal
	Troncos vasculares	Infiltrado inflamatorio	Pigmentación	
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	1-5	Infiltrado leve o moderado < 1/8 de la superficie ocular	Afectada del 1-25 % de la córnea (superficie ≤ sector circular de 1/4)	Algunos puntos de retención de fluoresceína
2	6-10	Infiltrado marcado > 1/8 de la superficie ocular	Afectada 26-50 % la córnea (superficie equivalente a un sector circular entre 1/4 y 1/2)	Muchos puntos de retención de fluoresceína
3	> 10	-	Afectada > 50 % la córnea (superficie > sector circular de 1/2)	Tinción de la mayor parte de la córnea

- *Test de Schirmer:*

El método empleado más habitualmente para la medición de la producción lagrimal es el test de Schirmer.

En la realización de la prueba se han empleado tiras de papel de filtro (Schering Ploughy, Madrid, España) de 5 mm de ancho y 25 mm de largo, que llevan incorporado un tinte azul para que cuando la lágrima sea absorbida se tiña la escala optimizándose la lectura por contraste.

Un primer paso es doblar la tira 5 mm por el extremo que tiene los bordes recortados procurando no tocarla directamente con los dedos para no dejar restos lipídicos en el papel que puedan interferir con la absorción de la lágrima. Posteriormente, antes de su uso, se retira suavemente el exceso de secreción del margen del párpado inferior del paciente para, finalmente, insertar la tira en el saco conjuntival inferior, entre el tercio medio y el exterior del párpado (**Figura 19**). La tira ha de permanecer insertada durante 1 minuto procurando que el ojo del animal permanezca cerrado mientras la prueba.



Figura 19: Representación gráfica del test de Shirmer.

Es necesario indicar que dicha prueba se ha realizado sin la aplicación de anestesia en la superficie ocular.

Los valores normales en perros para el test de Schirmer sin la administración de anestesia se encuentran entre $20 \pm 4 \text{ mm min}^{-1}$. Valores inferiores a 10 mm min^{-1} se relacionan con la presencia de alteraciones en la superficie ocular³⁴¹.

³⁴¹ Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitation. *Exp Res Eye.* 2004;79(5):613-21.

5. RESULTADOS

5.1.MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE ACTIVOS

5.1.1. Cuantificación de la vitamina E por HPLC

El método de cuantificación de vitamina E por HPLC se ha validado según los procedimientos descritos en el apartado 3.2.1 para posteriormente determinar el contenido de vitamina E en muestras de dispersión acuosa liposomal sin polímero.

a) Linealidad

Para evaluar la linealidad del método de cuantificación de vitamina E se analizaron 6 muestras patrón con diferente concentración de vitamina E (2,5; 5; 10; 20; 30 y 40 $\mu\text{g/mL}$), repitiéndose dicho análisis 3 veces en 3 días distintos. Los resultados de áreas obtenidos en los ensayos de linealidad se recogen en la **Tabla 12** y la **Figura 20**, y los correspondientes parámetros de regresión lineal en la **Tabla 13**.

Tabla 12: Unidades de área obtenidas en el protocolo de linealidad de la vitamina E.

Concentración Vit E en muestras patrón ($\mu\text{g/mL}$)	Unidades de área		
	Día 1	Día 2	Día 3
2,5	2675131	2581529	2590297,5
5	5106430	5192794,5	5091306,5
10	10566125	11036096,5	10541662,5
20	18347471	19972103	20618855
30	29181852	28205901	31309241
40	40179369	39248274	39849019,5

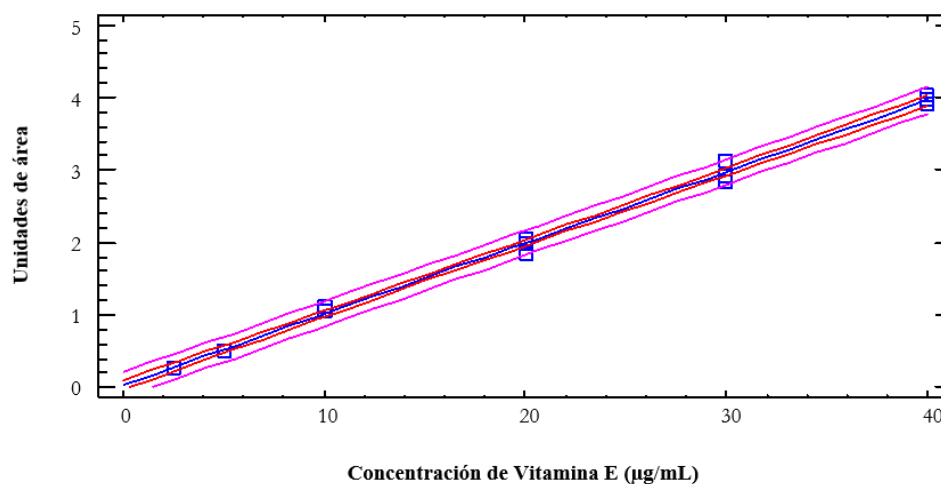


Figura 20: Resultados obtenidos en el protocolo de linealidad para la cuantificación de la vitamina E.

En todos los ensayos realizados, la ordenada en el origen no ha sido significativamente (N.S.) distinta de cero (test t-Student: p-valor $\geq 0,05$) demostrándose, por tanto, que el método es proporcional. Los resultados obtenidos indican que existe una regresión altamente significativa (A.S.) entre unidades de área y concentración (test ANOVA: p-valor $< 0,001$). Por tanto, se puede concluir que el método es lineal y proporcional en el intervalo de concentraciones ensayado.

Tabla 13: Parámetros de regresión lineal obtenidos en el protocolo de linealidad para la vitamina E.

	Día 1	Día 2	Día 3
Ordenada	49966,7	604659,0	304622,0
Pendiente	983782,0	954500,0	1.006.260
Coefficiente de determinación (r^2)	0,996	0,997	0,999
Comparación de la ordenada al origen con cero (Test t-Student)	p-valor = 0,938 N.S.	p-valor = 0,308 N.S.	p-valor = 0,481 N.S.
Existencia de pendiente (Test de Fisher)	p-valor $< 0,001$ A.S.	p-valor $< 0,001$ A.S.	p-valor $< 0,001$ A.S.

Para calcular la relación unidades de área-concentración en cada serie, se utilizan dos muestras patrones de diferente concentración, 5 $\mu\text{g/mL}$ y 30 $\mu\text{g/mL}$, y el valor teórico de cero.

b) Exactitud y precisión

Para evaluar la exactitud y precisión del método se han elegido dos niveles de concentración, 5 $\mu\text{g/mL}$ y 30 $\mu\text{g/mL}$. Se analizaron 6 muestras independientes de cada concentración en 3 días diferentes. Los datos obtenidos se expresan en porcentaje de recuperación (**Tabla 14**) y se representan en la **Figura 21**.

Tabla 14: Porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio de exactitud y precisión de la vitamina E.

Concentración Vit E en muestras patrón ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperación		
	Día 1	Día 2	Día 3
5	103,5	104,3	98,7
	100,3	102,6	101,9
	99,7	103,0	101,9
	104,5	104,0	101,5
	99,3	99,8	99,1
	98,3	99,4	97,6
30	94,9	101,4	99,7
	95,7	100,2	97,1
	97,3	96,7	104,4
	95,9	97,0	105,8
	105,1	103,2	100,7
	95,7	100,2	99,6

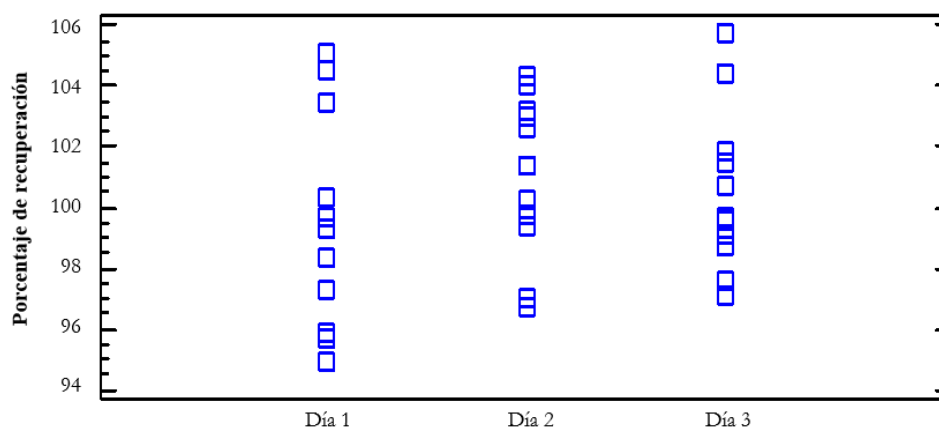


Figura 21: Porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio de exactitud y precisión de la vitamina E.

Al analizar la influencia de los factores “día” y “concentración” en los datos obtenidos se puede apreciar que ninguno de ellos influye de forma estadísticamente significativa en los porcentajes de recuperación obtenidos para un nivel de confianza del 95% (test ANOVA: p-valor = 0,275 y p-valor = 0,104, respectivamente). Por esta razón, se puede considerar que todos los valores pertenecen a un conjunto homogéneo y calcular un valor promedio representativo de exactitud (**Tabla 15**).

Tabla 15: Recuperación promedio e intervalo de confianza obtenidos en el ensayo de exactitud de la vitamina E.

Recuperación promedio (%)	Intervalo de confianza 95% (%)
100,3	99,3 – 101,3

En base a los resultados incluidos en la **Tabla 15**, el método se considera exacto a los dos niveles de concentración estudiados ya que el error asociado es inferior al $\pm 3\%$.

En cuanto a la precisión se consideran los datos de ambas concentraciones como un único conjunto. En la **Tabla 16** se recogen los coeficientes de variación obtenidos para la repetibilidad y precisión intermedia y se puede comprobar que ambos son inferiores al 3%.

Tabla 16: Resultados obtenidos en el estudio de precisión del método de cuantificación de la vitamina E.

CV Repetibilidad (%)	CV Precisión intermedia (%)
2,9	2,95

5.1.2. Cuantificación de vitamina C por HPLC

El método de cuantificación de vitamina C, añadida en forma de sal trisódica 2-fosfoascórbica (SAP), por HPLC se ha validado según los procedimientos descritos en el apartado 3.2.2 para posteriormente determinar la cantidad de vitamina C en muestras de dispersión liposomal, sin la presencia de polímero.

a) Linealidad

Para determinar la linealidad del método de cuantificación de SAP se analizaron 6 muestras patrón con diferente concentración de SAP (1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 y 15 $\mu\text{g/mL}$) realizándose dicho análisis por triplicado (un análisis por día). En la **Tabla 17** y la **Figura 22** se recogen los datos de áreas obtenidos en los ensayos de linealidad y en la **Tabla 18** los correspondientes a los parámetros de regresión lineal.

Tabla 17: Unidades de área obtenidas en el protocolo de linealidad del SAP.

Concentración SAP en muestras patrón ($\mu\text{g/mL}$)	Unidades de área		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	306925	315573,5	349423
2,5	764241	830072,5	742975
5	1714193	1581955	1634998,5
7,5	2576780	2703827,5	2486611,5
10	3458116	3305867,5	3159558
12,5	4203560,5	3939176	4030078,5
15	5165334,5	5068295,5	4846496,5

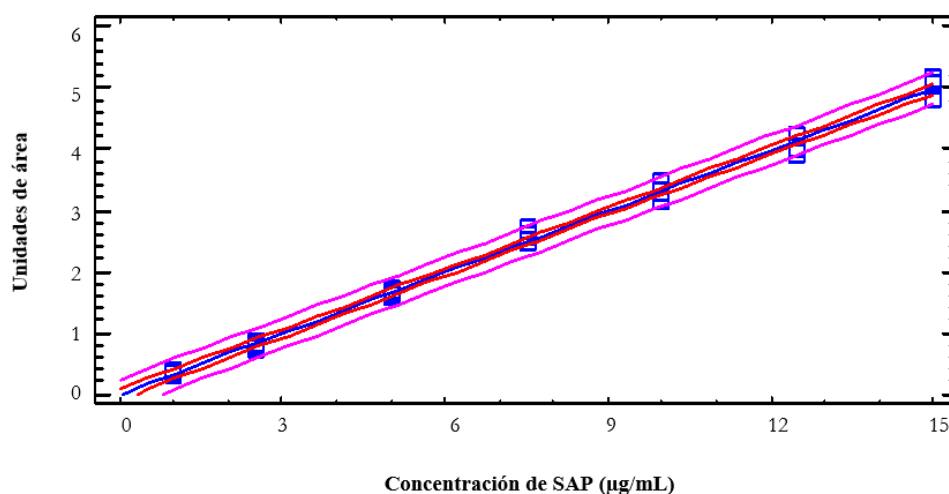


Figura 22: Resultados obtenidos en el protocolo de linealidad para la cuantificación del SAP.

En todos los ensayos, la ordenada en el origen no ha sido significativamente distinta de cero (test t-Student: p-valor $\geq 0,05$). Además, los resultados obtenidos indican una regresión altamente significativa (test ANOVA: p-valor $< 0,001$) entre unidades de área y concentración. Por tanto, el método es lineal y proporcional en el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla 18: *Parámetros de regresión lineal obtenidos en el protocolo de linealidad para el SAP.*

	Día 1	Día 2	Día 3
Ordenada	-48182,2	3394,3	261,0
Pendiente	346288	331234,0	322398,0
Coefficiente de determinación (r^2)	0,999	0,993	0,999
Comparación de la ordenada al origen con cero (Test t-Student)	p-valor = 0,238 N.S.	p-valor = 0,975 N.S.	p-valor = 0,995 N.S.
Existencia de pendiente (Test de Fisher)	p-valor $< 0,001$ A.S.	p-valor $< 0,001$ A.S.	p-valor $< 0,001$ A.S.

Para calcular la relación unidades de área-concentración en cada serie ensayada, se han utilizado dos muestras patrones, 5 $\mu\text{g/mL}$ y 12,5 $\mu\text{g/mL}$, y el valor teórico de cero.

b) Exactitud y precisión

En los estudios de exactitud y precisión del método se han evaluado 6 muestras independientes de cada nivel de concentración seleccionado (5 $\mu\text{g/mL}$ y 12,5 $\mu\text{g/mL}$) en 3 días diferentes. Los resultados obtenidos se expresan en porcentaje de recuperación (**Tabla 19**) y se representan en la **Figura 23**.

Tabla 19: *Porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio de exactitud y precisión del SAP.*

Concentración SAP en muestras patrón ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperación		
	Día 1	Día 2	Día 3
5	99,8	102,3	99,7
	100,5	103,7	100,8
	102,6	98,5	100,6
	102,8	96,3	103,6
	99,8	102,7	101,6
	97,9	101,1	98,5
12,5	99,7	103,2	104,0
	98,4	104,8	102,5
	101,7	98,9	99,7
	101,5	97,6	102,6
	98,1	102,3	100,4
	98,4	100,8	100,1

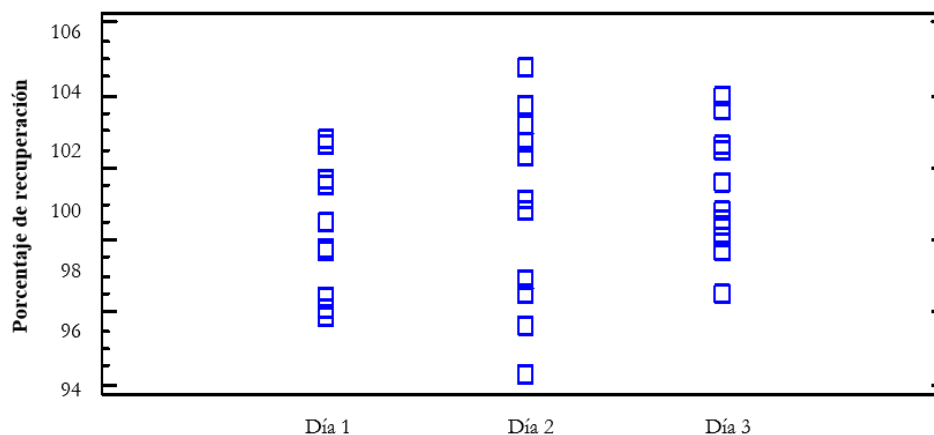


Figura 23: Porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio de exactitud y precisión del SAP.

Al analizar la influencia de los factores “día” y “concentración” en los resultados obtenidos, se puede apreciar que ninguno de ellos influye de forma significativa en el porcentaje de recuperación para un nivel de confianza del 95% (test ANOVA: p-valor = 0,880 y p-valor = 0,215, respectivamente). Por esta razón, se puede calcular un valor promedio representativo de exactitud (**Tabla 20**).

Tabla 20: Recuperación promedio e intervalo de confianza obtenidos en el ensayo de exactitud del SAP.

Recuperación promedio (%)	Intervalo de confianza al 95% (%)
100,8	100,1 – 101,2

En base a los resultados recogidos en la **Tabla 20**, el método se considera exacto ya que el error asociado es inferior al $\pm 3\%$.

Para el cálculo de la precisión se consideran los datos de ambas concentraciones como un conjunto único. En la **Tabla 21** se recogen los coeficientes de variación obtenidos para la repetibilidad y precisión intermedia y se puede comprobar que ambos son inferiores al 3%.

Tabla 21: Resultados obtenidos en el estudio de precisión del método de cuantificación del SAP.

CV Repetibilidad (%)	CV Precisión intermedia (%)
2,0	2,1

5.1.3. Cuantificación de Ciclosporina A por HPLC

El método de cuantificación de Ciclosporina A por HPLC se ha realizado según los procedimientos descritos en el apartado 3.2.3 para posteriormente determinar la cantidad de Ciclosporina A en muestras de dispersión acuosa liposomal sin polímero.

a) Linealidad

De acuerdo con lo indicado en el apdo. 3.2.3, para determinar la linealidad del método de cuantificación se analizaron 6 muestras patrón con diferente concentración de Ciclosporina A (50, 100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g/mL}$). Dicho ensayo se realizó 3 veces en 3 días distintos. Los resultados de áreas obtenidos en los ensayos de linealidad se recogen en la **Tabla 22** y la **Figura 24**, y los correspondientes parámetros de regresión lineal en la **Tabla 23**.

Tabla 22: Unidades de área obtenidas en el protocolo de linealidad de la Ciclosporina A.

Concentración CsA en muestras patrón ($\mu\text{g/mL}$)	Unidades de área		
	Día 1	Día 2	Día 3
50	2055402,5	2114374,5	2038335
100	4370061	4295157	4291001
150	6530100,5	6492901,5	6423699,5
200	8650496,5	8573194,5	8146285,5
250	11116166,5	10846953	10156773,5
300	12788895,5	12753727	12372226,5

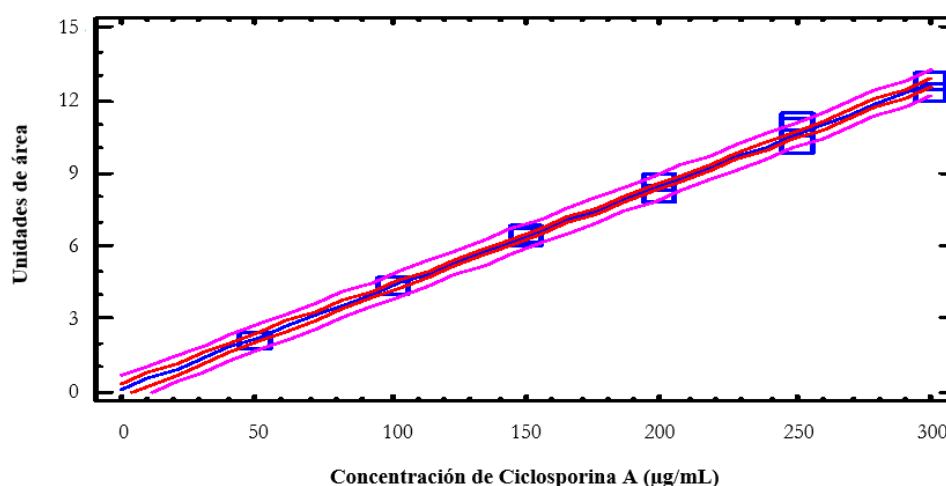


Figura 24: Resultados obtenidos en el protocolo de linealidad para la cuantificación de la Ciclosporina A.

En todos los ensayos realizados, la ordenada en el origen no ha sido significativamente distinta de cero (test t-Student: p-valor $\geq 0,05$). Además, existe regresión altamente significativa entre unidades de área y concentración (test ANOVA: p-valor $< 0,001$). Por ello, se considera que el método es lineal y proporcional en el intervalo de concentraciones ensayado.

Tabla 23: Parámetros de regresión lineal obtenidos en el protocolo de linealidad para la Ciclosporina A.

	Día 1	Día 2	Día 3
Ordenada	-17430,7	19473,6	139117
Pendiente	43443,5	42818,5	40565,3
Coefficiente de determinación (r^2)	0,998	0,999	0,998
Comparación de la ordenada al origen con cero (Test t-Student)	p-valor = 0,925 N.S.	p-valor = 0,827 N.S.	p-valor = 0,390 N.S.
Existencia de pendiente (Test de Fisher)	p-valor $< 0,001$ A.S.	p-valor $< 0,001$ A.S.	p-valor $< 0,001$ A.S.

Para calcular la relación unidades de área-concentración se han utilizado dos muestras patrones, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$, y el valor teórico de cero.

b) Exactitud y precisión

Para evaluar la exactitud y precisión del método se han elegido dos niveles de concentración, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$, y se han evaluado 6 muestras independientes de cada una de ellas en 3 días diferentes. Los resultados obtenidos en los estudios de exactitud y precisión, expresados en porcentaje de recuperación, se recogen en la **Tabla 24** y su representación gráfica se incluye en la **Figura 25**.

Tabla 24: Porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio de exactitud y precisión de la CsA.

Concentración CsA en muestras patrón ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperación		
	Día 1	Día 2	Día 3
100	98,6	102,6	100,8
	99,3	101,4	98,9
	100,9	99,6	104,4
	98,2	100,6	99,3
	103,7	101,6	101,0
	101,6	100,2	101,1
250	98,9	97,1	98,7
	97,4	99,9	101,6
	102,8	100,9	100,3
	98,5	101,2	99,9
	98,8	100,0	101,6
	97,4	99,9	99,1

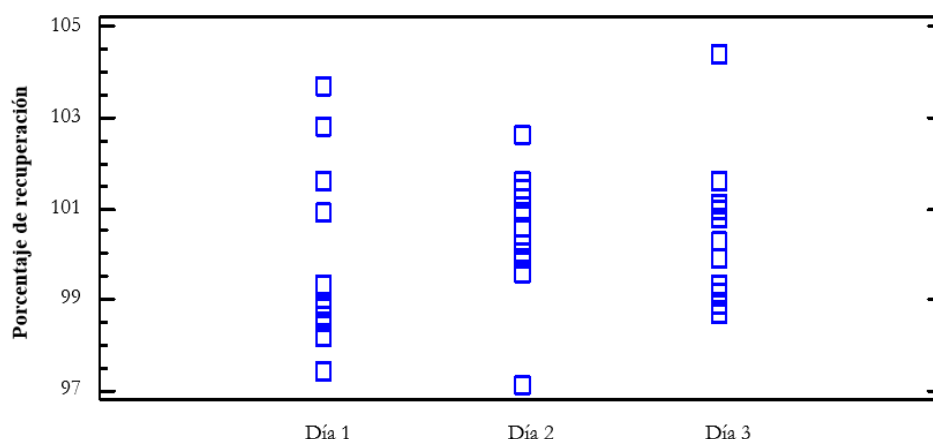


Figura 25: Porcentajes de recuperación obtenidos en el estudio de exactitud y precisión de la CsA.

Al analizar la influencia de los factores “día” y “concentración” en los resultados obtenidos, se puede apreciar que ninguno de estos dos factores tienen efecto estadísticamente significativo en el porcentaje de recuperación para un nivel de confianza del 95% (test ANOVA: p-valor = 0,374 y p-valor = 0,052, respectivamente). Por esta razón, se puede calcular un valor promedio representativo de exactitud (**Tabla 25**).

Tabla 25: Recuperación promedio e intervalo de confianza obtenidos en el ensayo de exactitud de la CsA.

Recuperación promedio (%)	Intervalo de confianza 95% (%)
100,2	99,6 – 100,8

En base a los resultados incluidos en la **Tabla 25**, el método es considerado exacto a los dos niveles de concentración estudiados, ya que el error asociado es inferior al $\pm 3\%$.

En cuanto a la precisión los resultados de ambas concentraciones se consideran como un conjunto único. En la **Tabla 26** se recogen los coeficientes de variación obtenidos para la repetibilidad y precisión intermedia y se puede comprobar que ambos son inferiores al 3%.

Tabla 26: Resultados obtenidos en el estudio de precisión del método de cuantificación de la CsA.

CV Repetibilidad (%)	CV Precisión intermedia (%)
1,7	1,7

5.2.FORMULACIÓN LIPOSOMAL BLANCO O VEHÍCULO BASE

Los pacientes con la enfermedad de ojo seco presentan diversos problemas oculares derivados de la alteración de la película lagrimal. Uno de los tratamientos empleados en los diferentes estadios de la enfermedad es el uso de lágrimas artificiales, sin embargo, no existe ninguna formulación en el mercado cuyos componentes se asemejen completamente a los de la película precorneal.

Dentro de la línea de trabajo dedicada a la enfermedad de ojo seco del grupo de investigación “Innovación, terapia y desarrollo farmacéutico en oftalmología”, se diseñan y desarrollan sustitutos lagrimales que permiten la reposición de la película lagrimal tomando como referencia los constituyentes de la lágrima natural y sus características fisicoquímicas. Así mismo, se acomete el desarrollo de formulaciones medicamentosas teniendo en cuenta la sintomatología propia de dicha patología, tales como la inflamación y la presencia de sustancias inmunes.

Entre las formulaciones de administración tópica oftálmica elaboradas por este grupo de investigación, demostró ser eficaz la lágrima artificial desarrollada por Vicario-de-la-Torre M. *et al.*³⁴² De hecho, dicha formulación ha sido objeto de patentes española, europea y americana concedidas en el año 2008³⁴³, 2015³⁴⁴ y 2017³⁴⁵, respectivamente.

El sustituto lagrimal diseñado consiste en una dispersión acuosa liposomal que incluye componentes hidrofílicos y lipofílicos semejantes a los presentes en la lágrima natural.

Cómo principales componentes de las vesículas lipídicas se emplean sustancias hidrofóbicas y anfifílicas, en concreto, fosfatidilcolina (10 mg/mL) y colesterol. Su presencia mejora la extensibilidad de la lágrima artificial sobre la superficie ocular durante el parpadeo y ayuda a estabilizar la película precorneal. Debido al carácter anfifílico de los componentes seleccionados, tras la instilación del preparado, los lípidos de las vesículas liposomales se incorporan a la fase lipídica de la película precorneal orientándose de acuerdo con sus características hidrofílicas-lipofílicas. Así mismo, la formulación incluye vitamina E, la cual, gracias a su actividad antioxidante, evita la oxidación de las cadenas grasas insaturadas de la fosfatidilcolina y colesterol que estabilizan la estructura de las vesículas liposomales.

³⁴² Vicario de la Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome de ojo seco. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2011.

³⁴³ Molina Martínez IT, Vicario de la Torre M, Benítez del Castillo JM, Vico Ruiz E, Herrero Vanrell R. Formulación de vesículas liposomales en soluciones acuosas con características de película lagrimal. N° publicación: 2284398 y fecha de publicación 16-12-2008.

³⁴⁴ Molina Martínez IT, Vicario de la Torre M, Benítez del Castillo JM, Vico Ruiz E, Herrero Vanrell R. Formulation of liposomal vesicles in aqueous solutions with tear film characteristics EP 2.016.937 B1. Publicada: 21-01-2015.

³⁴⁵ Herrero Vanrell R, Benítez del Castillo JM, Vico Ruiz E, Vicario de la Torre M, Molina Martínez IT. Formulation of liposomal vesicles in aqueous solutions with tear film characteristics US 9539002. Publicada: 10-01-2017.

La lágrima artificial desarrollada por Vicario-de-la-Torre M. *et al.*, también contiene hialuronato sódico al 0,2% cuya función es similar a la de las mucinas presentes en el film lagrimal. Este polímero bioadhesivo, es capaz de interactuar con las mucinas de la película lagrimal, formando una especie de hidrogel que evita la evaporación de la lágrima. A la concentración que se ha utilizado hasta ahora, el hialuronato sódico respeta la extensibilidad de la película precorneal y el adecuado parpadeo parpebral.

5.2.1. Diseño de las formulaciones liposomales blanco o vehículos base

A partir de la lágrima anteriormente comentada, en este proyecto doctoral se ha desarrollado un nuevo vehículo base en el cuál incluir osmoprotectores, sustancias reguladoras de la proliferación y diferenciación del epitelio corneal, antioxidantes, y/o agentes antiinflamatorios, a fin de obtener diferentes tipos de preparados lagrimales destinados al tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

Para que dicho vehículo basal pudiera incluir en la estructura liposomal las diversas sustancias anteriormente indicadas, ha sido necesario incrementar la concentración de vesículas portadoras. Así mismo, se ha tenido en cuenta que para que un preparado artificial pueda emular las características fisicoquímicas de la lágrima natural hay que añadir otros compuestos que regulen su pH, osmolaridad, tensión superficial y viscosidad.

El ajuste de pH se realizó con un tampón de boratos. Al contrario de lo que sucede con los tampones fosfatos, los cuales precipitan en presencia de calcio³⁴⁶, los boratos tienen la ventaja de no producir efectos secundarios. Además, presentan cierta actividad conservante³⁴⁷ siendo útil su uso en formulaciones destinadas al tratamiento de patologías crónicas, y en especial en el caso de la enfermedad de ojo seco, en donde es indispensable la ausencia de conservantes (como el BAC) por la toxicidad que estas moléculas producen sobre la superficie ocular.

A la hora de ajustar la osmolaridad de la lágrima artificial es necesario tener en cuenta que los pacientes con ojo seco muestran una lágrima hiperosmolar. Las consecuencias de presentar una lágrima hiperosmolar son daños directos y/o indirectos en la superficie ocular tales como molestias e irritación ocular, alteraciones en las células epiteliales e inflamación. De ahí que en los últimos años se haya incrementado el número de lágrimas artificiales hipoosmolares comercializadas para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco cuyo fin es reestablecer el equilibrio fisiológico de isotonicidad en la lágrima natural de dichos pacientes. El restablecimiento de la isotonicidad lagrimal induce la disminución de agentes proinflamatorios

³⁴⁶ Bernauer W, Thiel MA, Kurrer M, Heiligenhaus A, Rentsch KM, Schmitt A, *et al.* Corneal calcification following intensified treatment with sodium hyaluronate artificial tears. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(3):285-8.

³⁴⁷ Houlisby RD, Ghajar M, Chavez GO. Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29(5): 803-6.

presentes en condiciones de hiperosmolaridad lagrimal³⁴⁸. Para la lágrima enriquecida diseñada se ha establecido una osmolaridad alrededor de 190 – 200 mOsm/L encontrándose dentro del intervalo 150 – 316 mOsm/L³⁴⁹ recomendado para formulaciones de uso oftálmico.

Enfatizando la importancia que tiene de la osmolaridad lagrimal sobre el estado de las células de la superficie ocular, el vehículo basal incluye trehalosa como agente osmoprotector ya que, además de presentar propiedades osmoprotectoras^{350,351,352,353,354}, evita la apoptosis celular y favorece la regeneración del epitelio ocular³⁵⁵ y muestra capacidad antioxidante y antiinflamatoria^{356,357}.

Para el ajuste de la tensión superficial y viscosidad de un preparado lagrimal, es suele recurrir al uso de polímeros bioadhesivos. Al igual que en la lágrima artificial desarrollada por Vicario-de-la-Torre M. *et al*, se ha elegido al hialuronato sódico como polímero bioadhesivo ya que, además de presentar características mucoadhesivas que prolongan el tiempo de permanencia y mejoran la lubricación de la superficie ocular, presenta propiedades antiinflamatorias, propiedades regenerativas y cicatrizantes muy útiles en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco^{358,359,360,361}.

En la mucoadhesión de un polímero pueden influir diferentes factores, entre ellos la concentración de polímero empleada³⁶². De hecho, para aumentar el tiempo de contacto de un preparado lagrimal con la superficie ocular se tiende a incrementar la concentración de polímero añadido. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que, a ciertas cantidades, se puede provocar irritación, visión borrosa y sensación pegajosa y de parpadeo pesado.

³⁴⁸ Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(4):369-74.

³⁴⁹ Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(10):4309-15.

³⁵⁰ Matsuo T. Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(5): 610-2.

³⁵¹ Corrales RM., Luo L, Chang EY, Pflugfelder SC. Effect of osmoprotectants on hyperosmolar stress in cultured human corneal epithelial cells. *Cornea*. 2008;27(5):574-9.

³⁵² Matsuo T, Tsuchida Y, Morimoto N. Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome. *Ophthalmology*. 2002;109(11):2024-9.

³⁵³ Matsuo T. Trehalose versus hyaluronan or cellulose in eyedrops for the treatment of dry eye. *Jpn J Ophthalmol*. 2004;48(4):321-7.

³⁵⁴ Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(4):312-34.

³⁵⁵ Chen W, Zhang X, Liu M, Zhang J, Ye Y, Lin Y, *et al*. Trehalose protects against ocular surface disorders in experimental murine dry eye through suppression of apoptosis. *Exp Eye Res*. 2009;89(3):311-8.

³⁵⁶ Cejková J, Ardan T, Cejka C, Luyckx J. Favorable effects of trehalose on the development of UVB-mediated antioxidant/prooxidant imbalance in the corneal epithelium, proinflammatory cytokine and matrix metalloproteinase induction, and heat shock protein 70 expression. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(8):1185-94.

³⁵⁷ Li J, Roubeix C, Wang Y, Shi S, Liu G, Baudouin C, *et al*. Therapeutic efficacy of trehalose eye drops for treatment of murine dry eye induced by an intelligently controlled environmental system. *Mol Vis*. 2012;18:317-29.

³⁵⁸ Gomes JAP, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(6):821-5.

³⁵⁹ Camillieri G, Bucolo C, Rossi S, Drago F. Hyaluronan-induced stimulation of corneal wound healing is a pure pharmacological effect. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2004;20(6):548-53.

³⁶⁰ Yang G, Espandar L, Mamalis N, Prestwich GD. A cross-linked hyaluronan gel accelerates healing of corneal epithelial abrasion and alkali burn injuries in rabbits. *Vet Ophthalmol*. 2010;13(3):144-50.

³⁶¹ Ho WT, Chiang TH, Chang SW, Chen YH, Hu FR, Wang JJ. Enhanced corneal wound healing with hyaluronic acid and high-potassium artificial tears. *Clin Exp Optom*. 2013;96(6):536-41.

³⁶² Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(11) 1595-639.

Con respecto a la lágrima artificial de referencia, la concentración de hialuronato sódico fue incrementada del 0,2% al 0,4%, utilizándose a una concentración superior a la que habitualmente se utiliza en los preparados comerciales. En estudios preliminares, la solución polimérica al 0,4% presentó valores de viabilidad celular en las líneas celulares de conjuntiva y córnea superiores al 80% para los diferentes tiempos de contacto evaluados (15 minutos, 1 hora y 4 horas) lo que indica una adecuada tolerancia para ser administrada por vía tópica ocular.

5.2.2. Preparación de las formulaciones liposomales blanco o vehículos base

a) Método de elaboración

Según el procedimiento descrito en el apartado 3.3, se han elaborado dos tipos de formulaciones liposomales blanco o vehículos base, una sin el biopolímero de hialuronato sódico y otra con dicho polímero, **FL_{sin}** y **FL_{con}**, respectivamente (**Figura 26**).

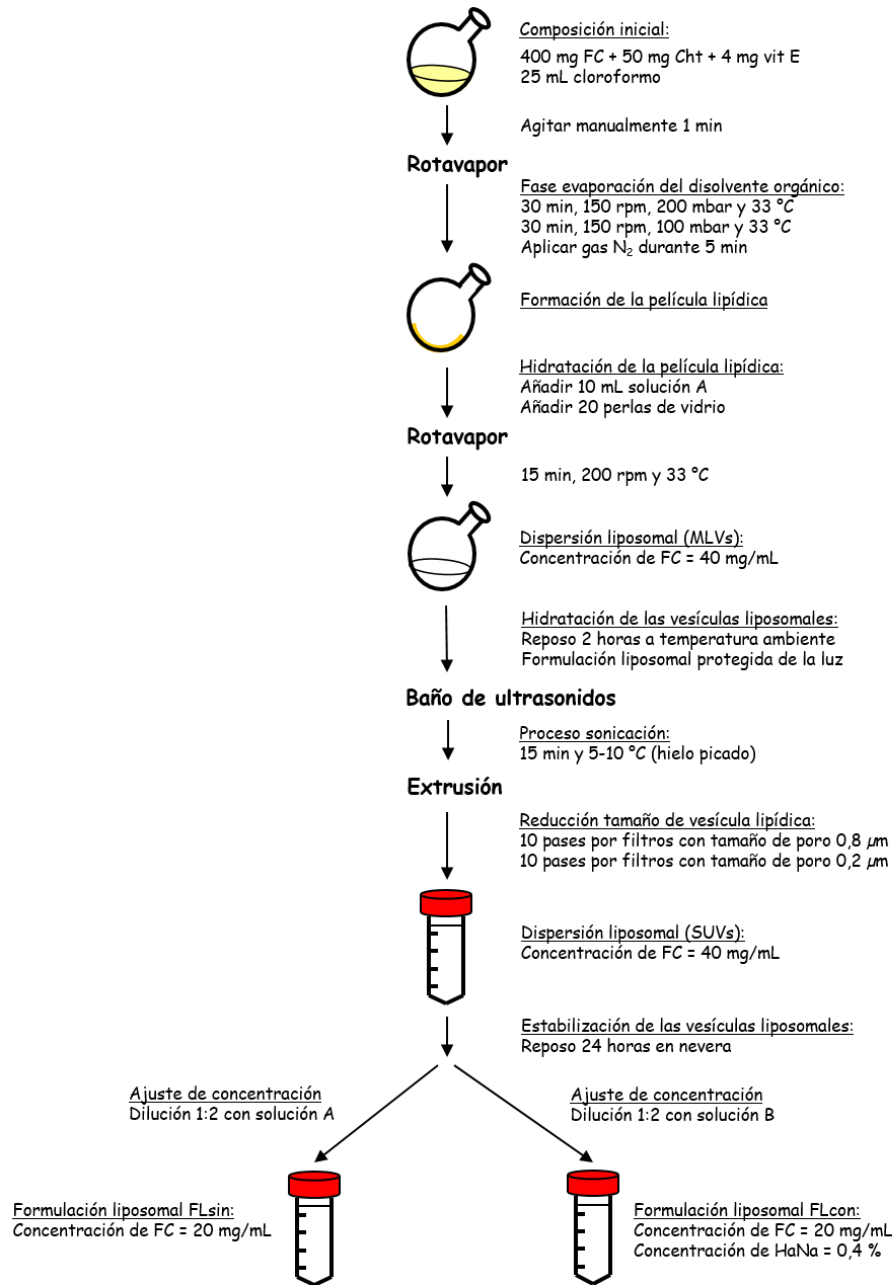


Figura 26: Esquema de preparación de las formulaciones liposomales blanco FL_{sin} y FL_{con}.

b) Rendimiento del proceso

Con el fin de poder determinar la pérdida del material lipídico durante la preparación de los liposomas, se ha utilizado como indicador uno de los componentes lipídicos añadido en las vesículas, la vitamina E.

La fosfatidilcolina comercial (Phospholipon® 90 G) contiene vitamina E como agente antioxidante en una concentración inferior al 0,3%. Con el fin de establecer el contenido exacto de vitamina E en la materia prima utilizada, se han valorado 3 muestras independientes de 40 mg de fosfatidilcolina siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.1. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 27**.

Tabla 27: *Contenido de vitamina E en la materia prima de fosfatidilcolina utilizada (Phospholipon 90 G).*

Muestra	Contenido Vit E ($\mu\text{g}/40 \text{ mg de FC}$)	Porcentaje (%)
Muestra 1	83,32	0,21
Muestra 2	81,38	0,20
Muestra 3	81,54	0,20
Promedio \pm DE	82,08 \pm 1,07	0,20 \pm 0,01

Tal y cómo aparece en la **Figura 26**, los liposomas del vehículo base contienen una concentración inicial en fosfatidilcolina de 40 mg/mL y de vitamina E (no procedente de la fosfatidilcolina) de 0,4 mg/mL. Durante la preparación de las vesículas, éstas son sometidas a un tratamiento de sonicación y dos procesos de extrusión consecutivos por filtros de 0,8 μm y 0,2 μm de tamaño de poro (10 pases por cada uno de ellos). Los lotes preparados a presiones inferiores a 100 psi se aceptan mientras que los lotes con presiones superiores a este valor se rechazan por haberse comprobado que existe pérdida del contenido liposomal (aproximadamente un 20 – 25 %).

Durante el proceso de elaboración, se determinó el contenido en vitamina E en las siguientes etapas (E):

- Antes del proceso de sonicación (E-1)
- Tras el proceso de sonicación (E-2)
- Después de los pases por el filtro de 0,8 μm de tamaño de poro (E-3)
- Después de los pases por los filtros de 0,8 μm y 0,2 μm de tamaño de poro (E-4)

Se elaboraron 3 lotes diferentes y los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 28**, donde se muestran las concentraciones de vitamina E obtenidas en las situaciones estudiadas junto con la concentración teórica si no existiese ningún tipo de pérdida.

Tabla 28: Concentraciones de vitamina E obtenidas en las diferentes etapas del proceso de elaboración ($C_{\text{experimental}}$) y su comparación con la concentración teórica ($C_{\text{teórica}}$).

Situación ensayada	Concentración de Vit E ($\mu\text{g/mL}$)				Relación de Vit E en % [[$C_{\text{experimental}}/C_{\text{teórica}}$] x 100]
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio \pm DE	Promedio \pm DE
Teórico	480,0	480,0	480,0	480,0	100,0
E-1	469,8	454,0	476,8	466,9 \pm 11,7	97,3 \pm 2,4
E-2	468,9	450,5	478,2	465,9 \pm 14,1	97,1 \pm 2,9
E-3	467,6	453,6	484,8	468,7 \pm 15,6	97,6 \pm 3,3
E-4	480,5	459,2	470,6	470,1 \pm 10,7	97,9 \pm 2,2

Los resultados obtenidos indican que la relación promedio [$(C_{\text{experimental}}/C_{\text{teórica}}) \times 100$] de vitamina E durante las diferentes etapas del proceso se sitúa entre un 97 – 98 %, no encontrándose diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en las distintas situaciones ensayadas (test t-Student - contraste de medias: p-valor $\geq 0,05$). Como se puede observar, la pérdida de concentración de vitamina E (2 – 3 %) se produce en la etapa inicial de redispersión de la película lipídica y no en los procesos de sonicación ni de extrusión.

c) Determinación del cloroformo residual en la dispersión liposomal

Tal y cómo se describe en la **Figura 26**, el cloroformo se emplea durante la fabricación de las formulaciones liposomales como disolvente orgánico de diferentes componentes oleosos empleados. Al evaporarse se obtiene una fina película de fosfolípidos que posteriormente se convierten en vesículas lipídicas al entrar en contacto con una solución acuosa.

Según la normativa EMACHMP/ICH/82260/2016 establecida por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por sus siglas en inglés), la cantidad de cloroformo residual presente en una formulación farmacéutica debe ser inferior a 60 ppm. Por lo que, su determinación por HS-SPME-GCMS en la formulación liposomal FL_{sin} , ha servido para ir perfeccionando el método de fabricación.

Tras fijar el uso de una hora de vacío (30 minutos a 200 mbar seguidos de otros 30 minutos a 100 mbar) y, una vez formada la película lipídica, la aplicación sobre ella de nitrógeno durante al menos 5 minutos, se analizaron 3 lotes diferentes fabricados según el método descrito. En todos ellos se obtuvo una cantidad residual de cloroformo inferior a 10 ppm (**Tabla 29**).

Tabla 29: Contenido de cloroformo residual en los lotes de liposomas preparados.

Muestra	Contenido cloroformo residual (ppm)
Muestra 1	0,5
Muestra 2	0,9
Muestra 3	$\leq 0,5$

5.2.3. Caracterización de las formulaciones liposomales blanco o vehículos base

La caracterización del vehículo base sin y con polímero (**FL_{sin}** y **FL_{con}**, respectivamente) comprende los ensayos fisicoquímicos de pH, osmolaridad, tensión superficial, viscosidad, tamaño de las vesículas lipídicas y los estudios de tolerancia *in vitro* e *in vivo*.

De cada formulación blanco desarrollada se fabricaron 3 lotes caracterizándose a tiempo cero y a diferentes tiempos de almacenamiento a lo largo de un año desde su preparación. Durante el estudio de estabilidad, las muestras se mantuvieron en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente (25 °C) o nevera (2 – 8 °C). De este modo, se determinó la evolución de los parámetros en función del tiempo, de las condiciones de almacenamiento y de la presencia o no de polímero en la formulación liposomal.

En el apartado 4.2.3 se incluyen los resultados de la caracterización de ambos preparados a tiempo cero y de su estabilidad a temperatura ambiente o nevera durante 12 meses.

La **Tabla 30** resume los parámetros evaluados para cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 30: Parámetros evaluados para la caracterización de las formulaciones **FL_{sin}** y **FL_{con}**.

Condiciones de almacenamiento	Parámetros	Recién preparados	Tiempo 1 mes	Tiempo 3 meses	Tiempo 6 meses	Tiempo 12 meses
Nevera / Temperatura ambiente	pH	X	X	-	X	X
	Osmolaridad	X	X	-	X	X
	Tensión superficial	X	X	-	X	X
	Viscosidad	X	X	-	X	X
	Tamaño de las vesículas lipídicas	X	X	-	X	X
	Tolerancia <i>in vitro</i>	X	X	X	X	X
	Tolerancia <i>in vivo</i>	X	-	-	-	-
	Contenido Vitamina E ⁽¹⁾	X	X	X	X	-

⁽¹⁾ Determinación del contenido de Vitamina E en la formulación liposomal blanco sin polímero (**FL_{sin}**).

Además de las pruebas descritas anteriormente, a fin de estimar el tiempo durante el cual se mantiene la protección antioxidante de la vitamina E en la formulación liposomal blanco o vehículo base, ha sido cuantificado el contenido de vitamina E en el preparado liposomal sin polímero **FL_{sin}** de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1.

Durante el estudio de estabilidad las muestras fueron almacenadas protegidas de la luz y en nevera (2 – 8 °C) durante los 3 meses de seguimiento, evaluándose el contenido de vitamina E a tiempo cero, 7, 30 y 90 días.

a) Ensayos *in vitro* de las formulaciones liposomales blanco o vehículos base

• Determinación del pH

Se ha medido el pH de cada uno de los 3 lotes fabricados para cada preparado liposomal blanco (FL_{sin} y FL_{con}), por duplicado y a temperatura ambiente (25 °C), tal y cómo se indica el apartado 3.4.1.

En la **Tabla 31** se recogen los resultados de pH promedios obtenidos a los diferentes tiempos de estudio (tiempo cero, 1, 6 y 12 meses) y en cada una las condiciones de almacenamiento ensayadas (nevera y temperatura ambiente).

Tabla 31: Valores de pH (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones FL_{sin} y FL_{con} almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Valores de pH	
		FL_{sin}	FL_{con}
Recién preparada	Tiempo cero	7,36 \pm 0,01	7,37 \pm 0,01
Nevera	1 mes	7,38 \pm 0,03	7,39 \pm 0,01
	6 meses	7,38 \pm 0,03	7,38 \pm 0,02
	12 meses	7,37 \pm 0,04	7,38 \pm 0,01
Temperatura ambiente	1 mes	7,40 \pm 0,02	7,38 \pm 0,02
	6 meses	7,38 \pm 0,03	7,40 \pm 0,01
	12 meses	4,18 \pm 0,14	5,21 \pm 0,09

El pH fisiológico de la lágrima natural es de aproximadamente 7,4 (7,2 – 7,6)^{363,364} y se mantiene relativamente estable gracias a la acción tamponante de algunos de sus componentes, entre ellos, bicarbonatos, proteínas, fosfatos y amoníaco. Esta capacidad tampón de lágrima natural es de especial interés tras la instalación de una formulación tópica ocular ya que, tras su administración, el pH de la lágrima natural varía tardando en normalizarse aproximadamente dos minutos³⁶⁵. La capacidad tampón de la lágrima natural permite amortiguar dichas variaciones siempre y cuando el valor de pH de la formulación administrada se encuentre entre 6,5 y 9³⁶⁶. Con el fin de disminuir las molestias en el momento de la aplicación, la mayoría de las lágrimas artificiales presentan valores de pH neutros o ligeramente alcalinos (pH 6,5 – 7,6). Para ello se añaden en las formulaciones componentes con acción buffer tales como bicarbonatos, fosfatos, hidróxido sódico, lactato sódico, ácido clorhídrico o ácido bórico.

³⁶³ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

³⁶⁴ Tiffany JM. The normal tear film. *Dev Ophthalmol.* 2008;41:1-20.

³⁶⁵ Benítez del Castillo JM, Vico E. Tratamiento del ojo seco. *Gaceta óptica.* 2004; 385:10-4.

³⁶⁶ Carney LG, Mauer TF, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(4):747-54.

A la hora de diseñar las lágrimas artificiales **FL_{sin}** y **FL_{con}** se han buscado valores de pH neutros a fin de evitar la aparición de molestias tras su instilación y posibles alteraciones en el funcionamiento de las células de la superficie ocular. Las soluciones de dispersión A y B empleadas en la elaboración de dichas formulaciones liposomales, presentan valores de 7,47 y 7,48 respectivamente, siendo estos valores próximos al pH de la lágrima natural.

Tal y cómo muestran los resultados recogidos en la **Tabla 31**, la presencia de las vesículas lipídicas no produce modificaciones apreciables en el pH de las soluciones de dispersión. Ambas formulaciones blanco, **FL_{sin}** y **FL_{con}**, presentan valores de pH a tiempo cero de 7,4, siendo similares al pH fisiológico de la lágrima natural. Al comparar estadísticamente los resultados obtenidos, se observa que la adicción del polímero hialuronato sódico no influye en el valor de pH (test t-Student - contraste de medias: p-valor $\geq 0,05$).

Tras un año de almacenamiento bajo condiciones de oscuridad y en nevera, no se observaron diferencias significativas en cuanto a los valores de pH en ninguno de los dos preparados liposomales (test t-Student - contraste de medias: p-valor $\geq 0,05$). En cambio, las muestras almacenadas a temperatura ambiente muestran un descenso significativo de los valores de pH a los 12 meses (test t-Student - contraste de medias: p-valor $< 0,05$) asociándose a una posible alteración de alguno de los componentes de la formulación.

Estos resultados indican la necesidad de almacenar en nevera los preparados en los que se utilice esta formulación blanco como vehículo base.

- **Determinación de la osmolaridad**

De acuerdo con lo descrito en el apartado 3.4.2, las medidas de osmolaridad se han realizado por triplicado a 33 °C para simular las condiciones de la superficie ocular.

Las soluciones utilizadas para dispersar las vesículas lipídicas (solución A y solución B) tienen valores de osmolaridad de $197,5 \pm 0,8$ mOsm/L y $196,7 \pm 2,2$ mOsm/L (promedio \pm DE), respectivamente.

En la **Tabla 32** se recogen los resultados de osmolaridad para ambas formulaciones liposomales blanco, recién preparadas y a lo largo del estudio de estabilidad (1, 6 y 12 meses) bajo condiciones de nevera o temperatura ambiente.

Tabla 32: Valores de osmolaridad (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones **FL_{sin}** y **FL_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Osmolaridad (mOsm/L)	
		FL _{sin}	FL _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	200,9 \pm 3,8	200,4 \pm 2,4
Nevera	1 mes	196,2 \pm 2,2	201,8 \pm 5,6
	6 meses	195,8 \pm 8,3	197,7 \pm 4,7
	12 meses	195,6 \pm 1,5	202,5 \pm 5,1
Temperatura ambiente	1 mes	201,8 \pm 1,1	203,0 \pm 3,7
	6 meses	193,5 \pm 9,4	197,7 \pm 3,8
	12 meses	203,8 \pm 3,4	199,1 \pm 8,4

Las formulaciones liposomales desarrolladas (**FL_{sin}** y **FL_{con}**) presentan a tiempo cero valores de osmolaridad hipotónicos, próximos a 200 mOsm/L. Estos valores no muestran diferencias significativas con los valores obtenidos para las soluciones de dispersión A y B (test t-Student - contraste de medias: p-valor \geq 0,05). Por tanto, las vesículas lipídicas no aportan osmolaridad a los preparados liposomales.

Al estudiar la osmolaridad que aporta el polímero hialuronato sódico al 0,4% a la formulación mediante comparación de los valores de osmolaridad obtenidos a tiempo cero para ambas formulaciones liposomales (**Tabla 32**), se observa que no existen diferencias significativas (test t-Student - contraste de medias: p-valor \geq 0,05). Por tanto, la presión coloidosmótica del hialuronato sódico al 0,4% es prácticamente despreciable.

Además, se observa que los valores obtenidos a tiempo cero se mantienen estables a lo largo de los 12 meses de almacenamiento en nevera y temperatura ambiente (test t-Student - contraste de medias: p-valor \geq 0,05) en ambos preparados.

• **Determinación de la tensión superficial**

Según el método de trabajo descrito en el apartado 3.4.3, cada muestra se ha analizado dos veces a una temperatura de 33 °C. Los resultados de tensión superficial obtenidos para ambas formulaciones a tiempo cero y durante los 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente y nevera se recogen en la **Tabla 33**.

Tabla 33: Valores de tensión superficial (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones FL_{sin} y FL_{con} almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Tensión superficial (mN/m)	
		FL_{sin}	FL_{con}
Recién preparada	Tiempo cero	29,3 \pm 0,5	28,4 \pm 0,6
Nevera	1 mes	28,8 \pm 0,5	28,8 \pm 0,5
	6 meses	29,8 \pm 0,5	28,7 \pm 1,0
	12 meses	29,9 \pm 1,2	28,8 \pm 0,5
Temperatura ambiente	1 mes	29,3 \pm 0,6	28,4 \pm 0,1
	6 meses	30,9 \pm 0,4	29,0 \pm 1,0
	12 meses	34,6 \pm 0,5	33,4 \pm 0,6

El valor de tensión máxima de un líquido para que éste pueda mojar libremente un sólido se denomina tensión superficial crítica del sólido. En el caso de la superficie ocular, este valor está próximo a 38 mN/m. Según la bibliografía, el valor de tensión superficial de la película precorneal (*in vitro*) se encuentra entre 44 – 46 mN/m^{367,368,369} disminuyendo hasta aproximadamente 38 mN/m gracias a la presencia de lípidos, glicoproteínas y otras moléculas. De este modo, la lágrima natural es capaz de extenderse adecuadamente sobre la superficie ocular sin romperse.

En los pacientes con enfermedad de ojo seco cuyo contenido lipídico en la lágrima está disminuido, lo cual se relaciona con una menor concentración de mucinas³⁷⁰, la tensión superficial de la lágrima aumenta hasta valores de 44 – 53 mN/m³⁷¹. En estos pacientes, la película lagrimal es inestable y discontinua, apareciendo islotes de desecación.

Los valores de tensión superficial de las soluciones empleadas (A y B) para la dispersión del vehículo base son de 69,5 \pm 1,7 mN/m y 54,5 \pm 3,5 mN/m (promedio \pm DE), respectivamente. La presencia de fosfatidilcolina permite disminuir los valores de tensión superficial por debajo del valor de tensión crítica de epitelio corneal lo que favorece la

³⁶⁷ Nagyová B, Tiffany JM. Components responsible for surface tension of human tears. *Curr. Eye Res.* 1999;19(1):4-11.

³⁶⁸ Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye.* 2003;17(8):923-6.

³⁶⁹ Bron AJ, Tiffany JM; Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):347-60.

³⁷⁰ Holly FJ. Surface chemistry of tear film component analogs. *J Colloid Interface Sci.* 1974;49(2):221-31.

³⁷¹ Tiffany JM, Winter N, Bliss G. Tear film stability and tear surface tension. *Curr Eye Res.* 1989;8(5):507-15.

extensión de ambos preparados sobre la superficie ocular y favorece una adecuada mojabilidad de ésta en el momento de su administración.

A tiempo cero, no se observan diferencias significativas entre los valores de tensión superficial de ambas formulaciones (test t-Student - contraste de medias: p-valor $\geq 0,05$) por lo que la adición de polímero no afecta a esta propiedad. Así mismo, a lo largo de los 12 meses de almacenamiento en nevera, los valores de tensión superficial se mantuvieron constantes para los dos preparados desarrolladas (test t-Student - contraste de medias: p-valor $\geq 0,05$). Sin embargo, a temperatura ambiente se observa un incremento significativo a los 12 meses de almacenamiento en ambas formulaciones (test t-Student - contraste de medias: p-valor $< 0,05$), pudiendo estar asociado a una posible degradación de la fosfatidilcolina.

• **Determinación de la viscosidad**

Las medidas de viscosidad se han realizado por duplicado, de acuerdo con el método de trabajo descrito en el apartado 3.4.4. Las muestras se atemperaron a 33 °C para simular las condiciones del lugar de administración (superficie ocular).

Inicialmente, se ha evaluado la viscosidad del agua y de las soluciones A y B recién preparadas con el fin de determinar el efecto de los diferentes componentes de las formulaciones en la viscosidad del preparado. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura (Figura 27).

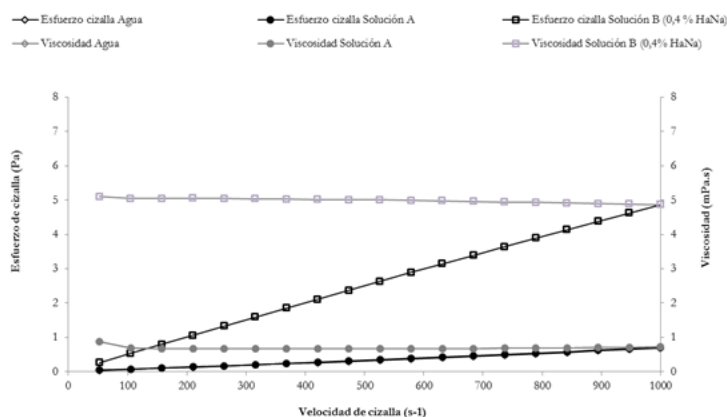


Figura 27: Reología del agua, solución A y solución B.

A la hora de desarrollar una lágrima artificial se buscan valores de viscosidad similares a la lágrima natural o ligeramente superiores para favorecer la lubricación de la superficie ocular. La lágrima natural presenta valores ligeramente superiores a los del agua (0,3 – 6 mPa·s^{372,373}).

³⁷² Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991;15(6):371-6.

³⁷³ Gouveia SM, Tiffani JM. Human tear viscosity: an interactive role for proteins and lipids. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1753(2):155-63.

Para aportar viscosidad, se suelen incorporar polímeros bioadhesivos que, a su vez, aumentan la adherencia y el tiempo de contacto de la lágrima artificial con la superficie ocular. A mayor concentración de polímero mayor incremento de la viscosidad. Sin embargo, el uso de formulaciones con excesiva viscosidad (20 – 40 mPa·s^{374,375}) dificulta la extensión del preparado sobre la superficie ocular y su mezcla con la lágrima natural generando visión borrosa y sensación pegajosa durante el parpadeo. Esto podría incrementar la frecuencia de parpadeo, disminuyendo el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular. Por ello, solo se recomienda el uso de formulaciones ligeramente hiperviscosas con valores entre 6 – 12 mPa·s³⁷⁶.

Según muestra la **Figura 27**, la solución A, empleada para la resuspensión de las vesículas liposomales durante el proceso de fabricación, presenta valores de viscosidad similares al agua. En cambio, la solución B muestra valores superiores a los del agua y a los de la solución A debido a la presencia del polímero hialuronato sódico al 4%. A pesar de ello, todas las soluciones manifiestan un comportamiento prácticamente newtoniano en el intervalo de velocidades ensayadas.

Así mismo, la viscosidad de ambos preparados (**FL_{sin}** y **FL_{con}**) fue evaluada a lo largo del estudio de estabilidad (tiempo cero, 1, 6 y 12 meses). Los 6 lotes fabricados, 3 de cada formulación, se almacenaron a temperatura ambiente o nevera en condiciones de oscuridad. En la siguiente tabla (**Tabla 34**) y figuras (**Figura 28** y **Figura 29**) se recogen los resultados obtenidos a lo largo del estudio.

Tabla 34: Valores de viscosidad (promedio ± DE) correspondientes a las formulaciones **FL_{sin}** y **FL_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Viscosidad (mPa·s)	
		FL _{sin}	FL _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	0,944 ± 0,047	6,217 ± 0,282
Nevera	1 mes	0,977 ± 0,049	6,144 ± 0,131
	6 meses	0,909 ± 0,015	6,162 ± 0,125
	12 meses	0,905 ± 0,028	6,470 ± 0,240
Temperatura ambiente	1 mes	0,994 ± 0,052	6,373 ± 0,257
	6 meses	0,886 ± 0,036	6,351 ± 0,134
	12 meses	0,926 ± 0,086	4,191 ± 0,612

³⁷⁴ Akram M, Shyum SB, Gauhar S. Development of new ophthalmic suspension prednisolone acetate 1%. *Pak J Pharm Sci*. 2010;23(2):149-54.

³⁷⁵ Gan L, Han S, Shen J, Zhu J, Zhu C, Zhang X, *et al.* Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: improving preocular retention and ocular bioavailability. *Int J Pharm*. 2010;396(1-2):179-87.

³⁷⁶ Vibhute S, Kawtikwar P, Kshirsagar S, Sakarkar D. Formulation and evaluation of tear substitutes. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2010;2(1):17-20.

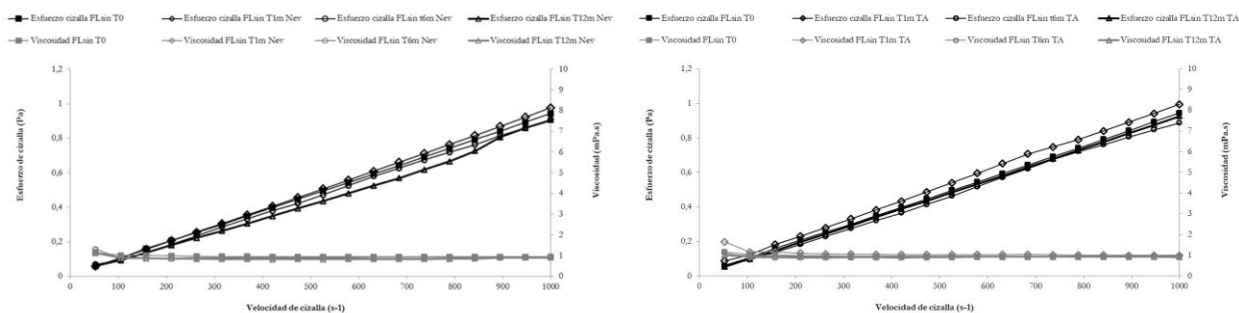


Figura 28: Reología de la formulación liposomal **FL_{sin}** almacenada en nevera (izquierda) y a temperatura ambiente (derecha) a lo largo del estudio de estabilidad.

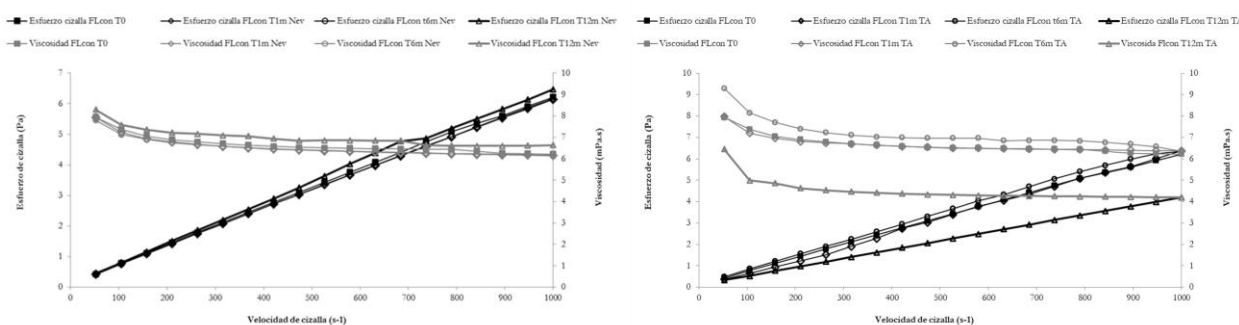


Figura 29: Reología de la formulación liposomal **FL_{con}** almacenada en nevera (izquierda) y a temperatura ambiente (derecha) a lo largo del estudio de estabilidad.

Según los datos incluidos en la **Tabla 34**, los valores de viscosidad obtenidos en ambas formulaciones se encuentran dentro del rango óptimo considerándose adecuada su extensibilidad y mezcla con la lágrima natural. La formulación **FL_{sin}** recién preparada presenta una viscosidad similar a la de la lágrima natural indicando una adecuada extensibilidad y lubricación de la superficie ocular. En cambio, la viscosidad del preparado **FL_{con}** es ligeramente superior debido a la presencia del polímero hialuronato sódico al 4%.

A lo largo del estudio de estabilidad, el preparado **FL_{sin}** mantiene su viscosidad inicial durante un año, tanto si se conserva bajo condiciones de nevera, cómo si se mantiene a temperatura ambiente (test t-Student - contraste de medias: p-valor $\geq 0,05$).

En el caso de la formulación **FL_{con}**, no se apreciaron diferencias significativas en los valores de viscosidad tras un año en nevera (test t-Student - contraste de medias: p-valor $\geq 0,05$). En cambio, a temperatura ambiente se produce un descenso significativo a los 12 meses (test t-Student - contraste de medias, p-valor $< 0,05$). La modificación observada en el valor de viscosidad podría reflejar una hidrólisis parcial del polímero.

- **Determinación del tamaño de las vesículas lipídicas**

El tamaño de las vesículas lipídicas no se considera un parámetro crítico a la hora de caracterizar una lágrima artificial de administración tópica ocular, pero si lo es su evolución en el tiempo ya que está relacionada con la estabilidad del preparado.

Los liposomas, al entrar en contacto con la película precorneal, se desestabilizan orientándose los diferentes componentes que los constituyen sobre el film lagrimal en función de sus características hidrofílicas-lipofílicas. A fin de evitar vesículas de elevado tamaño que provoquen molestias en el momento de la instilación (visión borrosa), las formulaciones elaboradas fueron sometidas a un proceso de extrusión automático. Para ello se emplearon membranas de policarbonato con diferentes tamaños de poro (10 pases por un filtro de 0,8 μm seguidos de 10 pases por un filtro de 0,22 μm). El paso de las formulaciones liposomales por filtros con un tamaño de poro de 0,22 μm logra obtener a tiempo cero distribuciones de tamaño unimodales, además de esterilizar el preparado lagrimal.

Tal y cómo se describe en el apartado 4.2.2, tras la extrusión del preparado se procede a su dilución con una solución acuosa. En función de la presencia o no del polímero hialuronato sódico en dicha solución (solución B y solución A, respectivamente), se obtuvieron dos tipos de formulaciones liposomales blanco, **FL_{sin}** y **FL_{con}**. Desde el punto de vista teórico, la presencia del polímero evita que las vesículas lipídicas se agreguen entre sí y originen vesículas de mayor tamaño. El polímero actuaría como coloide protector.

Se determinó la evolución del tamaño de las vesículas lipídica a lo largo de los 12 meses de estabilidad (tiempo cero, 1, 6 y 12 meses) de ambos preparados liposomales blanco, **FL_{sin}** y **FL_{con}**, almacenadas en nevera o temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad. Dichas medidas se realizaron de acuerdo con lo indicado en el apartado 3.4.5.

Ambas formulaciones mostraron distribuciones unimodales del tamaño del diámetro de volumen a lo largo del estudio de estabilidad (**Figura 30**). Los valores obtenidos de diámetro medio de volumen de las vesículas lipídicas se recogen en la **Tabla 35**.

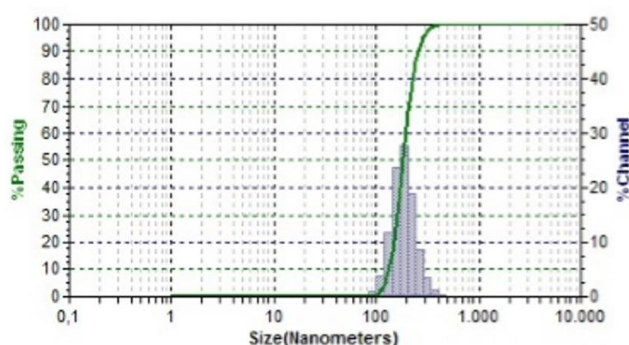


Figura 30: Distribución de tamaño de las vesículas lipídicas en la formulación **FL_{sin}** a tiempo cero.

Tabla 35: Diámetro medio de volumen de las vesículas lipídicas (promedio \pm DE) de los preparados FL_{sin} y FL_{con} almacenados en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Tamaño de las vesículas lipídicas (μm)	
		FL_{sin}	FL_{con}
Recién preparada	Tiempo cero	198,3 \pm 5,3	203,2 \pm 6,6
Nevera	1 mes	196,4 \pm 6,0	205,7 \pm 10,2
	6 meses	195,7 \pm 4,5	199,9 \pm 10,6
	12 meses	197,8 \pm 7,2	202,7 \pm 9,4
Temperatura ambiente	1 mes	196,3 \pm 4,5	205,7 \pm 6,0
	6 meses	195,6 \pm 4,9	209,9 \pm 8,9
	12 meses	220,3 \pm 20,2	351,3 \pm 29,5

De acuerdo con los resultados obtenidos, el tamaño de las vesículas lipídicas ambas formulaciones a tiempo cero son similares (test t-Student - contraste de medias: p-valor \geq 0,05).

A lo largo del estudio de estabilidad (12 meses), tampoco se apreciaron diferencias significativas en ambos preparados cuando se almacenaron en nevera (test t-Student - contraste de medias: p-valor \geq 0,05), siendo las formulaciones desarrolladas estables en cuanto al grado de dispersión en las condiciones de almacenamiento indicadas. En cambio, sí hubo un incremento significativo del tamaño de las vesículas liposomales en ambas formulaciones almacenadas a temperatura ambiente durante 12 meses (test t-Student - contraste de medias: p-valor $<$ 0,05). La degradación a temperatura ambiente de alguno de los componentes de la formulación, posiblemente fosfatidocolina y/o hialuronato sódico, puede originar inestabilidad física de los liposomas y provocar un aumento del tamaño de las vesículas dispersas.

- **Ensayos de tolerancia in vitro**

La tolerancia *in vitro* de las dos lágrimas blanco elaboradas (FL_{sin} y FL_{con}) a lo largo del estudio de estabilidad se ha evaluado en las líneas celulares de conjuntiva y córnea, manteniéndose la formulación ensayada en contacto con dichas células durante 15 minutos, 1 hora y 4 horas. De este modo se simula un tratamiento a corto plazo (15 minutos) y largo plazo (1 y 4 horas). Para cada producto, se han realizado dichos ensayos con 3 lotes diferentes.

Tal y cómo se indicó en el apartado 3.4.6, en cada ensayo de viabilidad celular se emplea un control negativo (solución de medio de cultivo) y un control positivo (solución isotónica de BAC al 0,005%). Valores de viabilidad celular superiores al 80% indican una buena tolerancia.

A lo largo del estudio de estabilidad las muestras fueron almacenadas en tubos Falcon bajo condiciones de oscuridad en nevera y temperatura ambiente durante 12 meses, realizándose la toma de muestra a cada tiempo de análisis del mismo recipiente (tiempo 1, 3, 6 y 12 meses).

○ *Conjuntiva*

Las figuras **Figura 31** y **Figura 32** muestran la tolerancia *in vitro* de las formulaciones **FL_{sin}** y **FL_{con}** en conjuntiva a los diferentes tiempos de contacto evaluados.

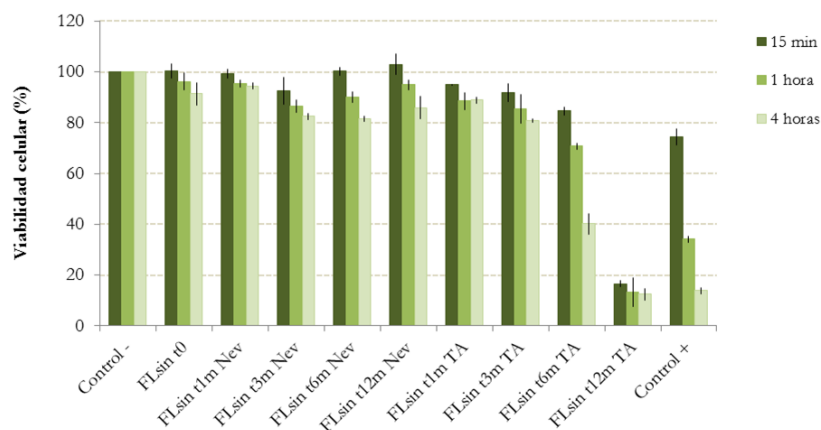


Figura 31: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular conjuntival para las soluciones control y el preparado **FL_{sin}** almacenado a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 12 meses.

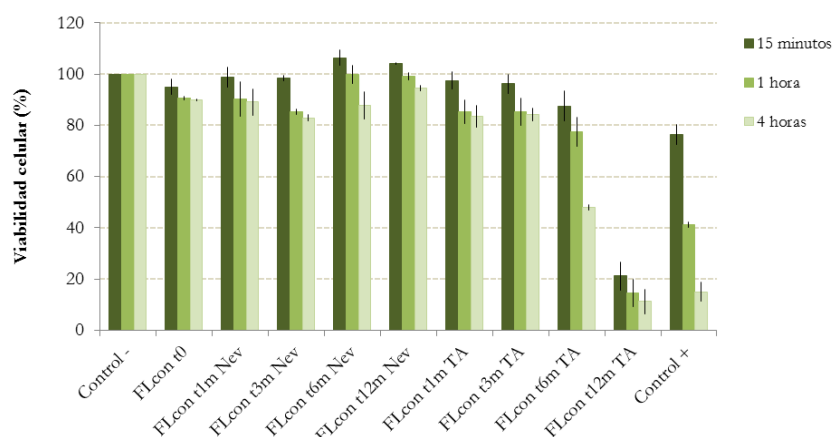


Figura 32: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular conjuntival para las soluciones control y el preparado **FL_{con}** almacenado a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 12 meses.

A tiempo cero, los valores de viabilidad celular de ambas formulaciones (**FL_{sin}** y **FL_{con}**) en conjuntiva son superiores al 80% mostrando una adecuada tolerancia *in vitro*.

A lo largo del estudio de estabilidad durante 12 meses, las formulaciones almacenadas en nevera presentan mejor tolerancia que las almacenadas a temperatura ambiente. Ambas formulaciones presentaron valores de tolerancia superiores al 80% tras un año de almacenamiento en nevera. En cambio, los valores de viabilidad celular fueron inferiores al 80% a partir del sexto mes de almacenamiento a temperatura ambiente (1 y 4 horas) siendo desaconsejable su uso a nivel tópico ocular a partir del tercer mes.

○ *Córnea*

Los resultados de tolerancia *in vitro* corneal obtenidos para las formulaciones **FL_{sin}** y **FL_{con}** se ilustran en las siguientes figuras (**Figura 33** y **Figura 34**).

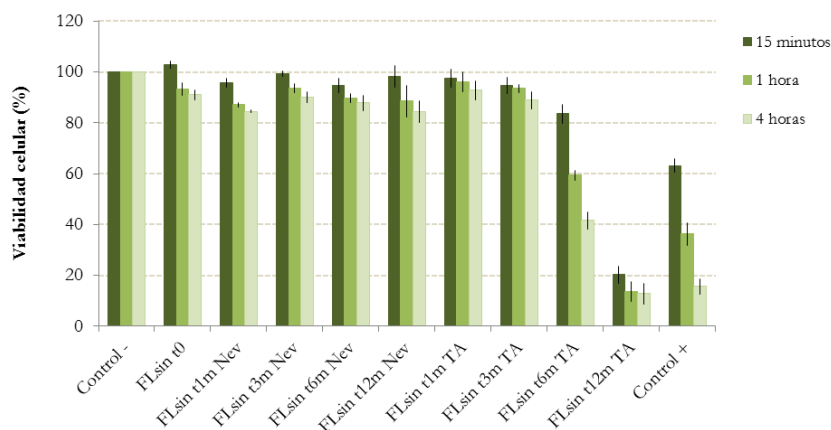


Figura 33: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular corneal para las soluciones control y la formulación **FL_{sin}** almacenada a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 12 meses.

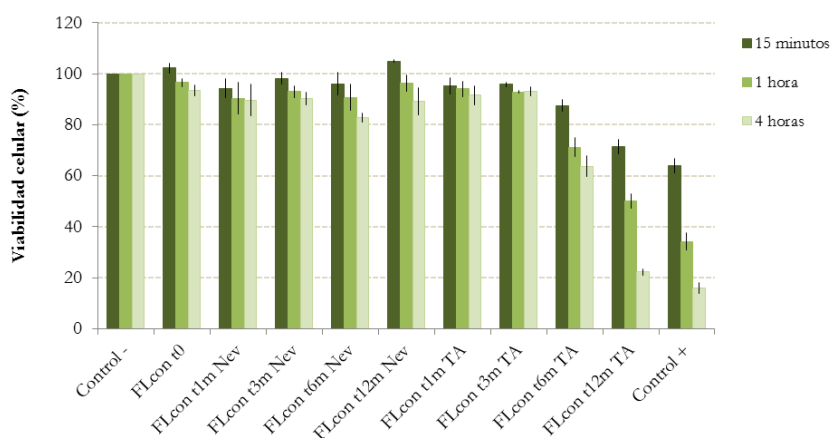


Figura 34: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular corneal para las soluciones control y la formulación **FL_{con}** almacenada a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 12 meses.

A tiempo cero, ambas formulaciones presentan valores de viabilidad celular corneal superiores al 80% siendo óptimas para su administración tópica ocular. Tras 12 meses de almacenamiento en nevera, la tolerancia sigue siendo mayor del 80% para todos los tiempos evaluados. Sin embargo, a partir del sexto mes de almacenamiento a temperatura ambiente, se obtuvieron valores de tolerancia inferiores al 80% en ambas formulaciones para los tiempos de contacto de 1 y 4 horas siendo contraproducente su instilación sobre la superficie ocular. Dichos resultados están alineados con los obtenidos en la línea celular conjuntival.

b) Estudios de tolerancia *in vivo* de las formulaciones liposomales blanco o vehículos base

Los estudios de tolerancia *in vivo* de las formulaciones liposomales blanco (**FL_{sin}** y **FL_{con}**) recién preparadas han sido realizados en conejos machos albinos de Nueva Zelanda de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado 3.4.7.

Antes de administrar las formulaciones se analizó la superficie ocular de los conejos por un examen macroscópico y una tinción con fluoresceína para identificar posibles daños o alteraciones en la misma. Todos los animales evaluados (n=6) mostraron una superficie ocular normal, sin defectos o lesiones en córnea, conjuntiva, iris y párpados, siendo aptos para ser incluidos en los estudios de tolerancia *in vivo*.

En cada estudio, tras 24, 48 y 72 horas después de la administración de la lágrima artificial se evaluó la superficie ocular de todos los individuos. Ninguno de los conejos tratados mostró síntomas de molestias ni alteraciones en el proceso de secreción lagrimal. Así mismo, la córnea se mantuvo transparente, no apreciándose ningún tipo de alteración en córnea e iris, ni inflamación en párpados. Según el sistema de graduación empleado para la evaluación macroscópica de la superficie ocular, todos los parámetros analizados a lo largo del estudio de tolerancia *in vivo* de ambas formulaciones presentaron valores de grado 0 (**Tabla 36**).

Tabla 36: Resultados obtenidos en la evaluación macroscópica de la superficie ocular durante los estudios de tolerancia *in vivo* con las formulaciones liposomales blanco **FL_{sin}** y **FL_{con}**.

Parámetro a evaluar	Grado de alteración
Molestias	Grado 0: no hay reacción de discomfort
Secreción	Grado 0: no hay secreción al administrar la formulación
Córnea	Grado 0: no aparece ulceración u opacidad
Conjuntiva	Grado 0: ausencia de alteraciones en la conjuntiva
Iris	Grado 0: ausencia de alteraciones en el iris
Párpados	Grado 0: no hay presencia de hinchazón

Los resultados obtenidos demuestran una buena tolerancia *in vivo* de las formulaciones evaluadas sobre la superficie ocular en conejos. Estos datos podrían ser extrapolados a humanos puesto que se ha demostrado una buena concordancia cuando el estudio se realiza con pequeños volúmenes de instilación sobre la superficie ocular³⁷⁷.

³⁷⁷ Freeberg FE, Nixon GA, Reer PJ, Weaver JE, Bruce RD, Griffith JF, *et al.* Human and rabbit eye responses to chemical insult. *Fundam Appl Toxicol.* 1986;7(4):626-34.

c) Estudio de estabilidad de la vitamina E en la formulación liposomal blanco FL_{sin}

Con el objetivo de estimar el tiempo durante el cual se mantiene la protección antioxidante de la vitamina E en la formulación liposomal blanco o vehículo base, se ha realizado un estudio de estabilidad de este componente durante 3 meses, almacenándose las muestras protegidas de la luz y en nevera (2 – 8 °C).

Para el estudio de estabilidad de la vitamina E se han preparado 3 lotes de la dispersión liposomal blanco FL_{sin} que contienen una concentración de liposomas expresada en fosfatidilcolina de 40 mg/mL.

Se analizó la concentración de vitamina E por HPLC en los liposomas recién preparados (tiempo 0), a los 7 días, al mes y a los 3 meses desde su elaboración. Los resultados obtenidos, valores promedios y desviaciones estándar se recogen en la **Tabla 37**.

Tabla 37: Resultados de vitamina E en la formulación liposomal FL_{sin} a lo largo de 3 meses.

Tiempo (días)	Concentración de Vit E ($\mu\text{g/mL}$)				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	DE
0	480,5	459,2	470,6	470,1	10,6
7	436,9	427,7	455,4	440,0	14,1
30	342,9	373,5	399,4	371,9	28,3
90	266,6	307,8	366,3	313,6	50,1

Al representar gráficamente en escala semilogarítmica las concentraciones remanentes de vitamina E frente al tiempo (**Figura 35**), se puede observar que los puntos se ajustan adecuadamente a una función lineal, por lo que se puede asumir una cinética de orden 1.

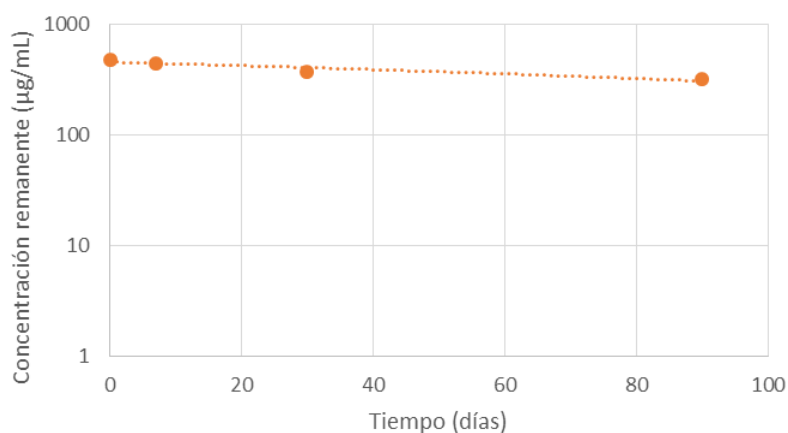


Figura 35: Concentración remanente de vitamina E en la formulación FL_{sin} a lo largo de 3 meses.

Los resultados obtenidos en el análisis de regresión realizado entre valores de logaritmos de concentración remanente de vitamina E y tiempos se recogen en la **Tabla 38**.

Tabla 38: Resultados obtenidos en la regresión lineal logaritmo concentración-tiempo.

Parámetro	Estimado por mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada al origen	2,65485	0,0164281	161,604	0,0015
Pendiente	-0,00186533	0,000345396	-5,40055	0,0326

Los valores de la **Tabla 38** confirman la existencia de pendiente (p-valor = 0,033), obteniéndose un coeficiente de determinación (r^2) de 0,935. A partir de estos datos se puede determinar un valor de la constante de degradación de $0,129 \text{ mes}^{-1}$, lo que implica una vida media de 5,4 meses.

Utilizando estos valores se puede extrapolar que se tardarían 17,8 meses para que la concentración remanente de vitamina E fuese un 10% de la concentración inicial (aprox. $47 \mu\text{g/mL}$ o $1,17 \mu\text{g}$ de vitamina E/mg de FC).

d) Comentario general

Los resultados indicados a lo largo de este apartado muestran que las formulaciones liposomales blanco diseñadas (**FL_{sin}** y **FL_{con}**) presentan características óptimas para ser utilizadas como vehículos base en formulaciones más complejas en las que interese incorporar activos lipófilos de difícil administración.

Los estudios de estabilidad demuestran su posible utilización al menos durante 12 meses siempre que se conserven en nevera, manteniéndose a lo largo de dicho periodo de tiempo la protección antioxidante aportada por la vitamina E.

Aunque a temperatura ambiente los vehículos base mantienen sus características iniciales hasta los 6 meses, no ocurre lo mismo con la toxicidad celular donde manifiestan viabilidades inferiores al 80% cuando los tiempos de contacto simulan tratamientos prolongados (1 y 4 horas).

5.3.FORMULACIÓN LIPOSOMAL ENRIQUECIDA

5.3.1. Diseño de las formulaciones liposomales enriquecidas

Empleando como vehículo base la preparación liposomal blanco descrita en el apartado 4.2, se ha diseñado la denominada formulación liposomal o lágrima artificial enriquecida al incorporarse vitamina A y vitamina C por ser útiles en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

La vitamina A, empleada como sustancia regeneradora, está presente en la lágrima natural en forma de retinol siendo un factor esencial para la proliferación y diferenciación de las células epiteliales. Numerosos estudios le atribuyen capacidad para revertir los procesos de metaplasia escamosa y queratinización de la superficie ocular, signos típicos del ojo seco severo³⁷⁸.

En cambio, la vitamina C se emplea como agente antioxidante al ser capaz de proteger a la superficie ocular del daño oxidativo causado por la contaminación ambiental o por lesiones en dicha superficie y presentar capacidad de absorber radiación ultravioleta evitando de este modo el daño fotoquímico en los órganos expuestos³⁷⁹. Además, se sabe que se requiere vitamina C para el paso del ácido dihomogamma linolénico a prostaglandina E₁, requisito necesario para la formación de lágrimas³⁸⁰. Debido a su baja estabilidad, se ha utilizado un derivado de la vitamina C por ser más estable.

Tal y cómo se detalla a continuación, la selección de las materias primas a emplear tanto para la vitamina A como para la vitamina C se ha realizado a través de diversos ensayos preliminares. Finalmente, la vitamina A se ha incluido en el vehículo base en forma de acetato de retinol, mientras que la vitamina C se ha adicionado en forma de la sal trisódica 2-fosfoascórbica (SAP). Debido a su carácter lipofílico e hidrofílico respectivamente, se incorporan la primera de ellas en la bicapa lipídica de la formulación liposomal y la segunda en la fase acuosa.

La lágrima artificial enriquecida, al igual que sucede en el preparado liposomal basal, incluye componentes lipídicos similares a los presentes en la película precorneal por lo que su uso sería útil para reponer la película lipídica del film lagrimal disminuyendo la evaporación superficial del agua y mejorando los signos y síntomas de la enfermedad de ojo seco.

³⁷⁸ Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.

³⁷⁹ Serra HM, Cafaro TA. Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2007;41(4):525-32.

³⁸⁰ Horrobin DF, Campbell A. Sjogren's syndrome and the sicca syndrome: the role of prostaglandin E₁ deficiency. Treatment with essential fatty acids and vitamin C. *Med Hypotheses.* 1980;6(3):225-32.

a) Vitamina A

Por el nombre de vitamina A se engloban diversas sustancias de estructura muy similar (retinol, retinal y ácido retinoico) que poseen actividad semejante. De todas ellas, la sustancia principal y biológicamente más activa es el retinol.

Los tres principales problemas asociados a las formulaciones de administración tópica oftálmica con vitamina A son su reducida estabilidad química, baja solubilidad e irritación de la superficie ocular tras la aplicación de la formulación.

Para minimizar los problemas de inestabilidad se ha elegido una forma éster del retinol, el acetato de retinol, que presenta mayor estabilidad. Así mismo, la presencia de antioxidantes en la formulación como es la vitamina E puede favorecer su estabilidad^{381,382}.

El acetato de retinol es prácticamente insoluble en agua, soluble o parcialmente soluble en etanol y miscible con disolventes orgánicos. Debido a su naturaleza hidrófoba, se incorpora en la bicapa lipídica de la formulación liposomal.

Las formulaciones oftálmicas comercializadas con vitamina A presentan un rango de concentración comprendido entre 0,00001% y 0,01% (m:m). Preferiblemente, se recomiendan concentraciones entre 0,00001% y 0,001% (m:m) o, incluso inferiores, por ser igualmente eficaces en el tratamiento del ojo seco disminuyéndose el riesgo de irritación ocular³⁸³.

Se realizaron estudios preliminares incorporándose vitamina A en forma de acetato de retinol en la formulación liposomal blanco **FL_{sin}**. Para la fabricación de este preparado liposomal (**FL_{sin} & Vit A**), se siguió el método general descrito en el apartado 3.3. El acetato de retinol fue disuelto en cloroformo junto con el resto de los componentes lipófilos de la formulación (fosfatidilcolina, colesterol y vitamina E). Como solución dispersante del preparado liposomal se empleó la solución A.

La relación de componentes lipídicos (FC:Cht:Vit E:Vit A) en dicha preparación fue de 8:1:0,08:0,000008 respectivamente. La cantidad de acetato de retinol añadido se ajustó teniendo en cuenta la concentración promedio de retinol en la lágrima natural humana de individuos sanos (21 ng/mL)³⁸⁴. Las concentraciones de fosfatidilcolina y vitamina A obtenidas en la dispersión liposomal fueron de 20 mg/mL y 20 ng/mL respectivamente.

³⁸¹ Tesoriere L, Bongiorno A, Pintaudi AM, D'Anna R, D'Arpa D, Livra MA. Synergistic interactions between vitamin A and vitamin E against lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996;326(1):57-63.

³⁸² Jee JP, Lim SJ, Park JS, Kim CK. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;63(2):134-9.

³⁸³ Gressel PD, Roehrs RE, Ubels JL, Edelhauer HF. Topical ophthalmic compositions containing one or more retinoids. US 4826871A. Publicada: 02-05-1989.

³⁸⁴ Kobayashi TK, Tsubota K, Takamura E, Sawa M, Ohashi Y, Usui M. Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: a cytological evaluation. *Ophthalmologica.* 1997; 211(6):358-61.

Durante la fabricación del preparado se observó que la cantidad adicionada de acetato de retinol se incorporaba adecuadamente en las vesículas lipídicas al no apreciarse cristales en la formulación. Aun así, se evaluó el impacto de la inclusión de acetato de retinol en el tamaño de las vesículas liposomales formadas, comparando la formulación liposomal blanco **FL_{sin}** con el preparado **FL_{sin} & Vit A** (Tabla 39)

Así mismo, se ha estudiado la viabilidad celular de la nueva formulación, tanto en la línea celular de conjuntiva como en la línea celular de córnea, comparándola con la formulación liposomal blanco **FL_{sin}** (Tabla 39).

Tabla 39: Diámetro medio de volumen de las vesículas lipídicas (promedio \pm DE) y viabilidad en las líneas celulares de conjuntiva y córnea (promedio \pm EER) de las formulaciones **FL_{sin}** y **FL_{sin} & Vit A**.

Parámetro		FL _{sin}	FL _{sin} & Vit A
Tamaño de las vesículas lipídicas (μ m)		198,3 \pm 5,3	195,3 \pm 4,3
Tolerancia <i>in vitro</i> en línea celular de conjuntiva (%)	15 minutos	100,4 \pm 2,8	98,5 \pm 0,8
	1 hora	96,3 \pm 3,5	98,8 \pm 3,9
	4 horas	91,4 \pm 4,3	100,8 \pm 2,9
Tolerancia <i>in vitro</i> en línea celular de córnea (%)	15 minutos	102,9 \pm 1,3	84,6 \pm 2,2
	1 hora	93,3 \pm 2,6	85,3 \pm 3,2
	4 horas	91,1 \pm 1,9	91,0 \pm 2,8

A tiempo cero, la incorporación de vitamina A no produce cambios significativos en el tamaño de las vesículas liposomales (test t-Student - contraste de medias: p-valor \geq 0,05).

Además, los valores de viabilidad celular de la nueva formulación liposomal **FL_{sin} & Vit A**, tanto en conjuntiva como en córnea, son superiores al 80% para los tres tiempos de contacto evaluados. Por tanto, la formulación liposomal con 20 ng/mL de vitamina A en forma de acetato de retinol muestra una adecuada tolerancia *in vitro* y puede ser empleada en tratamientos puntuales y/o prolongados de la superficie ocular.

b) Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico (Ac Asc) es un componente hidrofílico que presenta varios elementos estructurales, los cuáles contribuyen a su comportamiento químico: estructura de lactona, dos grupos hidroxilos enólicos, grupo alcohol primario y grupo alcohol secundario.

Las estructuras endiol y lactona le otorgan cualidades antioxidantes, ya que dichas estructuras pueden fijar fácilmente moléculas de oxígeno y radicales libres, respectivamente. Pero, precisamente debido a estas propiedades, presenta alta inestabilidad química especialmente en condiciones de humedad, luz, aire, calor, iones metálicos como hierro y cobre, oxígeno y medio alcalino descomponiéndose en varios compuestos diferentes siendo el producto de degradación mayoritario el ácido 2,3-diceto-L-glucónico.

Por ello, al diseñar y fabricar formulaciones con ácido ascórbico se procura eliminar el oxígeno del medio, ajustar de pH, usar disolventes exentos de metales, adicionar inhibidores y almacenar las formulaciones en condiciones de baja temperatura y oscuridad. Así mismo, se recurre al empleo de derivados con mayor estabilidad en disolución como por ejemplo el ascorbato sódico (Asc Na) y la sal trisódica 2-fosfo-ascórbica (SAP), ambos componentes hidrófilos, y el palmitoil-L-ascórbico (Palm Asc) con comportamiento lipófilo.

La lágrima natural humana contiene vitamina C en una concentración entre 100 – 300 µg/mL. Gracias a su actividad antioxidantes, la vitamina C protege la superficie ocular del daño oxidativo. Además, participa en la formación de la lágrima al ser necesaria para el paso de ácido dihomogamma linolénico a prostaglandina E1³⁸⁵.

A fin de seleccionar la forma de vitamina C más adecuada para ser incluida en la formulación liposomal basal, se realizaron diferentes estudios preliminares con las formas hidrosolubles de vitamina C (ácido ascórbico, ascorbato sódico y SAP) en PBS, evaluándose su estabilidad y tolerancia *in vitro* en la línea celular conjuntival. En los ensayos de viabilidad celular, se mantuvo cada formulación en contacto con las células durante diferentes tiempos simulándose tratamientos tópicos oculares a corto (15 minutos) y largo plazo (1 y 4 horas).

De cada compuesto testado se prepararon 4 tipos de soluciones que corresponden a los rangos inferior y superior de la concentración de vitamina C en la lágrima natural (100 µg/mL y 300 µg/mL) y a dos tipos de PBS pH 7,2, isotónico e hipotónico (300 mOsm/L y 200 mOsm/L, respectivamente). Los datos de viabilidad celular de dichas soluciones se recogen en las siguientes figuras (**Figura 36** y **Figura 37**).

³⁸⁵ Horrobin DF, Campbell A. Sjogren's syndrome and the sicca syndrome: the role of prostaglandin E1 deficiency. Treatment with essential fatty acids and vitamin C. *Med Hypotheses*. 1980;6(3):225-32.

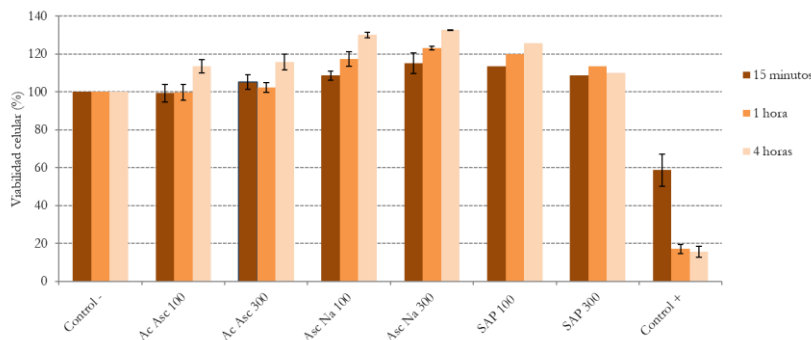


Figura 36: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular conjuntival para las soluciones control y las diferentes soluciones acuosas de vitamina C (Ac Asc, Asc Na y SAP) en PBS isotónico.

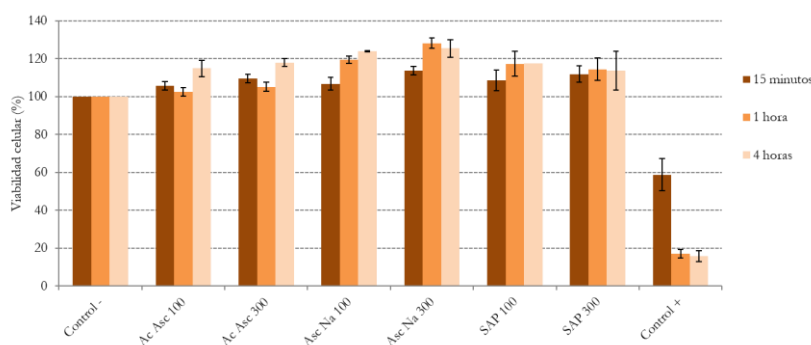


Figura 37: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular conjuntival para las soluciones control y las diferentes soluciones acuosas de vitamina C (Ac Asc, Asc Na y SAP) en PBS hipotónico.

Los valores de viabilidad celular conjuntival de todas las formulaciones fueron superiores al 80% por lo que presentan una adecuada tolerancia *in vitro* pudiendo ser administradas a nivel tópico en el tratamiento agudo o prolongado de patologías oculares.

En cuanto a los estudios de estabilidad química de los tres componentes seleccionados en solución acuosa, se elaboraron 3 soluciones de ácido ascórbico, ascorbato sódico y SAP en PBS isotónico pH 7,2 (concentración vitamina C: 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El porcentaje de ácido ascórbico remanente fue evaluado por HPLC durante 7 días. Durante dicho periodo de tiempo, las muestras fueron almacenadas bajo condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente (25 °C) o nevera (2 – 8 °C).

Las siguientes figuras (**Figura 38** y **Figura 39**) ilustran los resultados obtenidos para las diferentes formulaciones elaboradas bajo las dos condiciones de almacenamiento evaluadas.

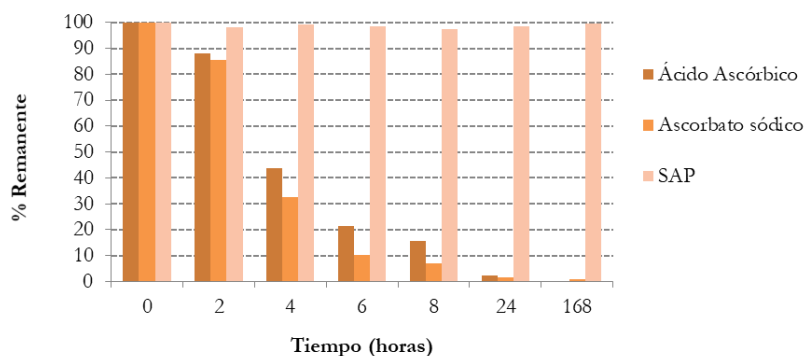


Figura 38: Estabilidad de las soluciones de Ac Asc, Asc Na y SAP en PBS isotónico almacenadas a temperatura ambiente.

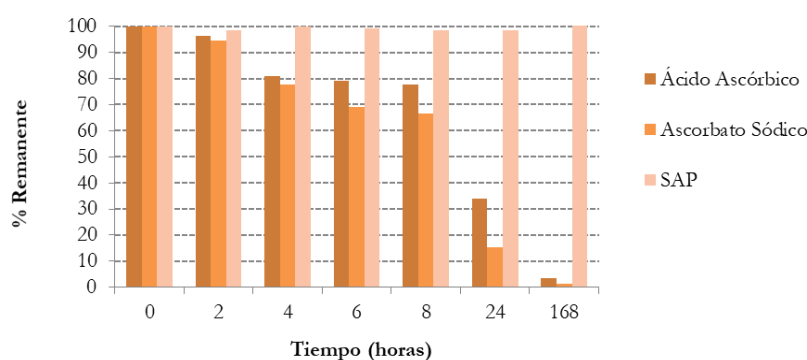


Figura 39: Estabilidad de las soluciones de Ac Asc, Asc Na y SAP en PBS isotónico almacenadas en nevera.

En base a estos resultados, la cantidad de vitamina C inicial permaneció sin variaciones significativas a lo largo de los 7 días de estudio, tanto a temperatura ambiente como nevera, cuando se añadió en forma de SAP (test t-Student – contraste de medias: p -valor $\geq 0,05$). Sin embargo, las soluciones de vitamina C en forma de ácido ascórbico y ascorbato sódico muestran una disminución significativa de la cantidad de vitamina C a lo largo del tiempo en ambas condiciones de almacenamiento (test t-Student – contraste de medias: p -valor $< 0,05$). Por lo que, considerando los resultados obtenidos en estas pruebas preliminares, se escogió la vitamina C en forma de SAP por ser la forma más estable en solución acuosa y presentar una adecuada tolerancia en la línea celular conjuntival.

A continuación, se elaboró una nueva formulación liposomal con una concentración de 300 $\mu\text{m}/\text{mL}$ de vitamina C en forma de palmitoil-L-ascórbico (**FL_{sin} & Palm Asc**), forma no hidrosoluble que se incorpora en la bicapa lipídica. Durante su fabricación se observó que la cantidad adicionada de palmitoil-L-ascórbico se incorporaba adecuadamente en las vesículas lipídicas no quedando restos de producto en el material empleado para su elaboración.

El tamaño de las vesículas liposomales de dicha formulación y su viabilidad celular fueron comparadas con el preparado liposomal basal que incluye vitamina C hidrosoluble (**FL_{sin} & SAP**) incluyéndose los resultados obtenidos en la **Tabla 40**, la **Figura 40** y la **Figura 41**.

Tabla 40: Diámetro medio de volumen de las vesículas lipídicas (promedio \pm DE) de las formulaciones *FL_{sin}*, *FL_{sin} & SAP* y *FL_{sin} & Palm Asc*.

Formulación liposomal	Tamaño de las vesículas lipídicas (μm)
FL _{sin}	198,3 \pm 5,3
FL _{sin} & SAP	198,7 \pm 5,5
FL _{sin} & Palm Asc	199,6 \pm 9,6

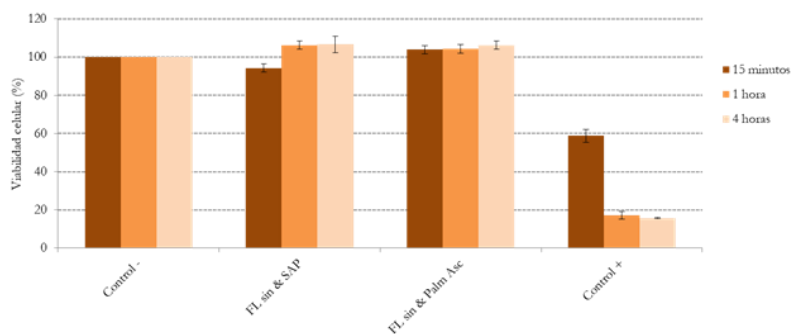


Figura 40: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular conjuntival para las soluciones control y las formulaciones *FL_{sin} & SAP* y *FL_{sin} & Palm Asc*.

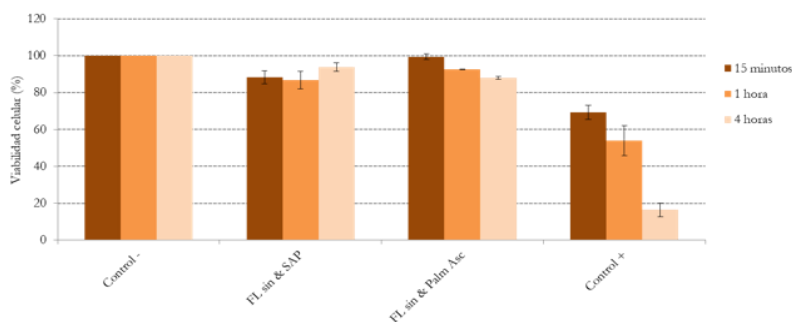


Figura 41: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular corneal para las soluciones control y las formulaciones *FL_{sin} & SAP* y *FL_{sin} & Palm Asc*

Tal y cómo muestran los resultados incluidos en la **Tabla 40**, la incorporación de vitamina C en forma de sal SAP (fase acuosa) o en forma de palmitato (fase lipídica) no produce cambios significativos en el tamaño de las vesículas liposomales del preparado *FL_{sin}* (test t-Student - contraste de medias: p-valor \geq 0,05).

En cuanto a la viabilidad celular de ambas formulaciones, se obtuvieron valores superiores al 80%, tanto en conjuntiva como en córnea, lo que indica una adecuada tolerancia *in vitro* pudiéndose ser administrados ambos preparados a nivel tópico ocular.

En base a lo anteriormente indicado, se decidió incorporar en la lágrima enriquecida la vitamina C en forma de SAP. De este modo, los dos componentes a incluir en el vehículo liposomal basal *FL_{sin}*, vitamina A y vitamina C, quedarían distribuidos en ambas fases del preparado, bicapa lipídica y fase acuosa respectivamente.

5.3.2. Preparación de las formulaciones liposomales enriquecidas

a) Método de elaboración

Tal y cómo se muestra en la **Figura 42**, para la fabricación de la formulación liposomal enriquecida se solubilizan inicialmente los componentes lipófilos del preparado (fosfatidilcolina, colesterol, vitamina E y acetato de retinol) en cloroformo, para posteriormente proceder a la evaporación del solvente orgánico formándose un film lipídico en las paredes del balón.

Después, se dispersa la película lipídica con una solución de boratos y trehalosa, denominada solución A, y SAP formándose, espontáneamente, la dispersión liposomal. La solución A se compone de H_3BO_3 al 8,38%, $Na_2B_4O_7$ al 0,755% y trehalosa al 16%.

A partir de la dispersión liposomal obtenida, se prepararon dos tipos de lágrimas artificiales enriquecidas durante la fase de ajuste de concentración, la formulación liposomal enriquecida sin el polímero hialuronato sódico (**FL-E_{sin}**) y la formulación liposomal enriquecida con el polímero hialuronato sódico (**FL-E_{con}**).

La primera de dichas formulaciones fue elaborada usando la solución A como solución dispersante, mientras que en la segunda elaboración se empleó la solución B. La composición de la solución B se basa en la solución A incorporando hialuronato sódico como polímero bioadhesivo al 4%.

En ambas formulaciones, la relación de componentes FC:Cht:Vit E:Vit A es de 8:1:0,08:0,000008 respectivamente, siendo la concentración de fosfatidilcolina la que se utiliza para expresar la concentración de liposomas.

Ambas formulaciones contienen 20 mg/mL de fosfatidilcolina, 20 ng/mL de vitamina A (en forma de retinol) y 100 µg/mL de vitamina C (expresado como ácido ascórbico), además de un 0,4% de hialuronato sódico en la formulación **FL-E_{con}**.

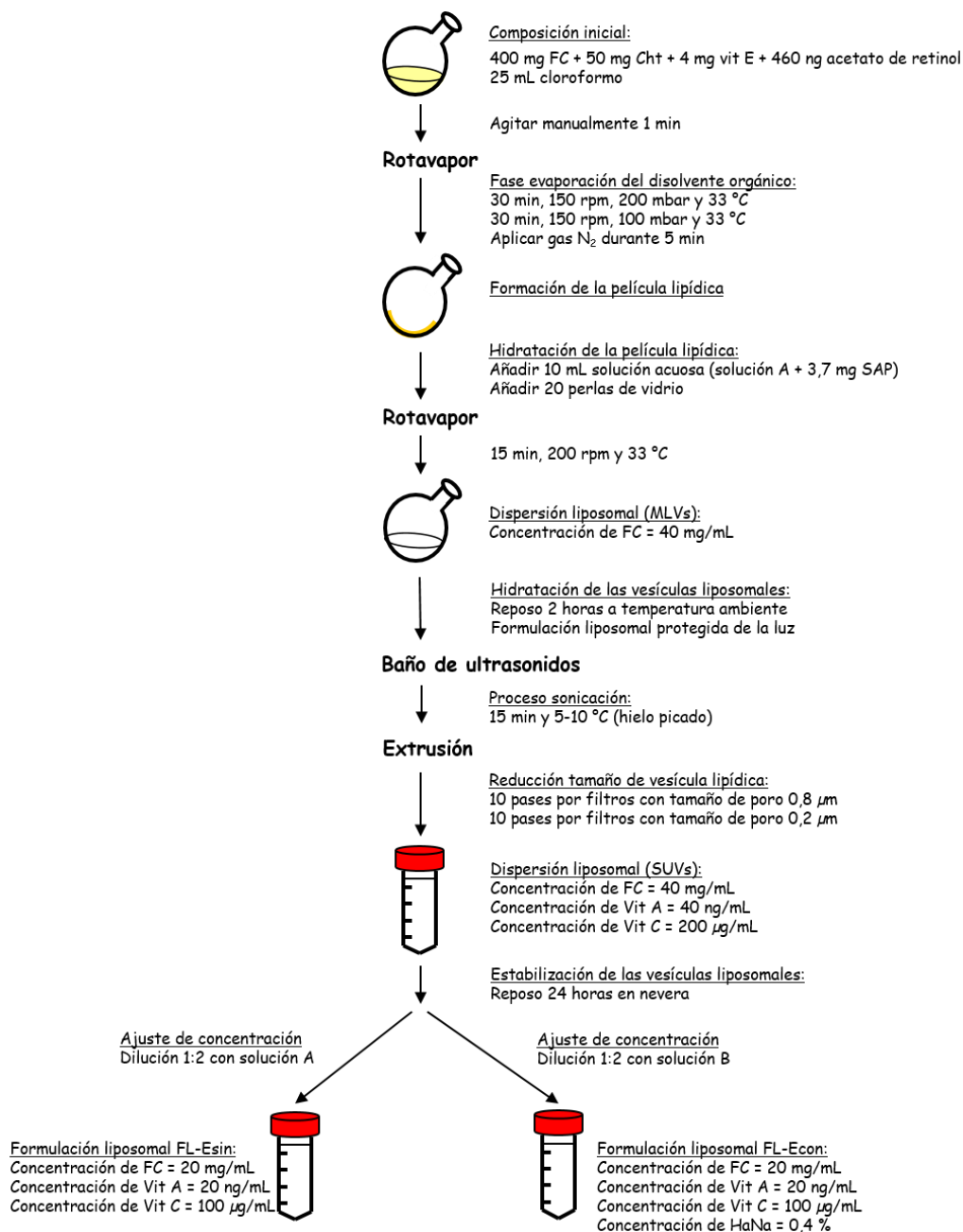


Figura 42: Esquema de preparación de las formulaciones liposomales enriquecidas *FL-E_{sin}* y *FL-E_{con}*.

b) Rendimiento del proceso

Se ha determinado por HPLC la concentración de SAP en la formulación liposomal enriquecida elaborada sin polímero (*FL-E_{sin}*), siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.2.

La concentración de SAP obtenida en la formulación liposomal *FL-E_{sin}* recién elaborada y expresada como porcentaje de la concentración teórica inicial (equivalente a 100 mg/mL de ácido ascórbico) fue del 99,7%, lo que supone una pérdida de aproximadamente el 0,3% a lo largo del proceso de fabricación.

5.3.3. Caracterización de las formulaciones liposomales enriquecidas

La caracterización de ambas formulaciones enriquecidas **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**, comprende los ensayos fisicoquímicos de pH, osmolaridad, tensión superficial, viscosidad, tamaño de las vesículas lipídicas y los estudios de tolerancia *in vitro* e *in vivo*.

Para ello, de cada formulación se han preparado 3 lotes caracterizándose todos ellos a tiempo cero (formulación recién preparada) y a diferentes tiempos durante su conservación a temperatura ambiente (25 °C) o nevera (2 – 8 °C) a lo largo de 12 meses.

En la **Tabla 41** se muestran las pruebas realizadas para la caracterización de cada preparado lagrimal a los diferentes tiempos de muestreo fijados.

Tabla 41: *Parámetros evaluados para la caracterización de las formulaciones FL-E_{sin} y FL-E_{con}.*

Condiciones de almacenamiento	Parámetros	Recién preparados	Tiempo 1 mes	Tiempo 3 meses	Tiempo 6 meses	Tiempo 12 meses
Nevera / Temperatura ambiente	pH	X	X	-	X	X
	Osmolaridad	X	X	-	X	X
	Tensión superficial	X	X	-	X	X
	Viscosidad	X	X	-	X	X
	Tamaño de las vesículas lipídicas	X	X	-	X	X
	Tolerancia <i>in vitro</i>	X	X	X	X	X
	Tolerancia <i>in vivo</i>	X	-	-	-	-

a) Ensayos *in vitro* de las formulaciones liposomales enriquecidas

- **Determinación del pH**

El pH de cada uno de los tres lotes fabricados para cada formulación liposomal enriquecida (**FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**) se ha evaluado por duplicado y a temperatura ambiente (25 °C).

La siguiente tabla (**Tabla 42**) recoge los valores de pH promedios obtenidos para cada una de las lágrimas artificiales desarrolladas en las diferentes situaciones evaluadas.

Tabla 42: Valores de pH (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Valores de pH	
		FL-E _{sin}	FL-E _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	7,44 \pm 0,05	7,39 \pm 0,04
Nevera	1 mes	7,42 \pm 0,05	7,41 \pm 0,03
	6 meses	7,38 \pm 0,03	7,40 \pm 0,02
	12 meses	7,40 \pm 0,01	7,40 \pm 0,01
Temperatura ambiente	1 mes	7,40 \pm 0,02	7,42 \pm 0,01
	6 meses	7,43 \pm 0,02	7,44 \pm 0,01
	12 meses	4,28 \pm 0,16	4,87 \pm 0,18

Para la elaboración de las lágrimas artificiales enriquecidas, **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**, se ha empleado las denominadas soluciones tamponadas A y B de pH próximo al de la lágrima natural (7,2 – 7,6). Al igual que las formulaciones liposomales blanco (**FL_{sin}** y **FL_{con}**), las formulaciones enriquecidas **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}** presentan valores de pH neutros a tiempo cero por lo que podrán ser administradas sobre la superficie ocular sin riesgo de que aparezcan molestias tras su instilación o alteraciones en el funcionamiento de las células oculares. Así mismo, no se observan diferencias significativas entre ambas formulaciones enriquecidas a tiempo cero (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05), no influyendo la presencia del polímero hialuronato sódico en el pH de la formulación.

En cuanto al estudio de estabilidad, no se observaron diferencias significativas en el pH de ambas formulaciones tras almacenarse durante un año bajo condiciones de oscuridad y en nevera (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05). Sin embargo, las muestras almacenadas a temperatura ambiente mostraron un descenso significativo de los valores de pH a tiempo 12 meses (test t-Student – contraste de medias: p-valor $<$ 0,05), tal y cómo ya ocurría en las formulaciones liposomales blanco.

• **Determinación de la osmolaridad**

La osmolaridad de cada muestra se evaluó por triplicado a 33 °C. La **Tabla 43** incluye los resultados de osmolaridad obtenidos para ambas formulaciones liposomales enriquecidas, **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**, a tiempo cero y durante su almacenamiento a temperatura ambiente y nevera a lo largo de un año (1, 6 y 12 meses).

Tabla 43: Valores de osmolaridad (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Osmolaridad (mOsm/L)	
		FL-E _{sin}	FL-E _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	198,0 \pm 3,6	198,5 \pm 4,5
Nevera	1 mes	201,7 \pm 9,6	202,6 \pm 2,2
	6 meses	198,7 \pm 10,0	197,6 \pm 7,4
	12 meses	199,7 \pm 2,8	200,7 \pm 2,7
Temperatura ambiente	1 mes	199,1 \pm 6,1	199,4 \pm 1,2
	6 meses	194,7 \pm 5,2	201,1 \pm 8,3
	12 meses	200,1 \pm 3,6	199,8 \pm 1,7

Como se comentó anteriormente, los pacientes con la enfermedad de ojo seco suelen presentar una lágrima hiperosmolar por lo que se han diseñado formulaciones hipoosmolares para así ayudar a reestablecer el equilibrio fisiológico de isotonicidad. El ajuste de tonicidad en las lágrimas artificiales enriquecidas, **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**, se logra gracias a la presencia de boratos y trehalosa en las soluciones A y B, empleadas durante la fabricación de dichos preparados lagrimales.

A tiempo cero, ambos preparados son hipotónicos (osmolaridad aproximada a 200 mOsm/L) no existiendo diferencias significativas entre ellos (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05) por lo que la presencia de hialuronato sódico al 0,4% no impacta en los valores de osmolaridad.

Tras un año de almacenamiento en nevera y a temperatura ambiente, los valores de osmolaridad de ambas formulaciones se mantienen constantes (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05) siendo a nivel osmótico adecuadas para su administración oftálmica.

- **Determinación de la tensión superficial**

De cada lote fabricado se evaluó su tensión superficial a tiempo cero y durante los 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente o nevera, realizándose cada medida por triplicado a 33 °C. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla (**Tabla 44**).

Tabla 44: Valores de tensión superficial (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Tensión superficial (mN/m)	
		FL-E _{sin}	FL-E _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	29,4 \pm 0,9	29,1 \pm 0,7
Nevera	1 mes	29,9 \pm 1,3	29,3 \pm 0,4
	6 meses	30,5 \pm 0,8	29,7 \pm 0,7
	12 meses	30,0 \pm 0,2	30,3 \pm 0,2
Temperatura ambiente	1 mes	29,4 \pm 0,2	28,6 \pm 0,7
	6 meses	29,4 \pm 1,0	28,6 \pm 0,7
	12 meses	35,4 \pm 0,4	36,1 \pm 1,0

A tiempo cero, los valores de tensión superficial de ambos preparados son inferiores al valor de tensión crítica superficial del epitelio corneal (38 mN/m) indicando una adecuada extensión sobre la superficie corneal y mojabilidad.

Así mismo, a tiempo cero no se observaron diferencias significativas entre los valores de tensión superficial de ambas formulaciones (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05) por lo que la presencia del polímero hialuronato sódico a la concentración empleada no influye en la tensión superficial de la formulación.

Durante el almacenamiento de ambos preparados en condiciones de nevera, los valores de tensión superficial se mantuvieron constantes (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05). En cambio, se aprecia un incremento significativo a tiempo 12 meses en las muestras almacenadas a temperatura ambiente para ambos preparados lagrimales (test t-Student – contraste de medias: p-valor $<$ 0,05). Dicho incremento puede ser debido a la degradación de la fosfatidilcolina, cuya presencia favorece la disminución de la tensión superficial del preparado.

• **Determinación de la viscosidad**

Las medidas de viscosidad se han realizado a la temperatura de la superficie ocular (33 °C). Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla (Tabla 45) y figuras (Figura 43 y Figura 44).

Tabla 45: Valores de viscosidad (promedio ± DE) correspondientes a las formulaciones **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Viscosidad (mPa·s)	
		FL-E _{sin}	FL-E _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	0,658 ± 0,050	6,280 ± 0,100
Nevera	1 mes	0,764 ± 0,056	6,253 ± 0,203
	6 meses	0,737 ± 0,061	6,335 ± 0,150
	12 meses	0,776 ± 0,093	6,269 ± 0,048
Temperatura ambiente	1 mes	0,605 ± 0,121	6,285 ± 0,100
	6 meses	0,629 ± 0,042	6,272 ± 0,244
	12 meses	0,653 ± 0,186	3,293 ± 0,107

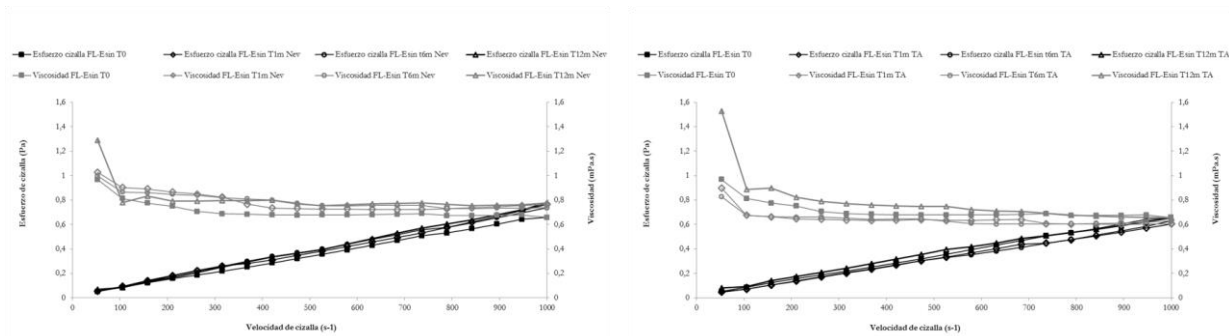


Figura 43: Reología de la formulación liposomal **FL-E_{sin}** almacenada en nevera (izquierda) y a temperatura ambiente (derecha) a lo largo del estudio de estabilidad.

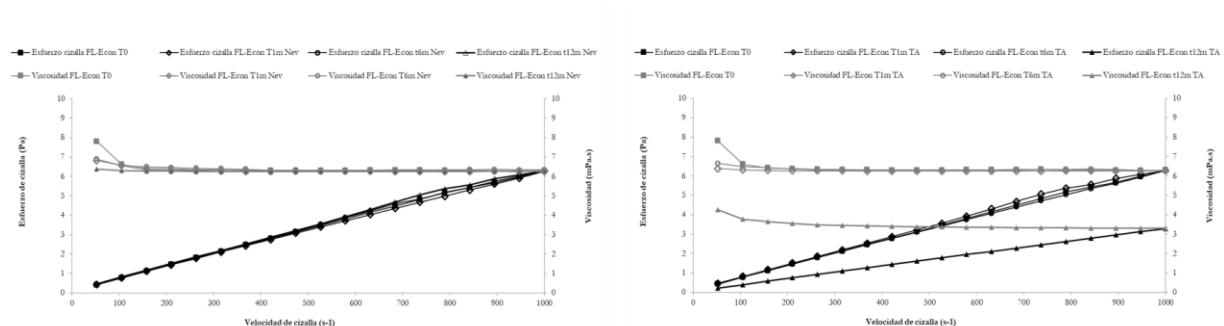


Figura 44: Reología de la formulación liposomal **FL-E_{con}** almacenada en nevera (izquierda) y a temperatura ambiente (derecha) a lo largo del estudio de estabilidad.

De acuerdo con los datos mostrados en la **Tabla 45**, los valores de viscosidad obtenidos en ambas formulaciones son significativamente diferentes. A tiempo cero, el preparado **FL-E_{sin}** presenta valores similares a la lágrima natural (0,3 – 6 mPa·s^{386,387}) mientras que la formulación **FL-E_{con}** es ligeramente hiperviscosa (6 – 12 mPa·s³⁸⁸) debido a la presencia del polímero hialuronato sódico al 4%. Las dos formulaciones liposomales enriquecidas presentan valores de viscosidad que se encuentran dentro del rango recomendado (< 20 mPa·s³⁸⁹) considerándose adecuada su extensibilidad y mezcla con la lágrima natural.

A lo largo de los 12 meses del estudio de estabilidad, no se observaron diferencias significativas en la viscosidad del preparado **FL-E_{sin}**, ni a temperatura ambiente ni en nevera (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05). En cambio, la viscosidad del preparado **FL-E_{con}** permaneció constante durante un año de almacenamiento en nevera (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05), observándose valores significativamente más bajos a tiempo 12 meses cuando se almacenó bajo condiciones de temperatura ambiente (test t-Student – contraste de medias: p-valor < 0,05), asociándolo a una posible degradación del hialuronato sódico.

- **Determinación del tamaño de las vesículas lipídicas**

Tal y como ocurría en la fabricación de la formulación liposomal blanco, durante el proceso de fabricación de la lágrima liposomal enriquecida, ésta es forzada a pasar a través de membranas de policarbonato con diferentes tamaños de poro (10 pases por un filtro con un tamaño de poro de 0,8 μ m seguidos de 10 pases por un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μ m) a fin de obtener vesículas lipídicas lo suficientemente pequeñas como para no provocar molestias tras la instilación de la lágrima artificial y conseguir una distribución de tamaño unimodal que favorezca la estabilidad del preparado.

Tras la etapa de extrusión, la formulación liposomal se diluye con una solución acuosa, solución A o B, dando lugar respectivamente a las lágrimas artificiales **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**. El tamaño de las vesículas lipídicas de ambas formulaciones se determinó a tiempo cero y tras su almacenamiento en nevera o temperatura ambiente a diferentes tiempos (1, 6 y 12 meses).

Las distribuciones de tamaño de diámetro de volumen de las vesículas lipídicas obtenidas para ambas formulaciones son unimodales a lo largo de todo el ensayo de estabilidad. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 46**.

³⁸⁶ Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A, Ohtori A, Takeuchi H, Ohguro N, *et al.* Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(7):1266-71.

³⁸⁷ Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991;15(6):371-6.

³⁸⁸ Vibhute S, Kawtikwar P, Kshirsagar S, Sakarkar D. Formulation and evaluation of tear substitutes. *Int J Pharm Sci Revi Res.* 2010;2(1):17-20.

³⁸⁹ Akram M, Shyum SB, Gauhar S. Development of new ophthalmic suspension prednisolone acetate 1%. *Pak J Pharm Sci.* 2010;23(2):149-54.

Tabla 46: Diámetro medio de volumen de las vesículas lipídicas (promedio \pm DE) de las formulaciones **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Tamaño de las vesículas lipídicas (μm)	
		FL-E _{sin}	FL-E _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	197,0 \pm 5,4	204,5 \pm 18,8
Nevera	1 mes	209,1 \pm 1,1	204,6 \pm 11,6
	6 meses	210,7 \pm 2,6	201,7 \pm 0,3
	12 meses	208,0 \pm 1,8	206,4 \pm 0,2
Temperatura ambiente	1 mes	211,3 \pm 8,3	201,5 \pm 3,2
	6 meses	213,6 \pm 4,3	205,8 \pm 1,1
	12 meses	223,6 \pm 0,9	234,1 \pm 5,9

Según estos resultados, el tamaño de las vesículas lipídicas de ambas formulaciones a tiempo cero es equivalente. Así mismo, no se apreciaron diferencias significativas del diámetro medio de volumen de las vesículas lipídicas para ninguno de los dos preparados tras almacenarse durante 12 meses en nevera (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05), siendo estables en cuanto al grado de dispersión en las condiciones de almacenamiento indicadas.

En cambio, a temperatura ambiente, las vesículas lipídicas de ambas formulaciones experimentaron un crecimiento significativo a tiempo 12 meses (test t-Student - contraste de medias: p-valor $<$ 0,05). Posiblemente esto se deba a la degradación de alguno de los componentes de la formulación (fosfatidilcolina y/o hialuronato sódico) provocando inestabilidad física en los liposomas y el aumento del tamaño de las vesículas dispersas.

- **Ensayos de tolerancia in vitro**

Se ha evaluado la viabilidad o tolerancia *in vitro* de las dos lágrimas artificiales enriquecidas diseñadas (**FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**) en las líneas celulares de conjuntiva y córnea, manteniéndose en contacto la formulación con las células durante 15 minutos, 1 hora y 4 horas para simular tratamientos a corto plazo (15 minutos) y largo plazo (1 y 4 horas).

Se ha estudiado la tolerancia *in vitro* de ambos preparados a lo largo del estudio de estabilidad (tiempo cero, 1, 3, 6 y 12 meses). De cada formulación, selaboraron 3 lotes de cada fórmula almacenándose en tubos Falcon bajo condiciones de oscuridad en nevera o temperatura ambiente. En cada ensayo se han empleado un control negativo (medio de cultivo) y otro positivo (solución isotónica de BAC al 0,005%). Los resultados de tolerancia de una formulación se expresan como promedio de los valores individuales de cada lote relacionándose valores superiores al 80% con buena tolerancia del preparado.

○ *Conjuntiva*

Las siguientes figuras (**Figura 45** y **Figura 46**) muestran la tolerancia *in vitro* conjuntival de las formulaciones **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**, a tiempo cero y a lo largo del estudio de estabilidad.

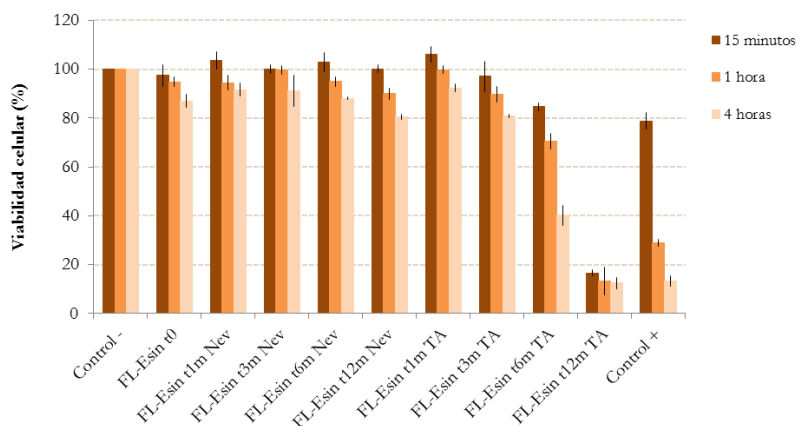


Figura 45: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular conjuntival para las soluciones control y el preparado **FL-E_{sin}** almacenado a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 12 meses.

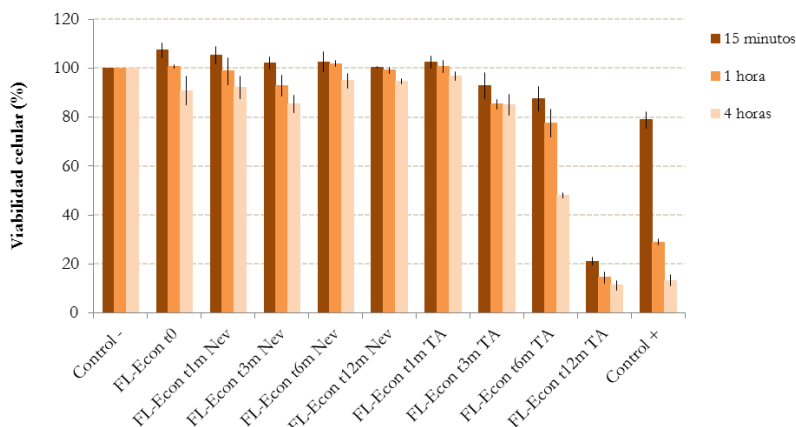


Figura 46: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular conjuntival para las soluciones control y el preparado **FL-E_{con}** almacenado a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 12 meses.

A tiempo cero, los valores de viabilidad celular conjuntival de ambas formulaciones (**FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**) son superiores al 80%, mostrando una adecuada tolerancia *in vitro*.

Tras 6 y 12 meses de almacenamiento, las formulaciones almacenadas en nevera presentaron una mayor tolerancia celular que las almacenadas a temperatura ambiente. La viabilidad de ambos preparados tras un año de almacenamiento en nevera es mayor al 80%, en cambio, los preparados almacenados a temperatura ambiente presentaron valores de tolerancia inferiores al 80% a partir del sexto mes para los tiempos de contacto de 1 y 4 horas, no siendo apta su administración tópica ocular en tratamientos prolongados a partir del tercer mes de almacenamiento en dichas condiciones.

○ Córnea

Los resultados obtenidos de tolerancia *in vitro* de las formulaciones **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}** para la línea celular corneal a tiempo cero y durante los 12 meses de estabilidad se muestran en las siguientes figuras (**Figura 47** y **Figura 48**).

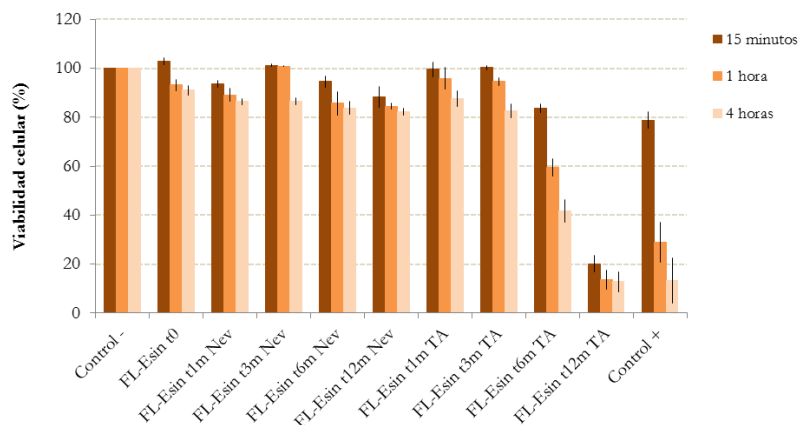


Figura 47: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular corneal para las soluciones control y el preparado **FL-E_{sin}** almacenado a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 12 meses.

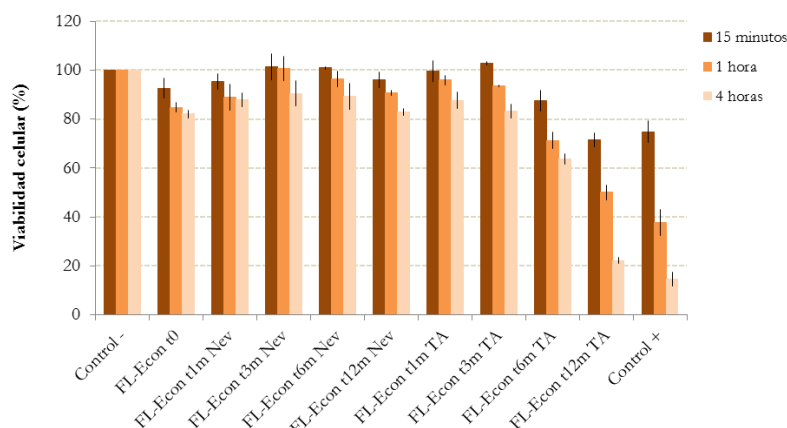


Figura 48: Viabilidad celular (promedio \pm EER) en la línea celular corneal para las soluciones control y el preparado **FL-E_{con}** almacenado a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 12 meses.

Los resultados están alineados con los resultados obtenidos en la línea celular conjuntival. A tiempo cero, ambas formulaciones presentaron valores de viabilidad celular corneal superiores al 80% indicando una óptima tolerancia para ser administradas tópicamente en el tratamiento de patologías oculares. Estos buenos resultados se mantuvieron tras un año de almacenamiento en nevera, no siendo así partir del sexto mes de almacenamiento a temperatura ambiente en donde ambos preparados mostraron valores de tolerancia inferiores a dicho valor a los tiempos de contacto de 1 y 4 horas. Por lo tanto, las formulaciones almacenadas en nevera presentan una mejor tolerancia celular que las almacenadas a temperatura ambiente siendo recomendable el almacenamiento de los preparados lagrimales bajo condiciones de oscuridad y nevera (2 – 8 °C).

b) Estudios de tolerancia *in vivo* de las formulaciones liposomales enriquecidas

Al igual que con las formulaciones liposomales blanco, la tolerancia *in vivo* de las formulaciones liposomales enriquecidas (**FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**) fue evaluada en conejos machos albinos de Nueva Zelanda.

El estado de la superficie ocular de los conejos fue analizado macroscópicamente y por tinción con fluoresceína antes de la administración de las formulaciones para identificar posibles daños o alteraciones en la misma. Todos los animales incluidos en el estudio (n=6) mostraron una superficie ocular normal, sin defectos o lesiones en córnea, conjuntiva, iris y párpados.

Transcurridas 24, 48 y 72 horas desde la administración de cada formulación, se evaluó la superficie ocular de todos los individuos. Ninguno de los animales tratados presentó molestias o cambios en el proceso de secreción lagrimal. Las córneas se mantuvieron transparentes, no apreciándose ningún tipo de alteración en córnea e iris, ni inflamación en párpados. Según el sistema de graduación empleado para la evaluación macroscópica de la superficie ocular, todos los parámetros analizados a lo largo del estudio de tolerancia *in vivo* de ambas formulaciones presentaron valores de grado 0 (**Tabla 47**).

Tabla 47: Resultados obtenidos en la evaluación macroscópica de la superficie ocular durante los estudios de tolerancia *in vivo* con las formulaciones liposomales enriquecidas **FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**.

Parámetro a evaluar	Grado de alteración
Molestias	Grado 0: no hay reacción de discomfort
Secreción	Grado 0: no hay secreción al administrar la formulación
Córnea	Grado 0: no aparece ulceración u opacidad
Conjuntiva	Grado 0: ausencia de alteraciones en la conjuntiva
Iris	Grado 0: ausencia de alteraciones en el iris
Párpados	Grado 0: no hay presencia de hinchazón

Los resultados obtenidos demuestran una buena tolerancia *in vivo* de las formulaciones enriquecidas sobre la superficie ocular en conejos. Tal y cómo se comentó anteriormente, estos datos podrían ser extrapolados a humanos puesto que se ha demostrado una buena concordancia cuando el estudio se realiza con pequeños volúmenes de instilación sobre la superficie ocular³⁹⁰.

³⁹⁰ Freeberg FE, Nixon GA, Reer PJ, Weaver JE, Bruce RD, Griffith JF, *et al.* Human and rabbit eye responses to chemical insult. *Fundam App Toxicol.* 1986;7(4):626-34.

c) Comentario general

Las formulaciones liposomales o lágrimas artificiales enriquecidas (**FL-E_{sin}** y **FL-E_{con}**) presentan características similares a las del vehículo base correspondiente (**FL_{sin}** y **FL_{con}**, respectivamente), lo que indica que la incorporación de vitamina A en forma de acetato de retinol y de vitamina C en forma de SAP no ha modificado las características generales ni el comportamiento de estabilidad de la formulación liposomal basal.

Las dos nuevas formulaciones liposomales enriquecidas son consideradas óptimas para su administración tópica ocular durante al menos 12 meses desde su fecha de fabricación siempre y cuando sean conservadas en nevera. En cambio, a pesar de que ambos preparados lagrimales mantienen sus características iniciales hasta los 6 meses cuando son conservados a temperatura ambiente, no se recomienda su uso a partir del tercer mes de almacenamiento ya que se obtuvieron valores de viabilidad celular inferiores al 80% para tiempos de contacto prolongados (1 y 4 horas).

Para asegurar que la estabilidad de ambos preparados enriquecidos es el adecuado durante 12 meses de almacenamiento en nevera sería necesario completar el estudio con el seguimiento de las concentraciones de vitamina A y vitamina C.

5.3.4. Ensayos de eficacia *in vivo* de la formulación liposomal enriquecida FL-E_{con} en un modelo animal de la enfermedad de ojo seco

La eficacia de la formulación liposomal o lágrima enriquecida FL-E_{con} se ha valorado en un modelo animal de ojo seco desarrollado en cobayas hembras Dunkin Hartley.

a) Desarrollo y caracterización de un modelo animal de la enfermedad de ojo seco

Con el fin de desarrollar un modelo animal de la enfermedad de ojo seco se han llevado a cabo diferentes tipos de ensayos. En un primer momento se intentó inducir la patología de ojo seco evaporativo sometiendo a los animales de experimentación (conejos albinos de Nueva Zelanda, ratones y, posteriormente, cobayas Dunkin Hartley) a condiciones climáticas de sequedad generadas en una cámara climática de ambiente adverso.

Tras la obtención de resultados no satisfactorios en las diferentes especies animales, se intentó desarrollar el cuadro patológico en cobayas hembras Dunkin Hartley sustituyendo las condiciones de sequedad ambiental por la administración repetida de una solución citotóxica de BAC al 0,1% (modelo BAC). Al evidenciarse un efecto rebote a dicho tratamiento, se decidió reforzar el modelo con la administración de un parasimpaticolítico, la Escopolamina, que provoca una disminución de la secreción lagrimal (modelo BAC + Escopolamina).

En todas las modalidades ensayadas, se evaluó el estado de la superficie ocular mediante las pruebas clínicas que habitualmente se usan para el diagnóstico de la enfermedad de ojo seco: osmolaridad lagrimal, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival. Los procedimientos empleados en cada una de ellas se recogen en el apartado 3.5.1.

- **Modelo de cámara climática de ambiente adverso**

El primer modelo que se intentó desarrollar fue un modelo de ojo seco evaporativo inducido mediante condiciones ambientales adversas. Según la bibliografía consultada³⁹¹, los animales deben someterse durante un periodo de entre 15 y 30 días a condiciones de sequedad ambiental con una humedad relativa inferior al 30%, una temperatura entre 25 – 30 °C y simulando viento apreciable (flujo de aire 5 – 15 L/min).

Para conseguir estas condiciones climáticas, se empleó una cámara de ambiente adverso instalada en el animalario de la UCM. Se lograron las siguientes condiciones ambientales: ciclos de luz (intensa)/oscuridad de 12 horas/12 horas, humedad relativa inferior al 30%, temperatura de 30 °C y un flujo de aire entre 0,5 – 0,7 m/s (valor máximo que permite el equipo).

³⁹¹ Ousler GW, Abelson MB, Nally LA, Welch D, Casavant JS. Evaluation of the time to “natural compensation” in normal and dry eye subject populations during exposure to a controlled adverse environment. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506:1057-63.

Durante el desarrollo de este modelo de ojo seco evaporativo se testaron diferentes animales:

- *Especie animal conejo:*

Como se indicó anteriormente se han utilizado conejos machos albinos de Nueva Zelanda. Debido a los residuos originados por estos animales en los procesos de renovación pilosa (cerdas y borra) y descamación epidérmica, se produjo una obturación progresiva de los filtros externos e internos del equipo. Esto conllevó una disminución en la velocidad de flujo de aire y un sobrecalentamiento y deterioro del motor del equipo, no pudiéndose alcanzar periodos de correcto funcionamiento superiores a 5 días. Por lo tanto, se descartó el empleo de dicha especie animal.

- *Especie animal ratón:*

Tras desestimar a los conejos como modelo animal, se evaluó el empleo de ratones. Se probó el uso de esta especie pero, posteriormente, se descartó por ser su ojo demasiado pequeño como para poder realizar en él las diferentes pruebas clínicas planteadas.

- *Especie animal cobaya:*

Finalmente, se escogió como animal de estudio cobayas de la raza Duncan-Hartley.

En el desarrollo del modelo se emplearon 9 cobayas blancas hembras, 3 para el grupo control y 6 para el grupo problema. El grupo problema estuvo sometido a las condiciones de sequedad ambiental citadas anteriormente, mientras que los animales del grupo control estuvieron bajo condiciones ambientales normales (temperatura entre 20 – 24 °C, humedad relativa del 55 ± 10 % y grado de iluminación artificial moderada con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas/12 horas). La **Figura 49** muestra el esquema seguido para el desarrollo del modelo.

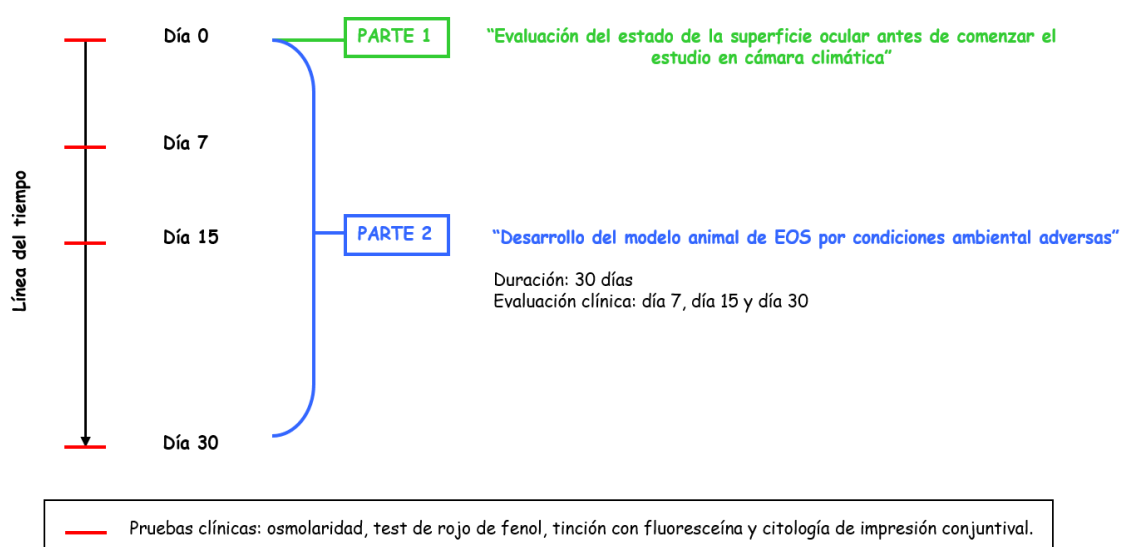


Figura 49: Organigrama utilizado para el desarrollo y caracterización de un modelo de ojo seco en cobayas inducido mediante condiciones climáticas adversas.

Antes de iniciar el estudio se evaluó el estado de la superficie ocular de todos los animales ($n = 18$ ojos), tanto de las cobayas del grupo control como de las cobayas que iban a ser sometidas a condiciones climáticas adversas. Los resultados obtenidos de las diversas pruebas clínicas realizadas se recogen en la **Tabla 48**.

Tabla 48. Resultados de las pruebas clínicas (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas inmediatamente antes de iniciar el desarrollo del modelo de ojo seco inducido mediante condiciones climáticas adversas.

Prueba clínica	Evaluación inicial (t = 0 días)
Osmolaridad (mOsm/L)	308,6 \pm 14,3
Test de rojo de fenol (mm)	18,4 \pm 6,1
Tinción con fluoresceína (puntuación promedio de las tinciones)	0,2 \pm 0,4
Puntuación total en base a criterios citológicos en la prueba de CIC	0,5 \pm 0,6

Todas las cobayas presentaron un volumen lagrimal y una osmolaridad lagrimal dentro de los valores fisiológicos^{392,393}. La tinción con fluoresceína fue negativa en todos los individuos a excepción de 3 de los 18 ojos evaluados con tinción positiva grado 1 según la escala de Oxford.

Las muestras tomadas durante la prueba de citología ocular se clasificaron como grado 0 según la graduación de Nelson, basada en la estimación semicuantitativa de diferentes criterios citológicos³⁹⁴ (**Figura 50**).

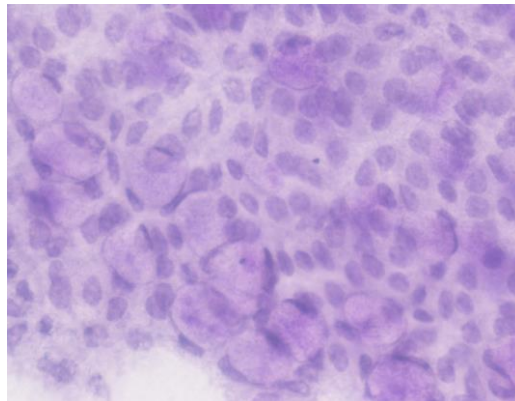


Figura 50: Citología de impresión conjuntival grado 0 obtenida en las pruebas basales de cobayas.

Por tanto, tal y como indican los valores basales obtenidos, las cobayas evaluadas mostraron una superficie ocular sana a tiempo cero. Estos valores sirven de referencia para evaluar los resultados obtenidos en las diferentes pruebas clínicas realizadas durante el desarrollo del modelo de ojo seco.

³⁹² Trost K, Skalicky M, Nell B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Vet Ophthalmol.* 2007;10(3):143-6.

³⁹³ Comunicación oral realizada por los expertos Alfonso Rodríguez Álvaro y Elisa Margarita González Alonso-Alegre. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.

³⁹⁴ Zuazo F, López-Ponce DE, Salinas-Toro D, Valenzuela F. Citología de impresión conjuntival en pacientes con valores de OSDI normales y alterados. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2014;89(10):391-6.

○ Osmolaridad

Los resultados obtenidos en la prueba de osmolaridad lagrimal a los diferentes tiempos de ensayo se recogen en la **Tabla 49** y se representan en la **Figura 51**. Para el análisis de los valores promedios entre ambos grupos (grupo control y grupo problema) se ha empleado el test de ANOVA.

Tabla 49: Valores de osmolaridad lagrimal (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo cámara climática de ambiente adverso) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (mOsm/L)	Grupo problema (mOsm/L)	p-valor (Test ANOVA)
0	308,6 \pm 14,3	308,6 \pm 14,3	–
7	307,5 \pm 14,0	296,5 \pm 19,1	0,232
15	292,7 \pm 15,0	292,8 \pm 9,0	0,988
30	307,7 \pm 15,1	299,2 \pm 16,5	0,306

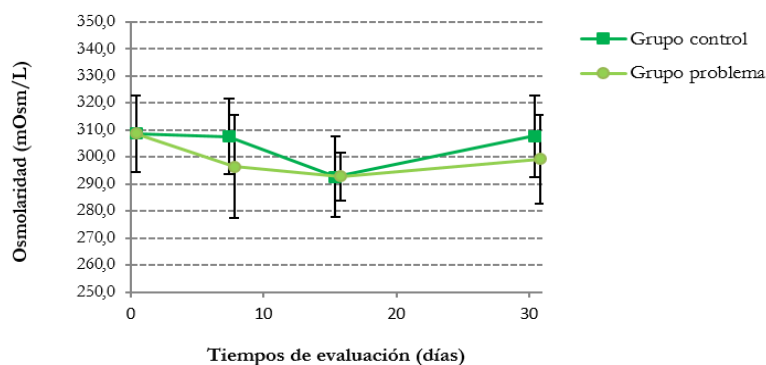


Figura 51. Representación de los valores de osmolaridad lagrimal (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo cámara climática de ambiente adverso) para los diferentes tiempos de estudio.

Los valores promedio obtenidos en ambos grupos no mostraron diferencias significativas entre sí para ninguno de los tiempos evaluados (test ANOVA: p-valor \geq 0,05). Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos y el valor basal a lo largo del estudio (test ANOVA: p-valor \geq 0,05).

Por ello, se puede concluir que, tras someter a las cobayas a condiciones de sequedad ambiental durante un periodo de 30 días, la prueba de osmolaridad lagrimal no ha reflejado la aparición de un cuadro patológico de ojo seco.

○ Test de rojo de fenol

El volumen lagrimal se determinó mediante el uso del test de rojo de fenol. Consiste en emplear una tira de algodón impregnada con rojo de fenol, el cual, al entrar en contacto con la lágrima vira de color pasando de amarillo a rojo midiéndose posteriormente la zona de color rojo.

La **Tabla 50** y la **Figura 52** muestran los resultados obtenidos para los diferentes tiempos de ensayo realizados y el análisis de los valores promedios entre ambos grupos usándose el test de ANOVA.

Tabla 50: Valores del test de rojo de fenol (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo cámara climática de ambiente adverso) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (mm)	Grupo problema (mm)	p-valor (Test ANOVA)
0	18,4 \pm 6,1	18,4 \pm 6,1	–
7	25,0 \pm 5,7	21,8 \pm 6,4	0,321
15	28,8 \pm 5,3	24,0 \pm 3,3	0,029
30	24,5 \pm 6,0	24,8 \pm 4,3	0,894

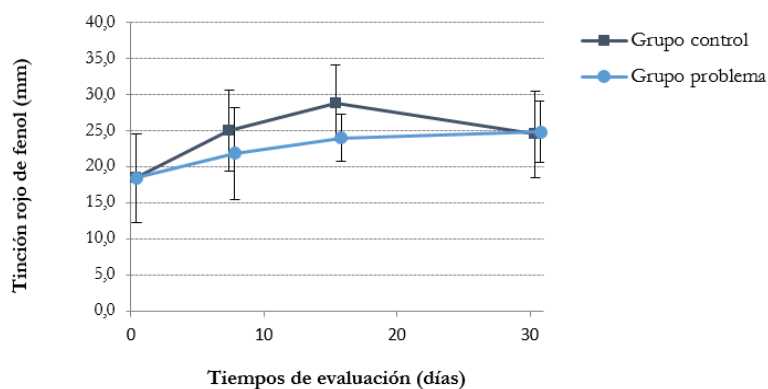


Figura 52. Representación de los valores del test de rojo de fenol (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo cámara climática de ambiente adverso) para los diferentes tiempos de estudio.

El volumen lagrimal aumentó a lo largo del estudio en ambos grupos (**Figura 52**), observándose un incremento significativo a los 15 y 30 días con respecto al valor basal en las cobayas del grupo control (test ANOVA: tiempo 7 días p-valor = 0,220; tiempo 15 días p-valor = 0,019; tiempo 30 días p-valor = 0,006). Este “efecto rebote” va en contra del efecto buscado y podría estar relacionado con que el propio animal genere defensas frente al tratamiento.

Por tanto, en base a la evolución del volumen lagrimal determinado por el test de rojo de fenol no se aprecian síntomas de la patología de ojo seco evaporativo a lo largo del ensayo realizado.

○ *Tinción con fluoresceína*

Durante el estudio se evaluó el estado de la superficie ocular de las cobayas a través de la tinción con fluoresceína, detectándose posibles daños y alteraciones del epitelio corneal.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en ambos grupos (control y problema) para los diferentes tiempos de estudio (**Tabla 51** y **Figura 53**), empleándose para el contraste de los datos el test U de Mann-Whitney.

Dichos resultados se expresan como una puntuación promedio obtenida a partir de las graduaciones de las tinciones realizadas y clasificadas según el sistema de Oxford, escala de puntuación semicuantitativa del 0 al 4 en donde el grado 0 corresponde con la ausencia de daños en la superficie ocular (tinción negativa). En todos los casos, los animales que presentaron tinción positiva, tanto del grupo control como del grupo problema, mostraron alteraciones leves del epitelio corneal siendo clasificados dentro del grado 1.

Tabla 51: Valores de la tinción con fluoresceína (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo cámara climática de ambiente adverso) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (Puntuación)	Grupo problema (Puntuación)	p-valor (Test U de Mann-Whitney)
0	0,2 \pm 0,4	0,2 \pm 0,4	–
7	0,2 \pm 0,4	0,5 \pm 0,5	0,281
15	0,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,5	1,000
30	0,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,5	1,000

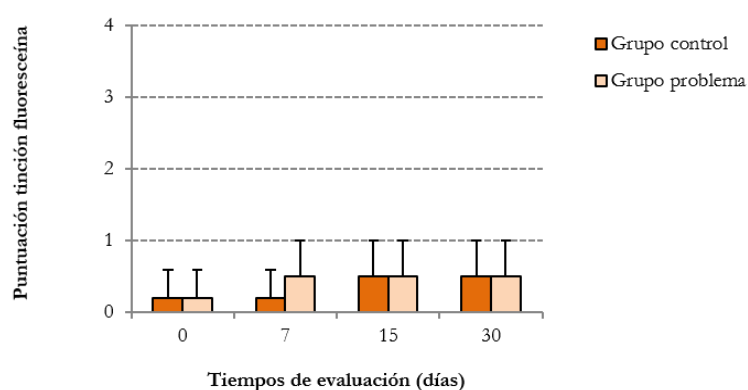


Figura 4.34. Representación de los valores de la tinción con fluoresceína (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo cámara climática de ambiente adverso) para los diferentes tiempos de estudio.

A los 7 días de haberse iniciado el ensayo, las cobayas sometidas a condiciones de sequedad ambiental presentaron un ligero incremento de tinciones positivas frente al grupo control, el cual se mantuvo hasta el final del estudio sin daños en la superficie ocular. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (test U de Mann-Whitney: $p\text{-valor} \geq 0,05$). Del mismo modo, tampoco existieron diferencias significativas entre los valores del grupo problema y el valor basal en ninguno de los tiempos ensayados (test U de Mann-Whitney: $p\text{-valor} \geq 0,05$).

Por lo tanto, la tinción con fluoresceína no indicó el desarrollo de ninguna alteración significativa en la superficie ocular a lo largo del ensayo con cobayas en cámara climática de ambiente adverso.

○ Citología de impresión conjuntival

Cómo confirmación de los resultados del resto de las pruebas clínicas realizadas, se tomaron muestras de citología de impresión conjuntival para evaluar el grado de alteración de células epiteliales de la superficie ocular tanto de las cobayas del grupo control y como de las cobayas del grupo problema a los diferentes tiempos de estudio (tiempo cero, 7, 15 y 30 días).

Dichas muestras se evaluaron de acuerdo con la escala semicuantitativa de Nelson basada en criterios citológicos de celularidad, contacto entre células, relación núcleo/citoplasma, cantidad de células caliciformes y manifestación de metaplasia³⁹⁵.

Todas las muestras analizadas para los diferentes tiempos de estudio presentaron un grado cero o grado normal, al observarse un número abundante de células caliciformes en buen estado (ovales, gruesas y fuerte tinción PAS positiva de su citoplasma) y células epiteliales pequeñas y redondas, con un límite celular bien definido y adecuada relación núcleo/citoplasma. Así mismo, no se observaron cambios en el proceso de metaplasia escamosa (**Tabla 52** y **Figura 54**).

Tabla 52: Valores de la graduación de Nelson en la CIC (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo cámara climática de ambiente adverso) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control		Grupo problema	
	Puntuación	Grado Nelson	Puntuación	Grado Nelson
0	0,5 \pm 0,6	0	0,5 \pm 0,6	0
7	1,5 \pm 0,7	0	3,0 \pm 0,0	0
15	2,0 \pm 0,0	0	–	–
30	1,5 \pm 0,7	0	1,0 \pm 0,0	0

³⁹⁵ Zuazo F, López-Ponce DE, Salinas-Toro D, Valenzuela F. Citología de impresión conjuntival en pacientes con valores de OSDI normales y alterados. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2014;89(10):391-6.

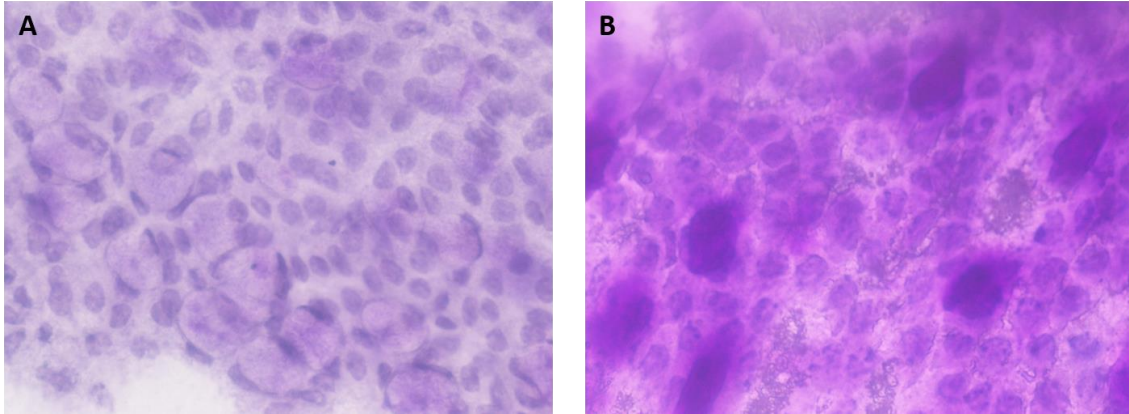


Figura 54: Muestras de superficie ocular obtenidas por CIC de los individuos del grupo problema (modelo cámara climática de ambiente adverso) para los diferentes tiempos de estudio evaluados. A) Tiempo cero (grado 0); B) Tiempo 30 días (grado 0).

Por lo tanto, las muestras tomadas de citología de impresión conjuntival no mostraron signos de alteración en la superficie ocular de las cobayas a lo largo del ensayo desarrollado en la cámara climática de ambiente adverso.

○ Comentario general

De acuerdo con los resultados obtenidos en las diferentes pruebas clínicas ensayadas (osmolaridad lagrimal, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival), se puede concluir que las condiciones climáticas adversas establecidas resultaron poco agresivas, no causando un cuadro de la enfermedad de ojo seco en los animales utilizados como modelo.

- **Modelo BAC**

El BAC se emplea como conservante en formulaciones tópicas oculares por ser capaz de estabilizar al fármaco además de presentar una gran eficacia contra la contaminación microbiana al inducir necrosis (a concentraciones de 0,05 – 0,1 %) y apoptosis celular (a concentraciones de 0,001%). Dicha capacidad detergente no sólo tiene lugar en células microbianas, sino que también ocurre con células eucarióticas, por lo que su uso provoca daños en las células de la superficie ocular, incluso a concentraciones bajas de 0,0001 – 0,001 %³⁹⁶. Las consecuencias clínicas son una disminución del tiempo de rotura lagrimal y un aumento en la inestabilidad del film lagrimal³⁹⁷.

En base a lo mencionado anteriormente, se propuso desarrollar un modelo de ojo seco en cobayas mediante la administración tópica repetida de una solución de BAC al 0,1% en una solución isotónica de NaCl. A las cobayas del grupo problema (n = 12 ojos) se les administró 10 µL de dicha solución dos veces al día durante un periodo de 30 días. En paralelo, durante el tiempo que duró el estudio, las cobayas del grupo control (n = 6 ojos) recibieron 10 µL de una solución isotónica de NaCl dos veces al día.

En la **Figura 55** se muestra un esquema del procedimiento seguido para desarrollar el modelo.

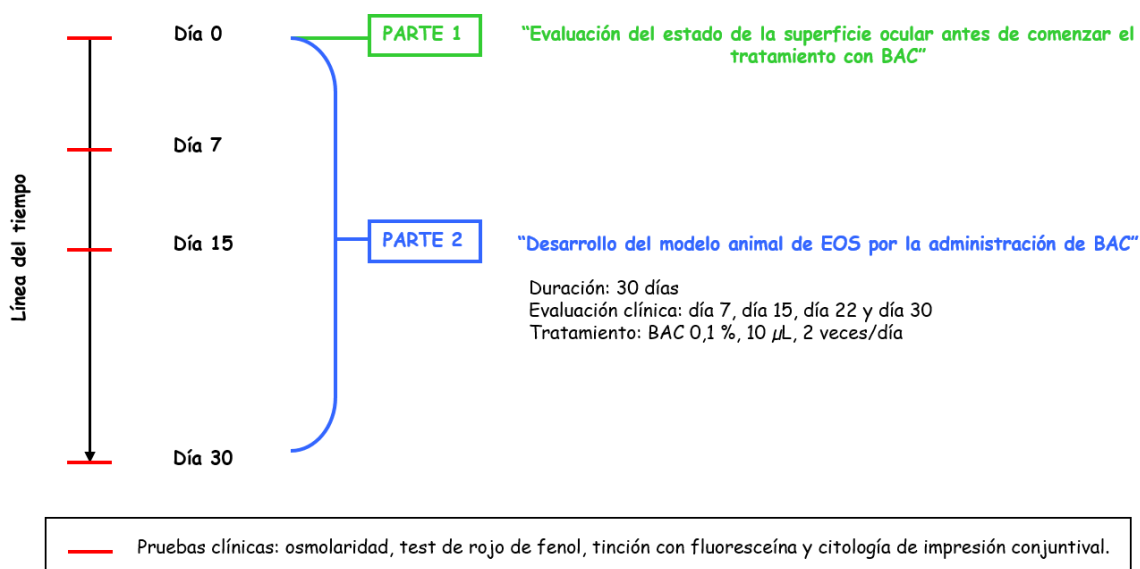


Figura 55: Organigrama utilizado para el desarrollo y la caracterización de un modelo de ojo seco en cobayas inducido mediante la administración tópica oftálmica de una solución de BAC al 0,1%.

³⁹⁶ Torras J, Moreno S. Revisión: lágrimas artificiales. *Annals d'Oftalmologia*. 2006;14(2):70-84.

³⁹⁷ Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther*. 2001;18(5):205-15.

Antes de iniciarse el ensayo, se evaluó el estado de la superficie ocular de todos los animales ($n = 18$ ojos) en base a las pruebas clínicas de osmolaridad, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival. En la **Tabla 53** se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 53. Resultados de las pruebas clínicas (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas inmediatamente antes de iniciar el desarrollo del modelo de ojo seco inducido mediante la administración tópica oftálmica de una solución de BAC al 0,1%.

Prueba clínica	Evaluación inicial (t = 0 días)
Osmolaridad (mOsm/L)	302,3 \pm 15,6
Test de rojo de fenol (mm)	19,2 \pm 6,0
Tinción con fluoresceína (puntuación promedio obtenida en las tinciones)	0,2 \pm 0,4
Puntuación total en base a criterios citológicos en la prueba de CIC	1,0 \pm 1,4

A tiempo cero, la mayoría de los animales de experimentación evaluados presentaron valores de osmolaridad, volumen lagrimal y tinción con fluoresceína dentro de los rangos fisiológicos, mostrando una superficie ocular sana antes de comenzar el estudio. Sin embargo, cuatro de los ojos evaluados presentaron tinción positiva de intensidad grado 1, relacionada con lesiones muy leves del epitelio corneal.

Las muestras de citología de impresión conjuntival confirmaron los anteriores resultados al mostrar que todos animales seleccionados presentaban una superficie ocular de grado cero o normal. Por este motivo, se consideró sana la superficie ocular de dichos individuos siendo admitidos dentro de la población de estudio.

Los animales de experimentación evaluados se dividieron en dos grupos, grupo control (3 cobayas) y el grupo problema (6 cobayas). A lo largo del estudio se caracterizó el modelo determinándose a diferentes tiempos (7, 15 y 30 días) la osmolaridad lagrimal, el volumen lagrimal por el test de rojo de fenol y el estado de la superficie ocular por el test de tinción con fluoresceína y la citología de impresión conjuntival.

○ *Osmolaridad*

Los resultados de osmolaridad lagrimal obtenidos a lo largo del estudio se incluyen en la **Tabla 54** y en la **Figura 56**, usándose el test de ANOVA para el análisis comparativo.

Tabla 54: Valores de osmolaridad lagrimal (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (mOsm/L)	Grupo problema (mOsm/L)	p-valor (Test ANOVA)
0	302,3 \pm 15,6	302,3 \pm 15,6	–
7	307,5 \pm 14,0	300,6 \pm 21,5	0,489
15	292,7 \pm 15,0	296,9 \pm 25,5	0,350
30	307,7 \pm 14,0	298,3 \pm 21,9	0,367

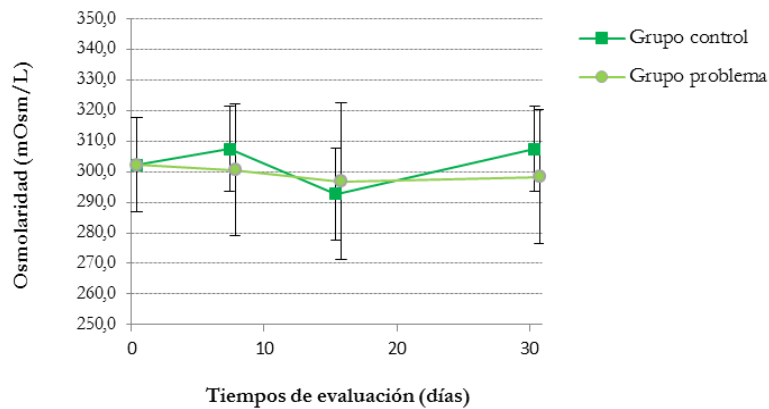


Figura 56: Representación de los valores de osmolaridad lagrimal (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC) para los diferentes tiempos de estudio.

Para los diferentes tiempos de estudio (**Tabla 54**), no hubo diferencias significativas (test ANOVA: p -valor $\geq 0,05$) entre ambos grupos, control y problema, y los valores de osmolaridad obtenidos en todos los casos se encontraron dentro de los fisiológicos.

Así mismo, al comparar la evolución de los valores de osmolaridad lagrimal para el grupo problema a los diferentes tiempos de estudio con respecto a los valores obtenidos a tiempo cero, no se apreciaron diferencias significativas para ninguno de los tiempos evaluados (test ANOVA: tiempo 7 días p -valor = 0,990; tiempo 15 días p -valor = 0,086; tiempo 30 días p -valor = 0,894).

Por tanto, puede concluirse que no fue apreciado un cuadro de hiperosmolaridad lagrimal tras la instilación durante 30 días de una solución BAC al 0,1%.

○ *Test de rojo de fenol*

La **Tabla 55** y la **Figura 57** muestran los resultados obtenidos en el test de rojo de fenol a los diferentes tiempos evaluados. Para comparar los resultados obtenidos entre los grupos de estudio experimentales, control y problema, se ha empleado el test de ANOVA.

Tabla 55: Valores del test de rojo de fenol (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (mm)	Grupo problema (mm)	p-valor (Test ANOVA)
0	19,2 \pm 6,0	19,2 \pm 6,0	–
7	25,0 \pm 5,7	25,0 \pm 4,8	1,000
15	27,4 \pm 4,4	22,6 \pm 6,7	0,161
30	24,5 \pm 6,0	24,9 \pm 4,7	0,894

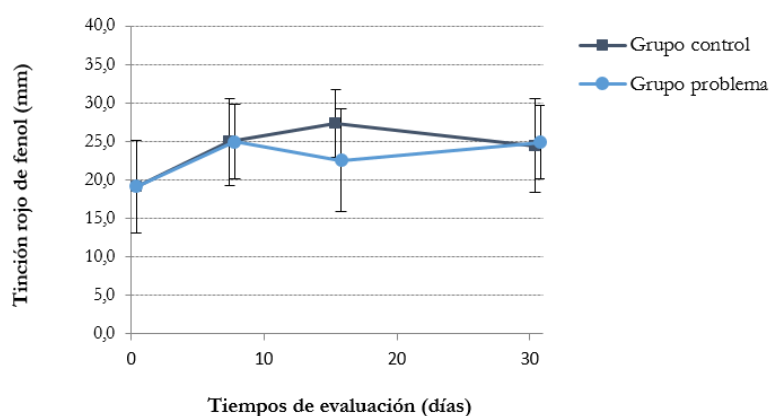


Figura 57: Representación de los valores del test de rojo de fenol (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC) para los diferentes tiempos de estudio.

Como se observa en la **Figura 57**, el volumen lagrimal aumentó en ambos grupos a lo largo del estudio. Al comparar los valores de tinción obtenidos en el grupo problema para los diferentes tiempos de estudio con los valores obtenidos a tiempo cero, se observa un aumento significativo del volumen lagrimal a los 7 y 30 días desde el inicio del tratamiento (test ANOVA: tiempo 7 días p-valor = 0,016; tiempo 15 días p-valor = 0,204; tiempo 30 días p-valor = 0,017). Sin embargo, no existen diferencias significativas para cada tiempo de ensayo entre los valores de ambos grupos (control y problema) (**Tabla 55**) por lo que dicho incremento no puede ser atribuido a la instilación de una solución de BAC al 0,1%.

En base a estos resultados, se concluye que tras la instilación de una solución de BAC al 0,1% durante un periodo de 30 días no se detectaron cambios en el volumen lagrimal relacionados con la aparición de un cuadro de ojo seco.

○ *Tinción con fluoresceína*

La **Tabla 56** y la **Figura 58** recogen los resultados obtenidos durante las pruebas de tinción con fluoresceína (grupos control y problema) a lo largo del estudio, siendo expresados como valor promedio de la graduación obtenidas en los animales ensayados. Para el análisis comparativo de estos se emplea el test U de Mann-Whitney.

Tabla 56: Valores de la tinción con fluoresceína (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (Puntuación)	Grupo problema (Puntuación)	p-valor (Test U de Mann-Whitney)
0	0,2 \pm 0,4	0,2 \pm 0,4	–
7	0,2 \pm 0,4	2,2 \pm 0,4	0,002
15	0,5 \pm 0,5	1,6 \pm 0,7	0,013
30	0,5 \pm 0,5	3,7 \pm 0,5	< 0,001

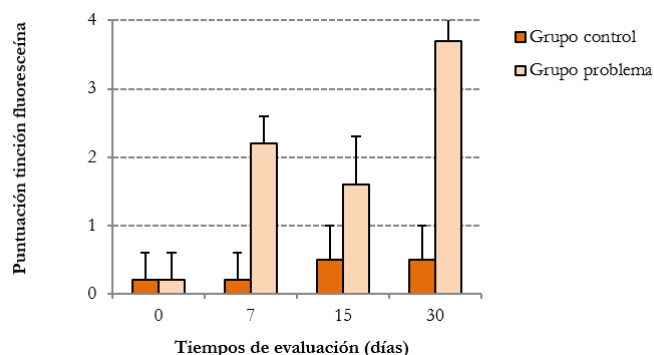


Figura 58: Representación de los valores de la tinción con fluoresceína (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC) para los diferentes tiempos de estudio.

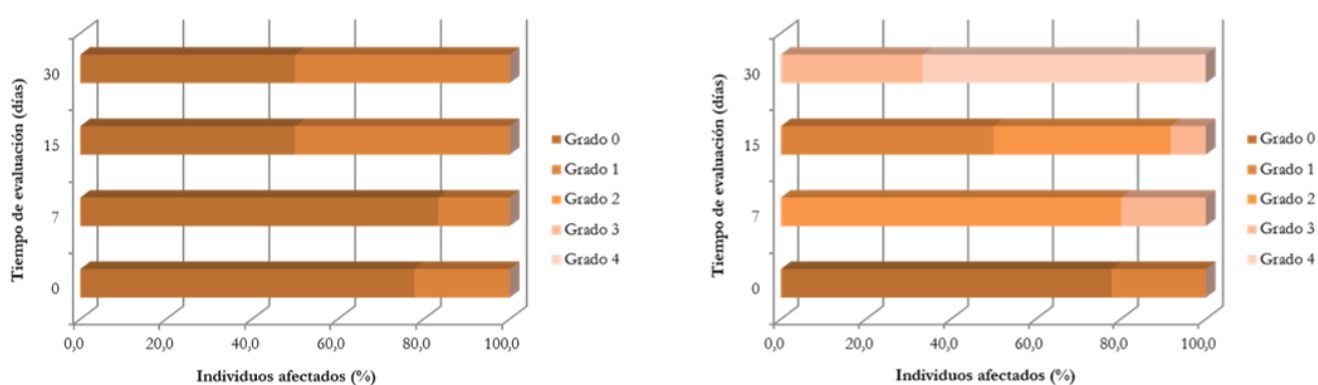
Como muestran los resultados de la **Tabla 56**, la puntuación de tinción con fluoresceína en el grupo problema fue significativamente mayor que en el grupo control a lo largo del estudio.

Al comparar los valores individuales de tinción de cada grupo con los valores basales (tiempo cero) se observó que los valores de tinción con fluoresceína fueron constantes a lo largo del tiempo en las cobayas del grupo control (test U de Mann-Whitney: tiempo 7 días p-valor = 0,868; tiempo 15 días p-valor = 0,334; tiempo 30 días p-valor = 0,334) mientras que dichos valores aumentaron significativamente en las cobayas del grupo problema para todos los tiempos evaluados (test U de Mann-Whitney: p-valor < 0,001).

Así mismo, la intensidad de las tinciones en el grupo control se mantuvo dentro de los grados 0 y 1 de la escala de Oxford durante todo el estudio mientras que las cobayas del grupo problema mostraron alteraciones en el epitelio corneal cada vez más graves, siendo todas las lesiones observadas como grado 3 y grado 4 al final del estudio (**Tabla 57** y **Figura 59**).

Tabla 57: Resultados de grado de intensidad en la tinción con fluoresceína expresados en porcentaje.

Tiempo de estudio (días)	Grado de intensidad de la tinción	Grupo control (%)	Grupo problema (%)
0	0	77,8	77,8
	1	22,2	22,2
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
7	0	83,3	0
	1	16,7	0
	2	0	80,0
	3	0	20,0
	4	0	0
15	0	50,0	0
	1	50,0	50,0
	2	0	41,7
	3	0	8,3
	4	0	0
30	0	50,0	0
	1	50,0	0
	2	0	0
	3	0	33,3
	4	0	66,7

**Figura 59:** Grado de tinción con fluoresceína de los individuos del grupo control (izquierda) y grupo problema (derecha) en el modelo BAC para los diferentes tiempos de estudio.

Por lo tanto, la administración tópica ocular de una solución de BAC al 0,1% generó alteraciones en la superficie conjuntival representativas del cuadro patológico de ojo seco pudiendo ser detectadas mediante la prueba clínica de tinción con fluoresceína.

○ *Citología de impresión conjuntival*

En la **Tabla 58** se recoge la evolución de la puntuación estimada para los ensayos de citología de impresión conjuntival en las cobayas de ambos grupos, control y problema.

Tabla 58: Valores de la graduación de Nelson en la CIC (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control		Grupo problema	
	Puntuación	Grado Nelson	Puntuación	Grado Nelson
0	1,0 \pm 1,4	0	1,0 \pm 1,4	0
7	1,5 \pm 0,7	0	5,0 \pm 0,0	1
15	2,0 \pm 0,0	0	3,5 \pm 0,7	1
30	1,5 \pm 0,7	0	5,2 \pm 1,6	2

Tal y cómo se reflejan los datos anteriores, la instilación de la solución de BAC al 0,1% produjo alteraciones en la superficie ocular de grado 1 a los tiempos 7 y 15 días y de grado 2 a los 30 días. En la **Figura 60** se puede observar cómo se produce una disminución del número de células caliciformes y epiteliales, un descenso en la relación núcleo/citoplasma y un incremento en la presencia de células aisladas tras 30 días de tratamiento.

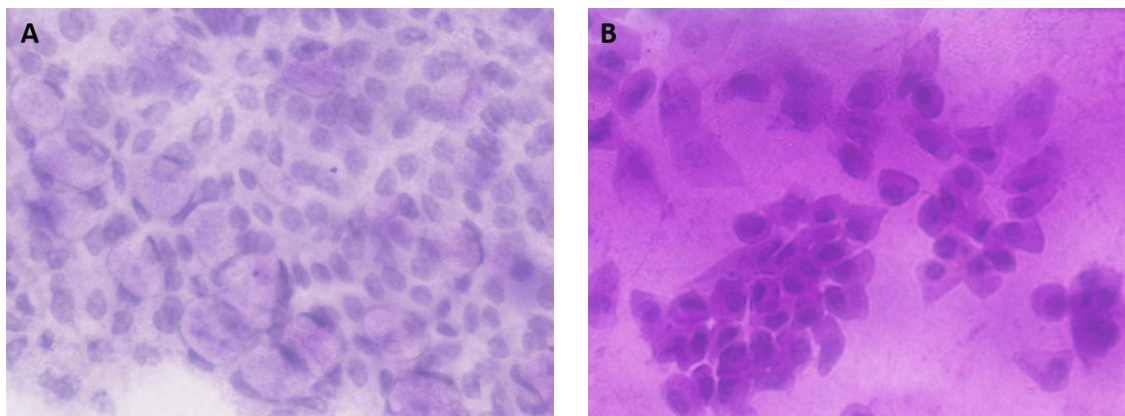


Figura 60: Muestras de superficie ocular obtenidas por CIC de los individuos del grupo problema (modelo BAC) para los diferentes tiempos de estudio evaluados. A) Tiempo cero (grado 0); B) Tiempo 30 días (grado 2).

Estos resultados ponen de manifiesto los daños que se produce en el epitelio corneal de las cobayas tras el tratamiento tópico ocular con solución de BAC al 0,1% durante 30 días.

○ *Comentario general*

Tras la instilación ocular en cobayas de una solución de BAC al 0,1% dos veces al día durante un periodo de 30 días no se consigue generar todos los síntomas típicos de la enfermedad de ojo seco.

A nivel de las pruebas clínicas de osmolaridad y volumen lagrimal no se manifiestan cambios significativos, pero sí se aprecian alteraciones de la superficie ocular objetivables tanto por la tinción con fluoresceína como por citología de impresión conjuntival.

Tanto en la prueba de tinción con fluoresceína como en la citología de impresión conjuntival se puede observar que las alteraciones producidas a los 7 días mejoran ligeramente a los 15 días, posiblemente por las defensas de la propia especie animal frente al tratamiento administrado, pero no se consigue conservar la mejora cuando se prolonga dicho tratamiento hasta un tiempo de 30 días.

Con el objetivo de reforzar el modelo de la enfermedad de ojo seco en relación con la sintomatología asociada con la osmolaridad y la secreción lagrimal, se decidió plantear la administración simultánea de una solución de BAC al 0,1% por vía tópica ocular junto con la administración subcutánea de Escopolamina, compuesto con acción parasimpaticolítica que provoca una disminución de la secreción lagrimal.

- **Modelo BAC + Escopolamina**

A fin de conseguir un modelo más completo de la enfermedad de ojo seco en cobayas hembras Dunkin Hartley se procedió la administración subcutánea de Escopolamina junto con la instilación ocular de la solución de BAC al 0,1% (modelo BAC + Escopolamina).

A las cobayas del grupo problema (n = 12 ojos) se les administró por vía ocular 10 µL de la solución isotónica de BAC al 0,1% en NaCl, dos veces al día, durante un periodo de 15 días. Así mismo, y de forma simultánea, se les inyectó en la zona dorsal del animal 200 µL de una solución isotónica de Escopolamina de 7,5 mg/mL de concentración.

En cambio, las cobayas del grupo control (n = 6 ojos) no recibieron tratamiento, simplemente se les instiló 10 µL de una solución isotónica de NaCl dos veces al día.

En la **Figura 61** se muestra el procedimiento seguido para el desarrollo y caracterización del modelo BAC + Escopolamina.

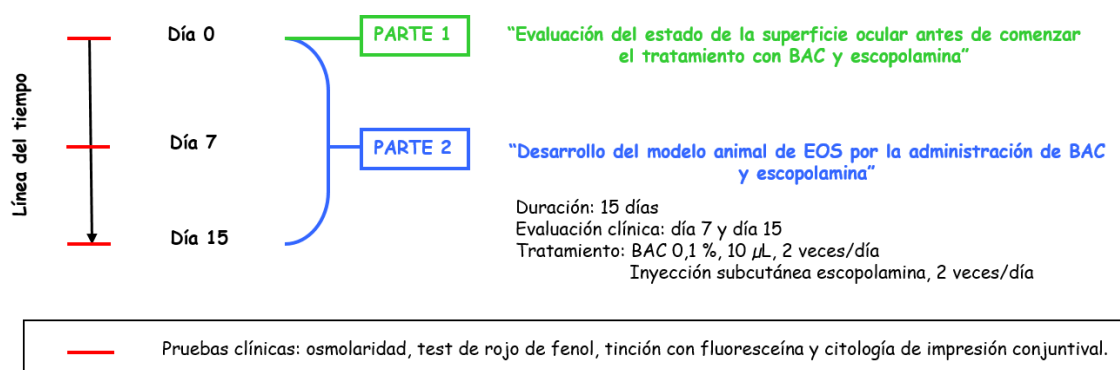


Figura 61: Organigrama utilizado para el desarrollo y la caracterización de un modelo de ojo seco en cobayas inducido mediante la administración tópica oftálmica de BAC al 0,1% y la administración subcutánea de Escopolamina.

Antes de comenzar la fase de desarrollo del modelo de ojo seco en los animales de experimentación seleccionados, se evaluó la salud ocular de todos dichos animales (n = 18 ojos) de acuerdo con las pruebas clínicas de osmolaridad lagrimal, test de rojo de fenol, tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntiva, sirviendo estas dos últimas pruebas para determinar el estado de la superficie ocular.

Tabla 59: Resultados de las pruebas clínicas (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas inmediatamente antes de iniciar el estudio de desarrollo del modelo animal de ojo seco inducido mediante la administración tópica oftálmica de BAC al 0,1% y la administración subcutánea de Escopolamina.

Prueba clínica	Evaluación inicial (t = 0 días)
Osmolaridad (mOsm/L)	298,8 \pm 15,8
Test de rojo de fenol (mm)	23,7 \pm 6,9
Tinción con fluoresceína (puntuación promedio obtenida en las tinciones)	0,2 \pm 0,4
Puntuación total en base a criterios citológicos en la prueba de CIC	1,0 \pm 1,4

Tal y cómo se indica los resultados incluidos en la **Tabla 59**, todos los animales presentaron una superficie ocular sana al obtenerse valores de osmolaridad lagrimal y volumen lagrimal dentro de los rangos fisiológicos. Así mismo, la mayoría de los individuos mostraron tinción con grado 0 en la prueba clínica del test de tinción con fluoresceína a excepción de cuatro de los ojos evaluados que presentaron tinción positiva de intensidad grado 1, relacionada con lesiones muy leves del epitelio corneal.

Dichos resultados estuvieron alineados con lo observado por citología de impresión conjuntival, en donde todas las muestras analizadas se clasificaron como grado cero en base a la graduación de Nelson, confirmándose así el buen estado de la superficie ocular de todas las cobayas.

Por este motivo, todos los animales evaluados fueron admitidos dentro de la población de estudio.

Tras comprobar el adecuado estado de la superficie ocular de todos los animales, se formaron dos grupos, el grupo control formado por 3 cobayas y un grupo problema formado 6 cobayas.

A lo largo del estudio se caracterizó el modelo evaluándose a diferentes tiempos (7 y 15 días) la osmolaridad lagrimal, el volumen lagrimal a través del test de rojo de fenol y el estado de la superficie ocular por el test de tinción con fluoresceína y la citología de impresión conjuntival.

○ Osmolaridad

Los resultados de osmolaridad lagrimal obtenidos a lo largo del estudio para los tiempos cero, 7 y 15 días, tanto de las cobayas del grupo control como de las cobayas del grupo problema, se incluyen y representan en la **Tabla 60** y la **Figura 62**. Para la comparativa de dichos resultados se ha empleado el test de ANOVA.

Tabla 60: Valores de osmolaridad lagrimal (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC + Escopolamina) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (mOsm/L)	Grupo problema (mOsm/L)	p-valor (Test ANOVA)
0	298,8 \pm 15,0	298,8 \pm 15,0	-
7	307,7 \pm 3,7	312,7 \pm 14,3	0,418
15	316,2 \pm 15,1	311,8 \pm 18,4	0,632

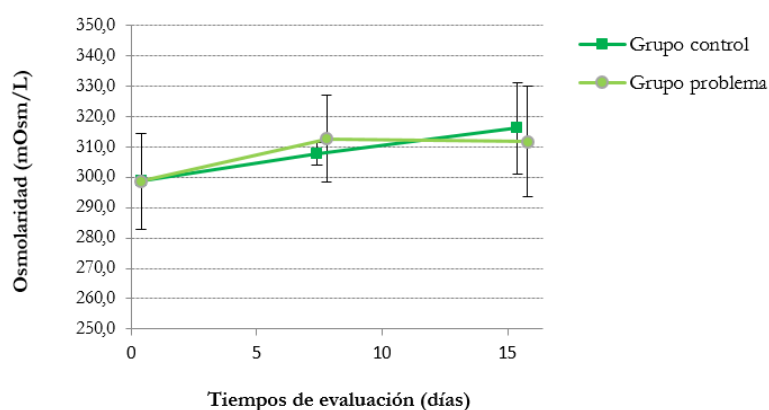


Figura 62: Representación de los valores de osmolaridad lagrimal (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC + Escopolamina) para los diferentes tiempos de estudio.

Como se observa en los datos de la **Tabla 60**, no existieron diferencias significativas entre los valores de osmolaridad de ambos grupos para los diferentes tiempos evaluados (test ANOVA: p-valor \geq 0,05). Así mismo, al comparar los valores promedio de osmolaridad lagrimal de las cobayas del grupo problema con respecto a los valores obtenidos a tiempo cero, no se apreciaron diferencias significativas a ninguno de los tiempos evaluados (test ANOVA: tiempo 7 días p-valor = 0,074 y tiempo 15 días p-valor = 0,099).

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que la administración conjunta de la solución de BAC al 0,1% y Escopolamina durante un periodo de 15 días no produce un aumento significativo de la osmolaridad lagrimal en cobayas, no habiendo cuadro patológico de la enfermedad de ojo seco detectable a través de dicha prueba clínica.

○ *Test de rojo de fenol*

La **Tabla 61** y la **Figura 63** muestran los resultados obtenidos en el test de rojo de fenol para cuantificación del volumen lagrimal a lo largo de los diferentes tiempos de estudio y el correspondiente tratamiento estadístico (test de ANOVA) entre los valores obtenidos para el grupo control y el grupo problema.

Tabla 61: Valores del test de rojo de fenol (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC + Escopolamina) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (mm)	Grupo problema (mm)	p-valor (Test ANOVA)
0	23,7 \pm 6,9	23,7 \pm 6,9	-
7	20,7 \pm 5,7	18,2 \pm 8,7	0,547
15	24,8 \pm 7,9	20,3 \pm 7,4	0,267

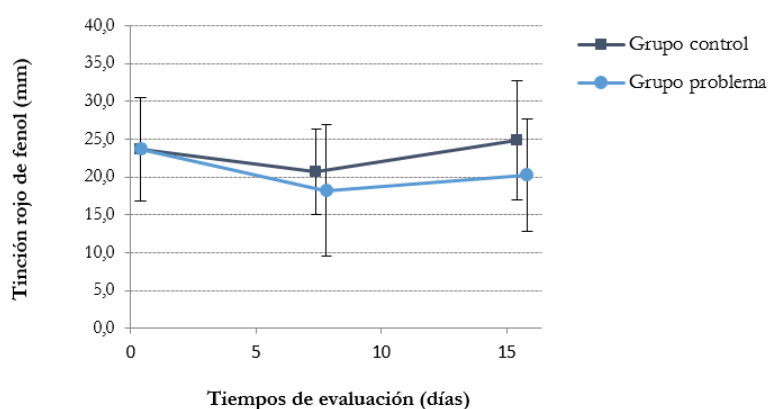


Figura 63: Representación de los valores del test de rojo de fenol (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC + Escopolamina) para los diferentes tiempos de estudio.

A lo largo del estudio se observó un descenso del volumen lagrimal promedio en las cobayas del grupo problema con respecto al grupo control, pero dicho descenso no fue significativo para ninguno de los tiempos evaluados (test ANOVA: p-valor \geq 0,05).

En cuanto a la evolución del volumen lagrimal en las cobayas del grupo problema con respecto a los valores obtenidos a tiempo cero, no se apreciaron diferencias significativas a los tiempos evaluados (test ANOVA: tiempo 7 días p-valor = 0,146; tiempo 15 días p-valor = 0,452) ya que la dispersión encontrada entre los datos individuales fue muy elevada.

Por lo tanto, con la administración conjunta de la solución de BAC al 0,1% y Escopolamina durante 15 días no se apreció modificación alguna en el volumen lagrimal como posible síntoma asociado a la enfermedad de ojo seco.

○ *Tinción con fluoresceína*

Los resultados obtenidos durante las pruebas de tinción con fluoresceína (grupos control y problema) a lo largo del estudio se recogen en la **Tabla 62** y la **Figura 64**, expresándose como promedio de los valores de graduación de Oxford obtenidos en los animales ensayados. Para el tratamiento comparativo de los resultados se emplea el test U de Mann-Whitney.

Tabla 62: Valores de la tinción con fluoresceína (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC + Escopolamina) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control (Puntuación)	Grupo problema (Puntuación)	p-valor (Test U de Mann-Whitney)
0	0,2 \pm 0,4	0,2 \pm 0,4	-
7	0,2 \pm 0,4	1,7 \pm 0,7	0,002
15	0,5 \pm 0,5	3,4 \pm 0,5	< 0,001

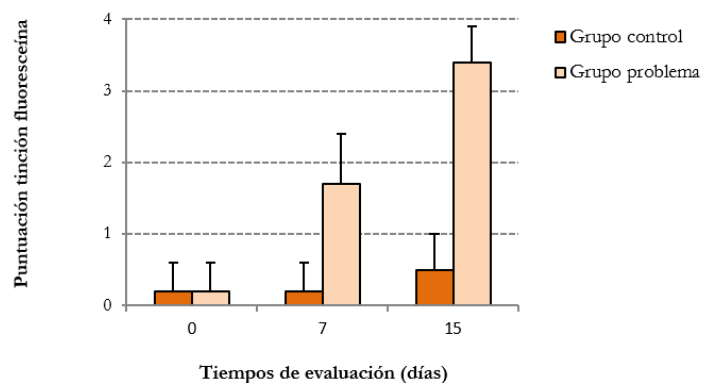


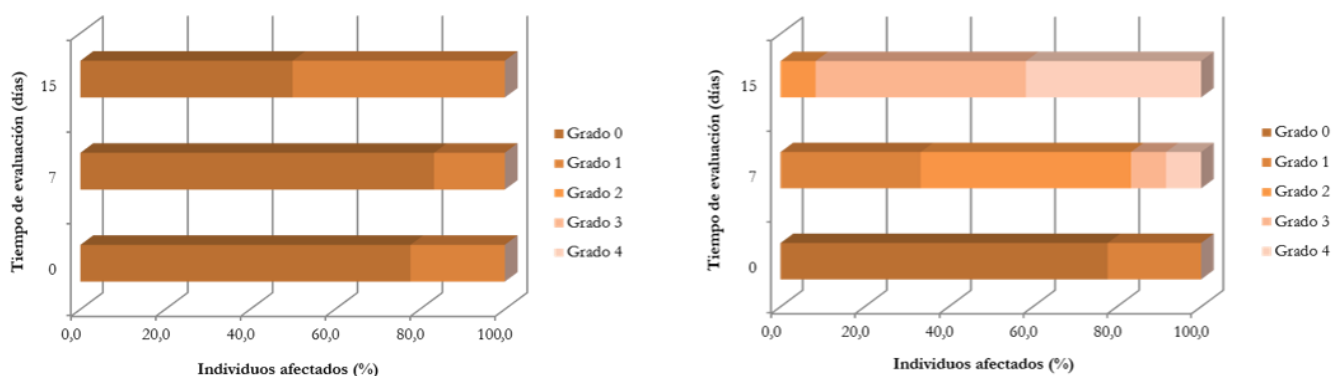
Figura 64: Representación de los valores de la tinción con fluoresceína (promedio \pm DE) obtenidos en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC + Escopolamina) a lo largo del estudio.

Según muestran los resultados recogidos en la **Tabla 62**, los valores de tinción con fluoresceína son significativamente mayores en las cobayas del grupo problema que en las cobayas del grupo control para todos los tiempos de estudio evaluados. Así mismo, los valores de tinción con fluoresceína en las cobayas del grupo control se mantuvieron estables a lo largo del estudio con respecto a los valores basales (test U de Mann-Whitney: tiempo 7 días p-valor = 0,868; tiempo 15 días p-valor = 0,334) mientras que en las cobayas del grupo problema incrementaron significativamente (test U de Mann-Whitney: p-valor < 0,001).

Por otro lado, se apreciaron diferencias en cuanto al grado de intensidad de las tinciones con fluoresceína. Mientras que el grado de intensidad de las tinciones en las cobayas del grupo control se mantuvo dentro de los grados 0 y 1 en la escala de Oxford durante todo el estudio, las cobayas del grupo problema mostraron alteraciones en el epitelio corneal cada vez más graves, siendo el porcentaje de lesiones de grado 3 y grado 4 del 91,7% al final del estudio (**Tabla 63** y **Figura 65**).

Tabla 63: Resultados de grado de intensidad en la tinción con fluoresceína expresados en porcentaje.

Tiempos de evaluación (días)	Grado de intensidad de la tinción	Grupo control (%)	Grupo problema (%)
0	0	77,8	77,8
	1	22,2	22,2
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
7	0	83,3	0,0
	1	16,7	33,3
	2	0	50,0
	3	0	8,3
	4	0	8,3
15	0	50,0	0
	1	50,0	0
	2	0	8,3
	3	0	50,0
	4	0	41,7

**Figura 65:** Grado de tinción con fluoresceína de los individuos del grupo control (izquierda) y grupo problema (derecha) en el modelo BAC + Escopolamina para los diferentes tiempos de estudio.

Por lo tanto, la instilación de la solución de BAC al 0,1% junto con la administración subcutánea de Escopolamina durante 15 días provocó en las cobayas del grupo problema daños en el epitelio corneal típicos de la patología de ojo seco siendo medibles por la prueba clínica de tinción con fluoresceína.

Es necesario remarcar que estos resultados son muy similares a los obtenidos en el modelo BAC a los 30 días de estudio, no encontrándose diferencias significativas entre ambos modelos al final de cada estudio (test U de Mann-Whitney: p-valor = 0,262).

○ *Citología de impresión conjuntival*

De acuerdo con la estimación semicuantitativa de Nelson, se han evaluado las muestras de citología celular tomadas a los diferentes tiempos del estudio (tiempo cero, 7 y 15 días) en cobayas del grupo control y problema (**Tabla 64**).

Tabla 64: Valores de la graduación de Nelson en la CIC (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (modelo BAC + Escopolamina) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempo de estudio (días)	Grupo control		Grupo problema	
	Puntuación	Grado Nelson	Puntuación	Grado Nelson
0	1,0 \pm 1,4	0	1,0 \pm 1,4	0
7	1,5 \pm 0,7	0	3,5 \pm 0,6	1
15	2,0 \pm 0,0	0	5,5 \pm 0,7	2

De modo similar a lo que se manifestaba en la tinción con fluoresceína, los resultados recogidos en la **Tabla 64** indican alteraciones celulares a los 15 días de tratamiento con la solución de BAC al 0,1% y Escopolamina, similares a las observadas en el modelo BAC tras 30 días de tratamiento. Por lo que, parece que la administración de Escopolamina es capaz de acelerar la aparición de las lesiones de la conjuntiva.

En la **Figura 66** se puede observar cómo, después de 15 días de tratamiento, se produce una disminución del número de células caliciformes y epiteliales, un descenso en la relación núcleo/citoplasma y un incremento en la presencia de células aisladas en las muestras de citología de impresión conjuntival tomadas de la superficie ocular de las cobayas del grupo problema.

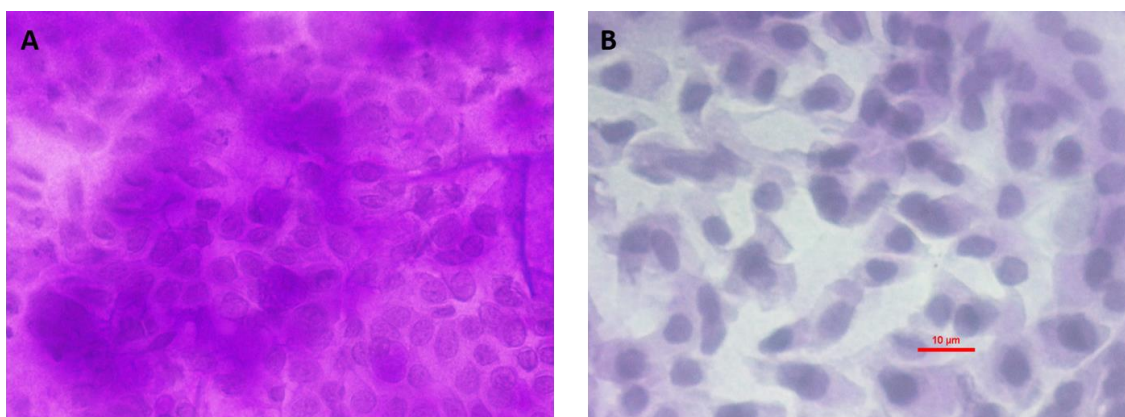


Figura 66: Muestras de superficie ocular obtenidas por CIC de los individuos del grupo problema (modelo BAC + Escopolamina) para los diferentes tiempos de estudio evaluados. A) Tiempo cero (grado 0); B) Tiempo 15 días (grado 2).

○ *Comentario general*

Tras la instilación tópica ocular de una solución de BAC al 0,1% y la administración por vía subcutánea de Escopolamina durante un periodo de 15 días en cobayas hembras Dunkin Hartley, no se logró generar todos los síntomas propios de la enfermedad de ojo seco.

A nivel de las pruebas clínicas de osmolaridad y volumen lagrimal no se manifestaron modificaciones significativas. En cambio, si se apreciaron alteraciones de la superficie ocular medibles gracias a las pruebas de tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival.

Los resultados obtenidos a tiempo 15 días en este modelo animal de desarrollo de la patología de ojo seco en cobayas (modelo BAC + Escopolamina) son similares a los obtenidos a tiempo 30 días con la administración exclusiva de una solución de BAC al 0,1% (modelo BAC). Por lo tanto, la administración de Escopolamina acelera el deterioro de la superficie ocular provocado por la solución de BAC.

b) Evaluación de la eficacia de la formulación liposomal enriquecida FL-E_{con} en el modelo animal de la enfermedad de ojo seco

La eficacia de la formulación liposomal o lágrima enriquecida **FL-E_{con}** se ha valorado en el modelo de ojo seco desarrollado con BAC en cobayas hembras Dunkin Hartley.

Tal y cómo se ha descrito anteriormente, las cobayas del grupo problema a las cuales se les administró por vía tópica ocular 10 µL de una solución isotónica de BAC al 0,1% en NaCl, dos veces al día, durante un periodo de 30 días, desarrollaron algunos síntomas propios de la patología de ojo seco medibles por las pruebas clínicas de tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival.

A fin de comprobar la reversión del modelo de ojo seco desarrollado en cobayas y estudiar la eficacia del preparado liposomal **FL-E_{con}** con respecto a una solución salina fisiológica de NaCl al 9‰, cada cobaya del grupo problema (n = 6 cobayas) recibió ambos tratamientos, uno en cada ojo, durante un periodo de 15 días siguiéndose la siguiente posología:

- Ojo derecho (OD, n = 6 ojos): administración de 10 µL de la formulación **FL-E_{con}** cuatro veces al día (9:00 h, 12:30 h; 15:30 h, 18:30 h).
- Ojo izquierdo (OI, n = 6 ojos): administración de 10 µL de la solución salina fisiológica NaCl 9‰ cuatro veces al día (9:00 h, 12:30 h; 15:30 h, 18:30 h).

Tras dicho periodo de tiempo, se decide hacer un seguimiento del estado de la superficie ocular de las cobayas durante 7 días sin haber recibido ningún tipo de tratamiento para evaluar una posible reversión del modelo espontánea.

En la **Figura 67** se ilustra detalladamente los pasos seguidos.

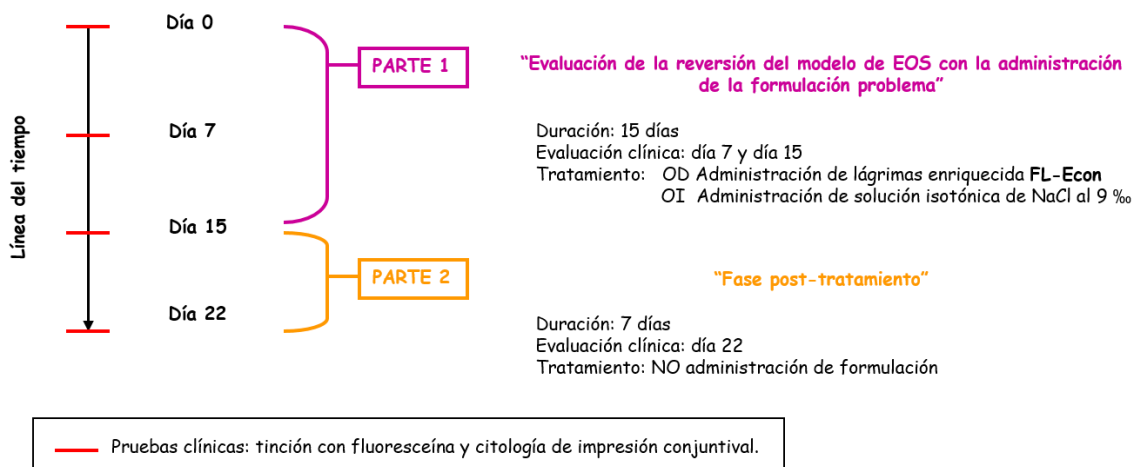


Figura 67: Organigrama utilizado para el desarrollo del ensayo de eficacia de la formulación **FL-E_{con}** en el modelo animal de ojo seco inducido por administración de BAC al 0,1 % (modelo BAC).

En paralelo al grupo problema, se evaluó la superficie ocular de las cobayas del grupo control (n = 6 ojos), las cuales recibieron 10 μ L de una solución isotónica de NaCl 9% dos veces al día a lo largo del estudio (total 22 días).

El estado de la superficie ocular de todos los animales seleccionados (n = 18 ojos) se evaluó en base a pruebas clínicas de tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival para los tiempos 7 y 15 días desde el inicio del tratamiento con ambas formulaciones a evaluar (**FL-E_{con}** y NaCl 9%) y 7 días después de finalizar el tratamiento. Debido a que a lo largo del desarrollo de modelo animal de ojo seco no se apreciaron manifestaciones a nivel de osmolaridad y volumen lagrimal, dichas pruebas no se analizaron en el estudio de reversión del modelo.

○ Tinción con fluoresceína

Los resultados obtenidos durante las pruebas de tinción con fluoresceína para las cobayas de los grupos control y grupo problema a lo largo del estudio se recogen en la **Tabla 65** y la **Figura 68**, expresándose como valor promedio de las graduaciones obtenidas en los animales ensayados. El tratamiento comparativo se realiza en base al test U de Mann-Whitney.

Tabla 65: Valores de la tinción con fluoresceína (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (OD: **FL-E_{con}**; OI: NaCl 9%) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempos de estudio (días)	Grupo control (Puntuación)	Grupo problema OD: FL-E_{con} (Puntuación)	p-valor Control versus OD (Test U de Mann-Whitney)	Grupo problema OI: NaCl 9% (Puntuación)	p-valor Control versus OI (Test U de Mann-Whitney)
0	0,5 \pm 0,5	3,7 \pm 0,5	< 0,001	3,7 \pm 0,5	< 0,001
7	0,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,5	1,000	2,3 \pm 1,0	0,010
15	0,7 \pm 0,5	0,2 \pm 0,4	0,174	1,8 \pm 0,8	0,031
22	0,8 \pm 0,8	0,5 \pm 0,5	0,522	1,2 \pm 0,4	0,471

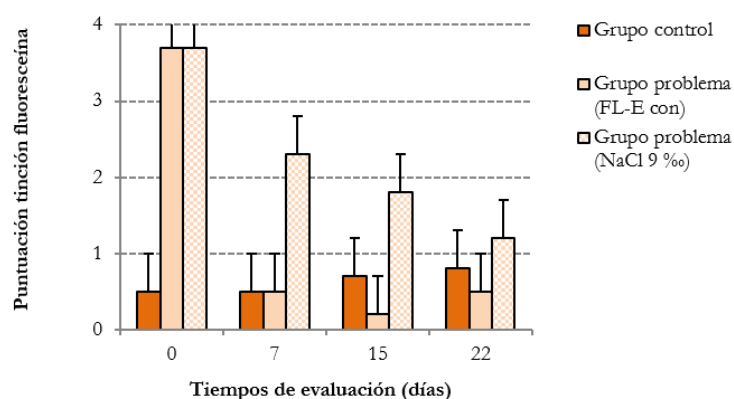


Figura 68. Representación de los valores de tinción con fluoresceína (promedio \pm DE) obtenidos durante el tratamiento de la patología de ojo seco con la formulación **FL-E_{con}** (OD) o solución salina de NaCl al 9% (OI) a los diferentes de estudio.

Tal y cómo muestran los resultados recogido en la **Tabla 65**, los valores basales de tinción con fluoresceína mostrados por las cobayas con la enfermedad de ojo seco disminuyeron a lo largo del tratamiento con la formulación liposomal **FL-E_{con}** y con la solución de NaCl al 9%.

Los ojos tratados con la lágrima artificial **FL-E_{con}**, mostraron valores de tinción con fluoresceína significativamente inferiores desde el inicio del tratamiento (test U de Mann-Whitney: tiempo 7 días p-valor = 0,001; tiempo 15 días p-valor < 0,001), obteniéndose valores similares a los mostrados por el grupo control desde la primera semana de tratamiento (p-valor = 1,000). En la fase post-tratamiento, los valores obtenidos también fueron significativamente iguales a los resultados mostrados por las cobayas del grupo control a tiempo 22 días (p-valor = 0,522). Por tanto, la administración tópica ocular de la formulación liposomal **FL-E_{con}** logró mejorar en un máximo de tiempo de 7 días los daños observados en la superficie ocular de las cobayas de grupo problema asociados a la patología de ojo seco, manteniéndose esta situación tras la suspensión del tratamiento.

En cambio, los ojos que recibieron como tratamiento la administración de una solución salina de NaCl al 9%, mostraron una reversión más lenta de los síntomas de la enfermedad de ojo seco, no alcanzándose valores de tinción con fluoresceína equivalentes a los presentados en cobayas del grupo control hasta el día 22.

De este modo, se puede concluir que la lágrima artificial **FL-E_{con}** presenta una mayor eficacia a la hora de revertir los daños en la superficie ocular asociados a la patología de ojo seco que la solución salina de NaCl al 9%.

○ *Citología de impresión conjuntival*

En base a la estimación semicuantitativa de Nelson, se han evaluado las muestras de citología celular tomadas a los diferentes tiempos del estudio (tiempo cero, 7 y 15 días de tratamiento y 7 días post-tratamiento) en cobayas del grupo control y problema (**Tabla 66** y **Figura 69**).

Tabla 66: Valores de la graduación de Nelson en la CIC (promedio \pm DE) en cobayas del grupo control y grupo problema (OD: **FL-E_{con}**; OI: NaCl 9%) para los diferentes tiempos de estudio.

Tiempos de estudio (días)	Grupo control		Grupo problema OD: FL-E_{con}		Grupo problema OI: NaCl 9%	
	Puntuación	Grado Nelson	Puntuación	Grado Nelson	Puntuación	Grado Nelson
0	2,0 \pm 0,0	0	5,5 \pm 0,7	2	5,5 \pm 0,7	2
7	1,5 \pm 0,7	0	1,0 \pm 0,0	0	4,0 \pm 0,0	1
15	1,0 \pm 0,0	0	1,0 \pm 0,0	0	2,5 \pm 0,7	0
22	2,0 \pm 0,0	0	1,5 \pm 0,7	0	2,0 \pm 0,0	0

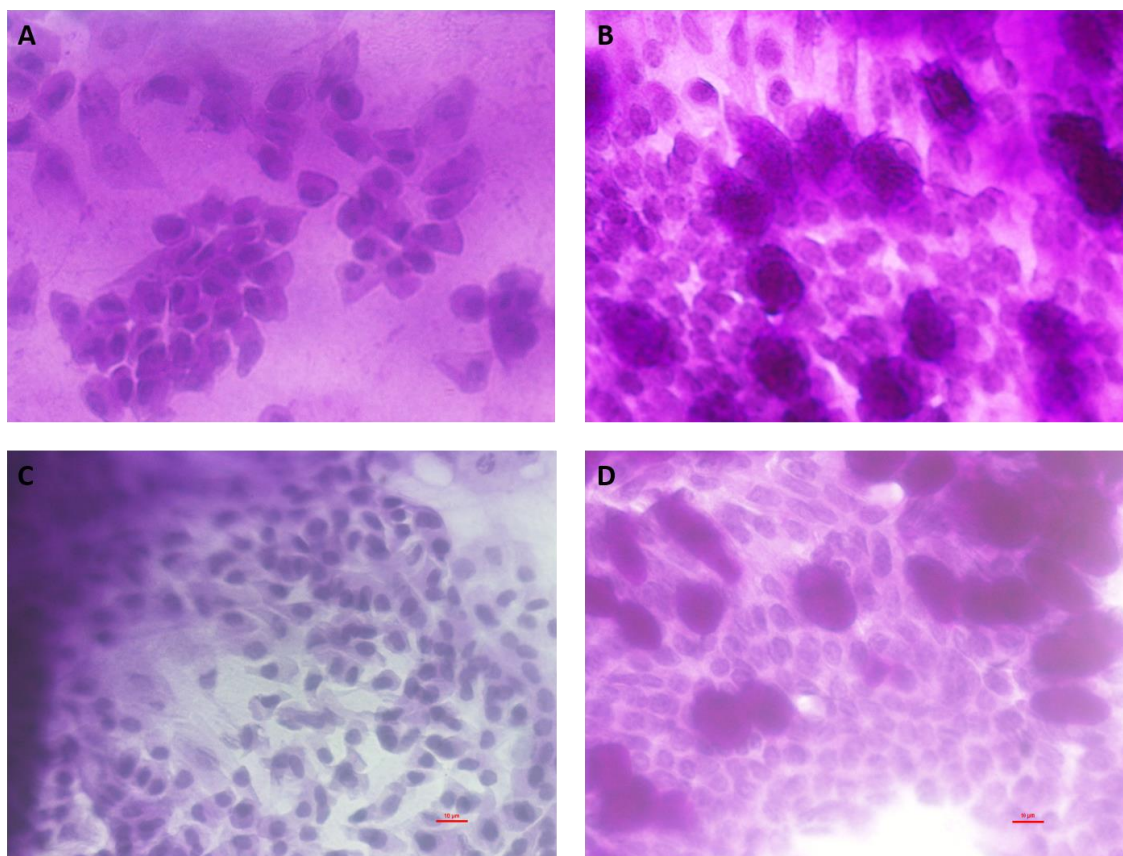


Figura 69: Muestras de superficie ocular obtenidas por CIC de los individuos del grupo problema para los diferentes tiempos evaluados. A) Tiempo cero (grado 2); B) Tiempo 7 días tratamiento con **FL-E_{con}** (grado 0); C) Tiempo 7 días tratamiento con NaCl 9‰ (grado 1); D) Tiempo 22 días fase post-tratamiento (grado 0).

Las muestras de citología de impresión celular (**Tabla 66**) indicaron una mejora en el estado de la superficie ocular tras los 7 días de tratamiento con la lágrima artificial **FL-E_{con}**. En cambio, en los ojos tratados con la solución salina NaCl 9‰, dicha mejora se observó a los 22 días de haberse iniciado el ensayo de eficacia (15 días de tratamiento y 7 días de post-tratamiento), siendo la recuperación significativamente más rápida tras la administración del preparado lagrimal **FL-E_{con}** que con la administración de la solución salina NaCl 9‰.

○ Comentario general

La administración tópica ocular de la lágrima liposomal enriquecida **FL-E_{con}** ha mostrado ser eficaz para el tratamiento de la patología de ojo seco en cobaya, mejorando las alteraciones de la superficie ocular típicas de dicha enfermedad desde la primera semana de tratamiento.

La eficacia del tratamiento con dicho preparado lagrimal es superior a la administración de una solución salina de NaCl al 9‰, para la cual, es necesario prolongar el tiempo de tratamiento hasta un mínimo de 22 días para obtener valores de tinción con fluoresceína y citología de impresión conjuntival dentro de rangos fisiológicos.

5.3.5. Ensayos de calidad de la visión con la formulación liposomal enriquecida FL-E_{con} en voluntarios sanos

Para analizar el efecto de la lágrima enriquecida **FL-E_{con}** en la superficie ocular humana se planteó un estudio prospectivo en el que participaron 18 voluntarios sanos. En él, se valoró la tolerabilidad del preparado y su efecto en la calidad de la visión y en la salud de la superficie ocular a través de la evaluación subjetiva de los pacientes tras su instilación y diferentes pruebas clínicas (osmolaridad, índice de dispersión ocular, análisis del tiempo de ruptura precorneal, estado de la capa lipídica de la película lagrimal, hiperemia ocular y tinción con fluoresceína) antes de la instilación de una gota del preparado y 15 minutos, 1 y 2 horas después.

Los resultados positivos obtenidos, tanto en la evaluación subjetiva de los pacientes como en el conjunto de pruebas clínicas realizadas, corroboran los resultados observados en el modelo animal de la enfermedad de ojo seco desarrollado en cobayas.

a) Evaluación subjetiva

Los voluntarios tuvieron una sensación agradable y de confort tras la administración de la formulación **FL-E_{con}**. Ninguno de ellos reportó efectos adversos como picor u otras molestias.

b) Estudio de la osmolaridad lagrimal

En humanos, valores de osmolaridad mayores de 316 mOsm/L se asocian a la patología de ojo seco³⁹⁸. Tras la instilación del preparado **FL-E_{con}**, la osmolaridad lagrimal de los pacientes se mantuvo dentro los valores de tonicidad fisiológica al menos durante 120 minutos, siendo la disminución de sus valores basales de hasta de un 7% (**Tabla 67** y **Figura 70**).

Tabla 67: Valores de osmolaridad lagrimal (promedio \pm DE) en pacientes sanos a lo largo del estudio.

Tiempo de estudio (min)	0	15	60	120
Osmolaridad (mOsm/L)	318,6 \pm 18,2	302,5 \pm 16,3 (5,1 % disminución)	308,3 \pm 16,7 (3,3 % disminución)	297,1 \pm 20,2 (6,7 % disminución)

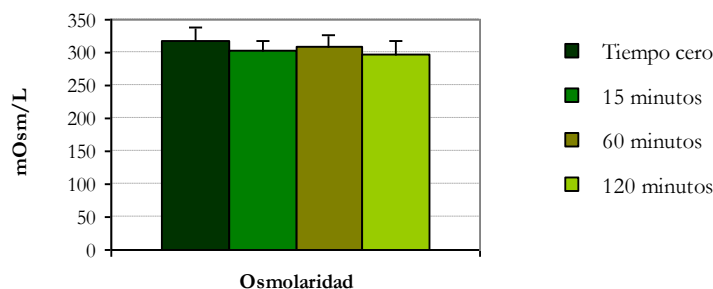


Figura 70: Representación de los valores de osmolaridad lagrimal (promedio \pm DE) en pacientes sanos antes (tiempo cero) y después de la instilación de la formulación **FL-E_{con}** (15, 60 y 120 minutos).

³⁹⁸ Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C, *et al.* TFOS DEWS II Definition and Classification report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):273-83.

c) Determinación de la calidad óptica del ojo

La calidad óptica del ojo se ha evaluado a través del índice de dispersión ocular (OSI). Los valores de OSI disminuyeron significativamente tras la instilación del preparado (test t-Student - contraste de medias: p-valor < 0,05) lo que se relaciona con una mejora en la calidad visual del paciente. El descenso duró al menos 60 minutos desde la aplicación de la formulación **FL-E_{con}**.

Los resultados promedios obtenidos se recogen en la **Tabla 68** y **Figura 71**. En la **Figura 72** se muestra, a modo de ejemplo, la valores de OSI obtenidos en el voluntario 4.

Tabla 68: Valores del índice OSI (promedio \pm DE) en pacientes sanos a lo largo del estudio.

Tiempo de estudio (min)	0	15	60	120
OSI	3,5 \pm 1,9	1,9 \pm 0,8 (p-valor < 0,05)	2,3 \pm 1,6 (p-valor < 0,05)	3,6 \pm 1,7 (N.S.)

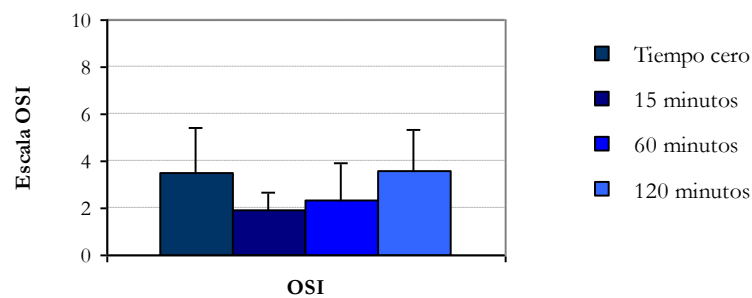


Figura 71: Representación de los valores del índice de calidad visual (promedio \pm DE) en pacientes sanos antes (tiempo cero) y después de la instilación de la formulación **FL-E_{con}** (15, 60 y 120 minutos).

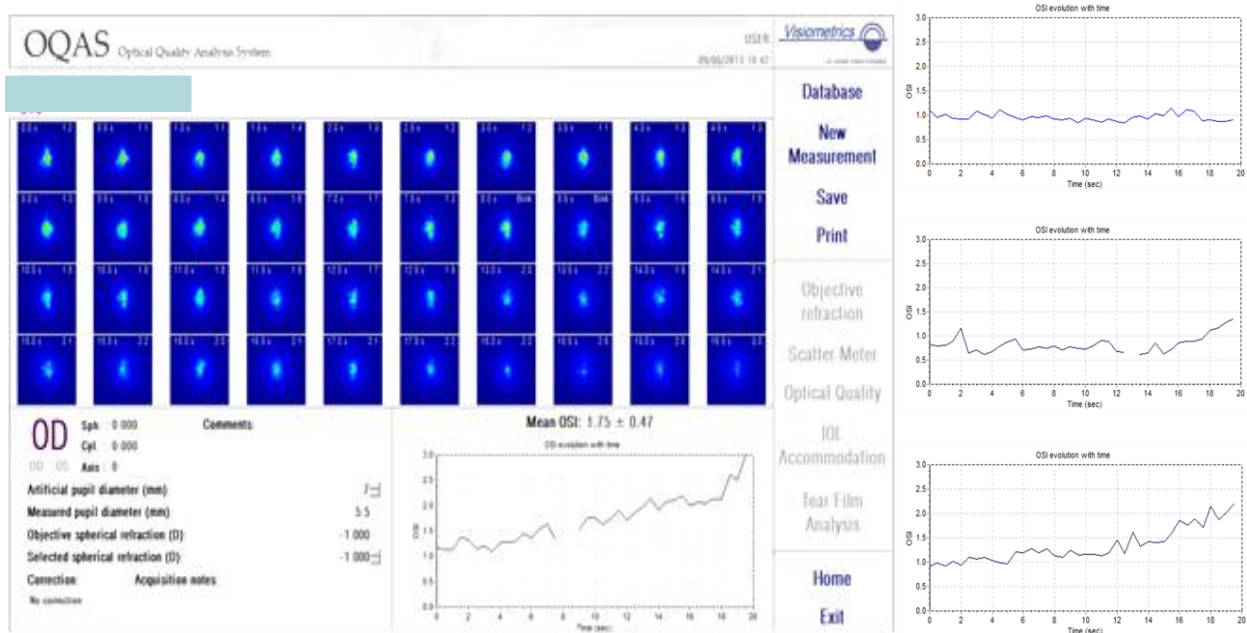


Figura 72: Ejemplo de la medida del índice OSI en el voluntario 4 a los tiempos estudiados (antes y 15, 60 y 120 minutos después de la administración de la formulación **FL-E_{con}**).

d) Análisis del tiempo de ruptura precorneal

Para definir la calidad de la película lagrimal es importante determinar el tiempo de ruptura precorneal, asociándose tiempos bajos de ruptura con deficiencias en la película precorneal.

Para cada tiempo de estudio, a cada paciente se le instiló en el fondo del saco conjuntival una gota de la solución oftálmica de fluoresceína sódica al 1% llamada Colircusi Fluotest®. Después de unos segundos, el paciente parpadeó 3 veces para, a continuación, medir el tiempo de ruptura precorneal con el topógrafo Oculus Keratograph 5.

Antes de la instilación de la formulación liposomal enriquecida **FL-E_{con}**, los voluntarios presentaron un valor promedio de tiempo de ruptura precorneal inferior a 10 segundos, indicando la presencia de una película lagrimal inestable^{399,400}. En cambio, tras la administración de una gota del dicho preparado, los tiempos de ruptura precorneal aumentaron significativamente (test t-Student - contraste de medias: p-valor < 0,05), manteniéndose el efecto durante al menos 60 minutos después de su instilación (**Tabla 69** y **Figura 73**).

Tabla 69: Valores del índice BUT (promedio ± DE) en pacientes sanos a lo largo del estudio.

Tiempo de estudio (min)	0	15	60	120
BUT (s)	8,9 ± 2,6	12,2 ± 1,9 (p-valor < 0,05)	11,3 ± 2,3 (p-valor < 0,05)	9,6 ± 2,3 (N.S.)

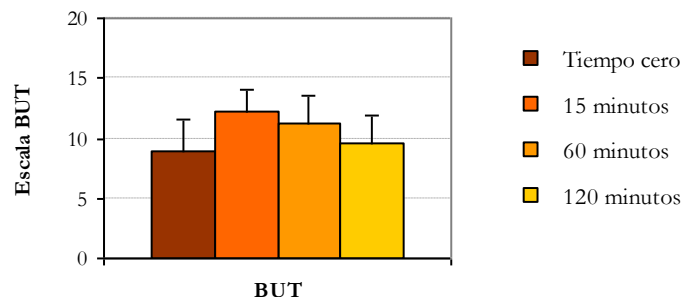


Figura 73: Representación de los valores del índice BUT obtenidos en voluntarios sanos antes (tiempo cero) y después de la instilación de la formulación **FL-E_{con}** (15, 60 y 120 minutos).

En la **Figura 74** se muestra, a modo de ejemplo, los tiempos de ruptura precorneal obtenidos en el voluntario 4 a lo largo del estudio, tanto antes de la instilación de la lágrima enriquecida **FL-E_{con}** como a los 15, 60 y 120 minutos después de su administración.

³⁹⁹ Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45 Suppl 2:221-6.

⁴⁰⁰ Vico E, Quereda A, Benítez-Del-Castillo JM, Fernández Pérez C, García-Sánchez J. Estudio comparativo entre el hialuronato sódico al 0,15% y el alcohol polivinílico como tratamiento para el ojo seco. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2005;80(7):387-94.

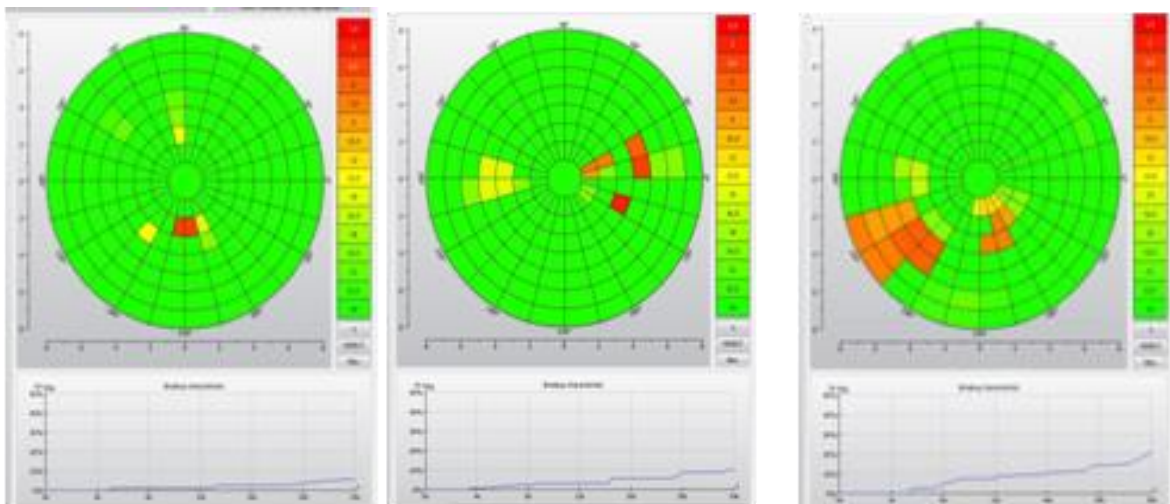
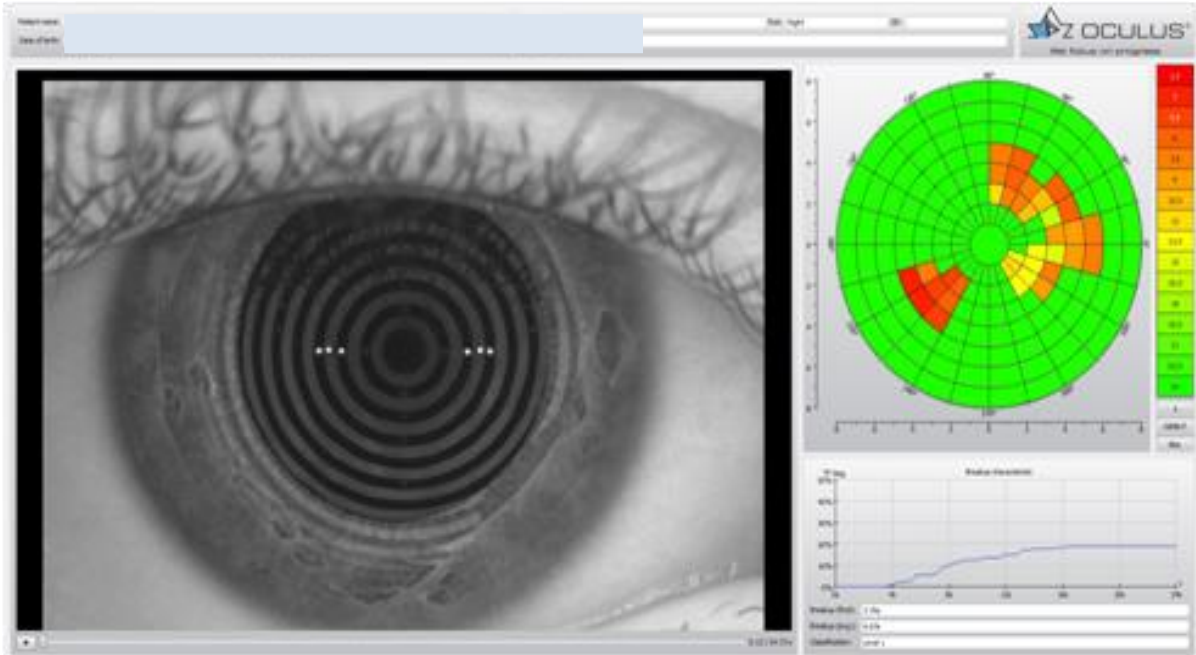


Figura 74: Determinación objetiva del BUT en el voluntario 4 a los tiempos estudiados (antes y 15, 60 y 120 minutos después de la administración de la formulación **FL-Econ**).

e) Estudio de la capa lipídica de la película lagrimal e hiperemia ocular

Durante la observación de la superficie ocular de los diferentes voluntarios sanos incluidos en el estudio clínico con el topógrafo Oculus Keratograph 5, no se observaron diferencias en la distribución de los lípidos de la película lipídica lagrimal a los diferentes tiempos de estudio evaluados, es decir, ni antes de la administración tópica ocular de la lágrima enriquecida **FL-E_{con}** y ni después de 15, 60 y 120 minutos desde su instilación,

Así mismo, tampoco se detectaron signos de hiperemia ocular en ninguno de los voluntarios a lo largo del ensayo, al clasificarse como grado 0 todas las valoraciones realizadas.

f) Tinción con fluoresceína

La última de las pruebas clínicas realizada en los voluntarios sanos para evaluar el estado de su superficie ocular fue la tinción con fluoresceína.

La fluoresceína es un colorante hidrosoluble de color naranja que al entrar en contacto con la película lagrimal se vuelve verde fluorescente tiñendo las zonas del estroma corneal con ausencia de la cobertura lipídica natural, por lo que gracias a su uso es posible detectar daños en las células del epitelio corneal y alteraciones entre las uniones celulares de dicho epitelio.

Tal y cómo se detalló anteriormente, para cada tiempo de estudio, a cada paciente se le instiló en el fondo del saco conjuntival una gota de la solución oftálmica de fluoresceína sódica al 1% llamada Colircusi Fluotest®. Transcurridos dos minutos y la posterior medición del tiempo de ruptura preocular, la evaluación del estado de la capa lipídica de la película lagrimal y la determinación de la hiperemia ocular usándose el topógrafo Oculus Keratograph 5, se evaluó el estado de la superficie ocular realizando un examen macroscópico de la superficie ocular con la ayuda de una lámpara de hendidura y un filtro de luz azul cobalto.

En dicha evaluación, no se detectó daño alguno en la superficie corneal de ninguno de los voluntarios, ya que todas las valoraciones fueron clasificadas como grado 0 según el sistema de puntuación semicuantitativo de la escala de Oxford.

5.4.FORMULACIÓN LIPOSOMAL CON CICLOSPORINA A

5.4.1. Diseño de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A

La enfermedad de ojo seco está relacionada con procesos de inflamación crónica, ya sea en su origen o durante su desarrollo, por lo que cada vez es más frecuente la terapia con agentes antiinflamatorios cuando la sintomatología no revierte solo con el uso de lágrimas artificiales.

En dichos casos, dependiendo de la gravedad de las lesiones oculares, la terapia de elección empleada para modular la respuesta inflamatoria suele ser la administración de corticoides por vía tópica o sistémica. Sin embargo, debido a sus múltiples efectos secundarios, cada vez es más frecuente el empleo de fármacos inmunomoduladores como por ejemplo la Ciclosporina A.

La Ciclosporina A es un agente inmunomodulador y antiinflamatorio que actúa bloqueando la proliferación de las células T, favoreciendo la apoptosis de linfocitos e inhibiendo la apoptosis de células epiteliales tanto en conjuntiva como en glándula lacrimal. Su uso a diferentes concentraciones (0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,4%) ha mostrado ser eficaz en pacientes con ojo seco severo-moderado, siendo la dosis de 0,1% la que presentó mayor eficacia frente a los signos mientras que la fórmula con 0,05% aportó una mayor mejoría de los síntomas del paciente^{401,402}.

Al ser un derivado peptídico, la Ciclosporina A presenta baja hidrosolubilidad y baja permeabilidad lo que origina una reducida biodisponibilidad ocular cuando se administra por vía tópica ocular. Para favorecer su absorción a través de la córnea, se suele recurrir al empleo de aceites o emulsiones, pero a ellos se asocian los pocos frecuentes, leves y transitorios efectos adversos derivados de la administración tópica ocular de formulaciones con Ciclosporina A leves (picor, rojez ocular, escozor, sensación de quemazón).

La formulación de Ciclosporina A en liposomas, además de minimizar los efectos secundarios anteriormente citados, facilita la vehiculización del principio activo en medio acuoso y mejora la penetración del fármaco a través de membranas optimizando su absorción y biodisponibilidad. A su vez, la dispersión de estos preparados en soluciones poliméricas con propiedades mucoadherentes puede incrementar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular y, consecuentemente, la absorción, la biodisponibilidad y la eficacia de la Ciclosporina A^{403,404}.

⁴⁰¹ Stevenson D, Tauber J, Reis BL. Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group. *Ophthalmology*. 2000;107(5):967-74.

⁴⁰² 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(4):631-9.

⁴⁰³ Pleyer U, Elkins B, Rückert D, Lutz S, Grammer J, Chou J, *et al.* Ocular absorption of cyclosporine A from liposomes incorporated into collagen shields. *Curr Eye Res*. 1994;13(3):177-81.

⁴⁰⁴ Milani JK, Pleyer U, Dukes A, Chou HJ, Lutz S, Rückert D, *et al.* Prolongation of corneal allograft survival with liposome-encapsulated cyclosporine in the rat eye. *Ophthalmology*. 1993;100(6):890-6.

Así mismo, teniendo en cuenta que los pacientes con enfermedad de ojo seco presentan una superficie ocular dañada y su tratamiento suele prolongarse en el tiempo, es recomendable el empleo de colirios antiinflamatorios sin conservantes.

5.4.2. Preparación de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A

a) Método de elaboración

La elaboración de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A al 0,1% se ha desarrollado según el método general descrito en el apartado 3.3.

Inicialmente, para determinar la cantidad de Ciclosporina A capaz de incorporarse en la fase lipídica de las vesículas lipídicas se realizaron ensayos previos, comprobándose que la adición de Ciclosporina A en concentraciones superiores al 5% del contenido de fosfatidilcolina impide su total incorporación a la bicapa lipídica dando lugar a la aparición de cristales en la formulación (principio activo parcialmente no vehiculizado).

La Ciclosporina A se ha solubilizado junto con el resto de los componentes lipófilos de la formulación (fosfatidilcolina, colesterol y vitamina E) en cloroformo para, posteriormente, proceder a la evaporación del solvente orgánico a presión reducida en el rotavapor y a la dispersión de la película lipídica con la solución A. En esta dispersión, la Ciclosporina A se encuentra incorporada en la bicapa lipídica de las vesículas liposomales.

Finalmente, se han elaborado dos formulaciones liposomales con Ciclosporina A al 0,1% diferentes (**FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**) al emplear en la etapa de ajuste de concentración la solución A y la solución B respectivamente (**Figura 75**).

La solución A está compuesta por H₃BO₃ al 8,38‰, Na₂B₄O₇ al 0,755‰ y trehalosa al 16‰. A diferencia de la solución A, la solución B incorpora el polímero bioadhesivo hialuronato sódico lo que permite aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie precorneal facilitando la penetración de la sustancia activa a través de las membranas celulares.

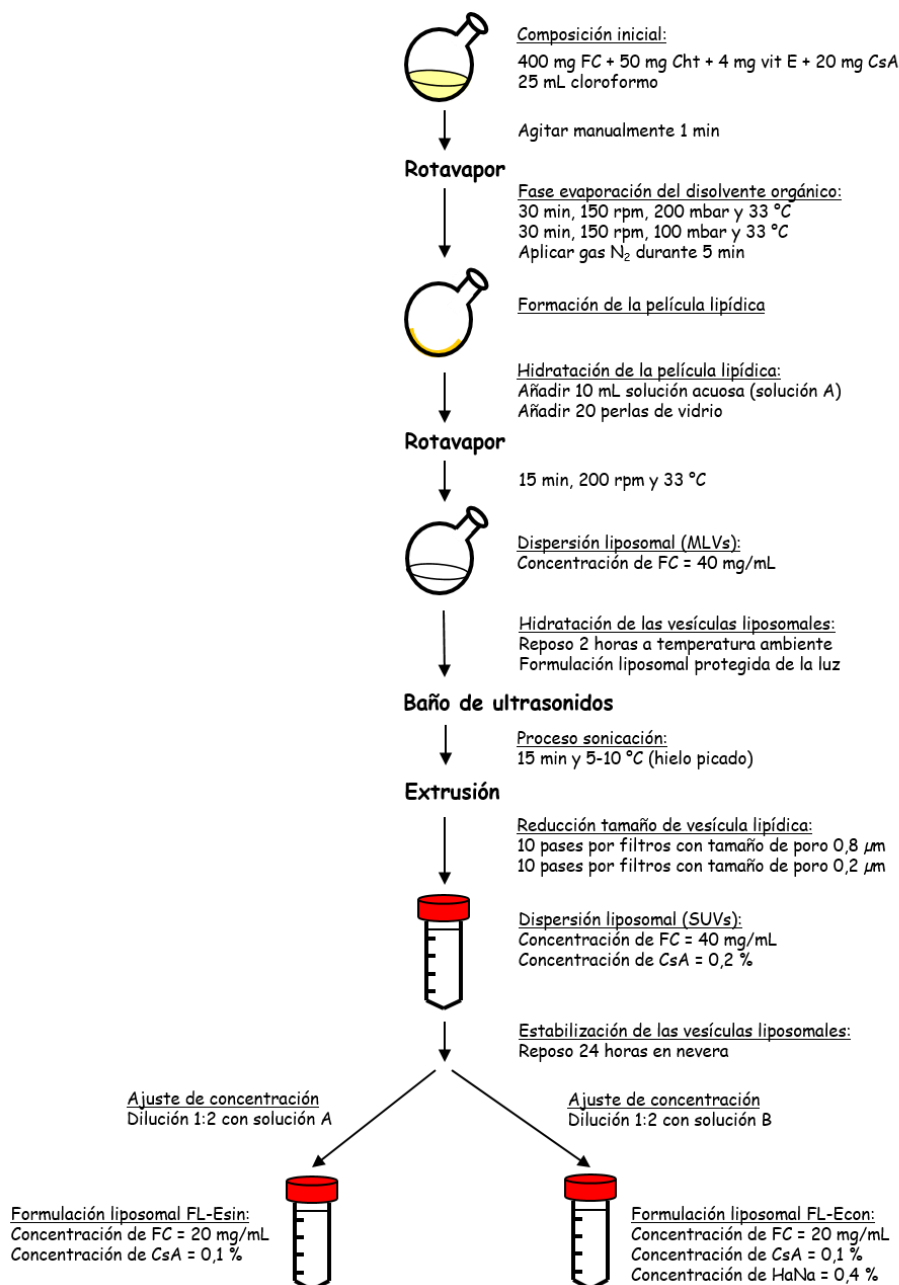


Figura 75: Esquema de preparación de las formulaciones liposomales *FL-CsA_{sin}* y *FL-CsA_{con}*.

b) Rendimiento del proceso

Se ha determinado la concentración de Ciclosporina A en la formulación liposomal **FL-CsA_{sin}** elaborada sin polímero. La cuantificación se ha realizado por HPLC siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.3.

La concentración de Ciclosporina A en la formulación recién preparada y expresada como porcentaje de la calculada teóricamente fue del 96,3% lo que supone una pérdida a lo largo del proceso de fabricación del aproximadamente 4%.

5.4.3. Caracterización de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A

La caracterización de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A, **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**, se ha realizado mediante el estudio de sus propiedades fisicoquímicas (pH, osmolaridad, tensión superficial y viscosidad), determinación del tamaño de las vesículas lipídicas y realización de los estudios de tolerancia *in vitro* e *in vivo*. Así mismo, se ha cuantificado el contenido de Ciclosporina A en la formulación sin el polímero hialuronato sódico (**FL-CsA_{sin}**).

Para ello, se han elaborado 3 lotes de cada formulación liposomal, estudiándose las variables anteriormente indicadas a tiempo cero y a diferentes tiempos de estabilidad tras su almacenamiento a temperatura ambiente (25 °C) y nevera (2 – 8 °C) protegidas de la luz durante 6 meses. De este modo, se determina la influencia de las condiciones de almacenamiento y la presencia o no de polímero en la estabilidad de los preparados liposomales.

Los tiempos a los que se realizan los análisis de los diferentes parámetros se recogen en la **Tabla 70**.

Tabla 70: Parámetros evaluados para la caracterización de las formulaciones **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**.

Condiciones de almacenamiento	Parámetros	Recién preparados	Tiempo 15 días	Tiempo 1 mes	Tiempo 3 meses	Tiempo 6 meses
Nevera / Temperatura ambiente	pH	X	-	X	-	X
	Osmolaridad	X	-	X	-	X
	Tensión superficial	X	-	X	-	X
	Viscosidad	X	-	X	-	X
	Tamaño de las vesículas lipídicas	X	-	-	-	-
	Tolerancia <i>in vitro</i>	X	-	X	X	X
	Tolerancia <i>in vivo</i>	X	-	-	-	-
	Contenido Ciclosporina A ⁽¹⁾	X	X	X	X	X

⁽¹⁾ Determinación del contenido de Ciclosporina A en la formulación liposomal con Ciclosporina A y sin polímero (**FL-CsA_{sin}**).

a) Ensayos *in vitro* de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A

- Determinación del pH

En la **Tabla 71** se muestran los resultados de pH obtenidos a los diferentes tiempos de muestreo (tiempo cero, 1 mes y 6 meses) para ambas formulaciones almacenadas bajo las dos condiciones ensayas (nevera y temperatura ambiente). Las medidas de pH se han realizado por duplicado a temperatura ambiente (25 °C), de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.4.1.

Tabla 71: Valores de pH (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Valores de pH	
		FL-CsA _{sin}	FL-CsA _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	7,36 \pm 0,03	7,36 \pm 0,04
Nevera	1 mes	7,34 \pm 0,04	7,37 \pm 0,03
	6 meses	7,38 \pm 0,02	7,41 \pm 0,01
Temperatura ambiente	1 mes	7,39 \pm 0,01	7,33 \pm 0,04
	6 meses	7,33 \pm 0,09	7,40 \pm 0,02

En la elaboración de las lágrimas artificiales **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**, se han utilizado las denominadas soluciones tamponadas A y B, cuyo pH está próximo al de la lágrima natural (7,4).

Ambas formulaciones recién elaboradas presentaron valores de pH neutros, similares a los de las soluciones tamponadas empleadas. La administración ocular de preparados con valores de pH próximos a la neutralidad ayuda a mantener las propiedades ópticas de la superficie ocular y favorece el buen funcionamiento de las células epiteliales de la superficie ocular. Así mismo, los preparados con valores de pH neutro evitan la sensación de discomfort que algunas formulaciones producen tras su instilación sobre la superficie ocular.

A tiempo cero, no se observan diferencias significativas entre ambas formulaciones (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05) por lo que, la presencia del polímero hialuronato sódico no influye en el pH de la formulación.

Los valores de pH de ambas formulaciones se mantuvieron estables tras 6 meses de almacenamiento bajo condiciones de oscuridad y en nevera o temperatura ambiente (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05).

- **Determinación de la osmolaridad**

La osmolaridad de cada uno de los lotes fabricados se ha realizado según se describe en el apartado 3.4.2, por triplicado y a la temperatura de 33 °C para simular las condiciones de la superficie ocular.

Los resultados de osmolaridad de ambos preparados (**FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**) obtenidos a los diferentes tiempos de ensayo y bajo condiciones de almacenamiento en nevera y temperatura ambiente se recogen en la **Tabla 72**.

Tabla 72: Valores de osmolaridad (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Osmolaridad (mOsm/L)	
		FL-CsA _{sin}	FL-CsA _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	203,9 \pm 9,3	200,5 \pm 2,8
Nevera	1 mes	201,8 \pm 2,7	202,6 \pm 2,1
	6 meses	199,7 \pm 2,7	197,2 \pm 2,1
Temperatura ambiente	1 mes	201,1 \pm 1,7	204,6 \pm 4,9
	6 meses	196,6 \pm 2,8	200,4 \pm 6,4

Las formulaciones liposomales **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** han sido diseñadas como preparados hipoosmolares a fin de reestablecer el equilibrio fisiológico de isotonicidad de la lágrima en pacientes con enfermedad de ojo seco, cuya lágrima es hiperosmolar. El ajuste de tonicidad se logra gracias a la presencia de boratos y trehalosa en las soluciones acuosas A y B, empleadas durante la fabricación de dichos preparados.

A tiempo cero, ambos preparados son hipotónicos con valores de osmolaridad próximos a 200 mOsm/L, no existiendo diferencias significativas entre ellos (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05), lo que indica que la presencia de polímero hialuronato sódico a la concentración de 0,4% no impacta en los valores de osmolaridad.

Tras almacenar ambas lágrimas artificiales bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente o nevera durante 6 meses, no se observaron variaciones significativas en los valores de osmolaridad en ninguna de las dos formulaciones (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05).

- ***Determinación de la tensión superficial***

Cada muestra se analiza por duplicado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.3. Las medidas de tensión superficial se realizaron a 33 °C por ser la temperatura a la que se encuentra la superficie ocular.

Los resultados de tensión superficial obtenidos para ambos preparados a tiempo cero y tras 1 y 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente y nevera se recogen en la **Tabla 73**.

Tabla 73: Valores de tensión superficial (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones *FL-CsA_{sin}* y *FL-CsA_{con}* almacenados en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Tensión superficial (mN/m)	
		FL-CsA _{sin}	FL-CsA _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	29,8 \pm 1,4	28,9 \pm 0,8
Nevera	1 mes	29,3 \pm 0,8	28,8 \pm 0,9
	6 meses	30,1 \pm 1,4	29,6 \pm 0,7
Temperatura ambiente	1 mes	29,2 \pm 1,3	29,2 \pm 0,4
	6 meses	29,8 \pm 1,3	30,2 \pm 0,8

A tiempo cero, los valores de tensión superficial de los preparados elaborados **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** son inferiores al valor de tensión crítica superficial del epitelio corneal (38 mN/m) lo que pronostica una buena extensión de ambas lágrimas artificiales sobre la superficie ocular y adecuada mojabilidad de estas en el momento de ser administradas. Entre los valores de tensión superficial a tiempo cero de ambas lágrimas artificiales no se aprecian diferencias significativas (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05), por lo que no afecta la presencia del polímero hialuronato sódico en dicho parámetro.

A lo largo de los 6 meses de almacenamiento en nevera o temperatura ambiente, no se observaron diferencias significativas en cuanto a los valores de tensión superficial para ninguna de las dos formulaciones desarrolladas (test t-Student – contraste de medias: p-valor \geq 0,05).

• **Determinación de la viscosidad**

Las medidas de viscosidad se han realizado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.4. Los resultados obtenidos para ambas formulaciones a los diferentes tiempos evaluados (tiempo cero, 1 y 6 meses) se incluyen en la siguiente tabla (**Tabla 74**).

Tabla 74: Valores de viscosidad (promedio \pm DE) correspondientes a las formulaciones **FL-Csa_{sin}** y **FL-Csa_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Viscosidad (mPa·s)	
		FL-Csa _{sin}	FL-Csa _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	0,950 \pm 0,073	6,249 \pm 0,316
Nevera	1 mes	0,959 \pm 0,057	6,253 \pm 0,123
	6 meses	0,886 \pm 0,035	6,273 \pm 0,248
Temperatura ambiente	1 mes	0,916 \pm 0,007	6,261 \pm 0,190
	6 meses	0,909 \pm 0,061	6,318 \pm 0,079

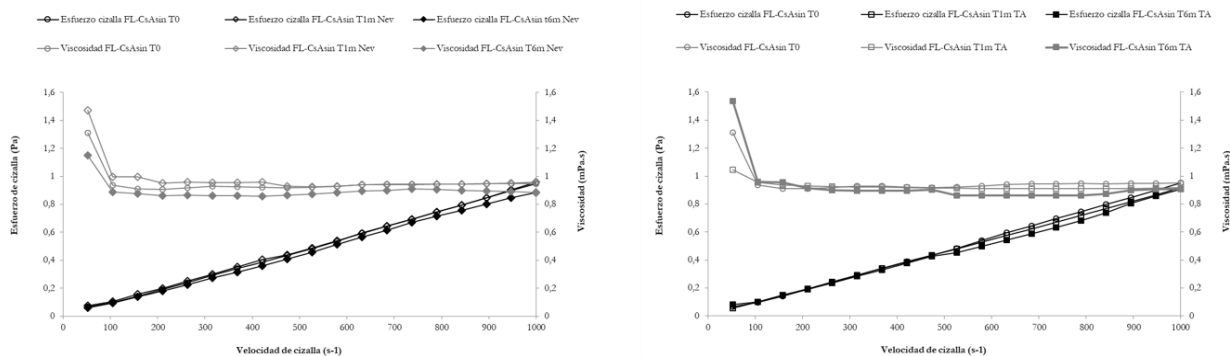


Figura 76: Reología de la formulación liposomal **FL-Csa_{sin}** almacenada en nevera (izquierda) y a temperatura ambiente (derecha) a lo largo del estudio de estabilidad.

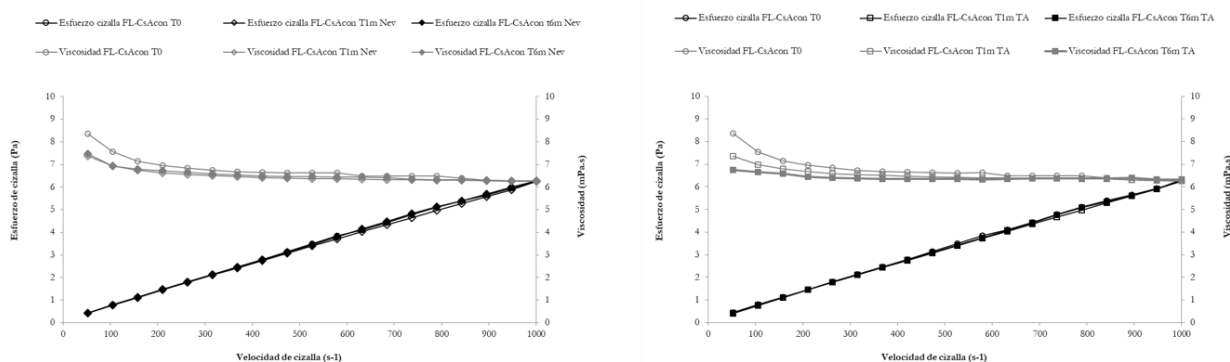


Figura 77: Reología de la formulación liposomal **FL-Csa_{con}** almacenada en nevera (izquierda) y a temperatura ambiente (derecha) a lo largo del estudio de estabilidad.

A tiempo cero, los valores de viscosidad obtenidos en ambas formulaciones son significativamente diferentes (test t-Student – contraste de medias: p-valor < 0,05). El preparado **FL-CsA_{sin}** presenta valores similares a la lágrima natural (0,3 – 6 mPa·s^{405,406}) mientras que la formulación **FL-CsA_{con}** es ligeramente hiperviscosa (6 – 12 mPa·s⁴⁰⁷) debido a la presencia del polímero hialuronato sódico al 4%. Ambos valores se encuentran dentro del rango recomendado (< 20 mPa·s⁴⁰⁸) considerándose adecuada su extensibilidad y mezcla con la lágrima natural.

Los valores de viscosidad de las formulaciones **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** se mantuvieron constantes tras 6 meses de almacenamiento bajo condiciones de oscuridad a temperatura ambiente y en nevera (test t-Student – contraste de medias: p-valor ≥ 0,05).

- **Determinación del tamaño de las vesículas lipídicas**

Durante su fabricación, el preparado es forzado a pasar por unas membranas de policarbonato con diferentes tamaños de poro, primero por un filtro con un tamaño de poro de 0,8 µm para posteriormente pasar por un filtro de 0,22 µm, a fin de obtener vesículas lipídicas lo suficientemente pequeñas como para no provocar molestias tras ser administrado sobre la superficie ocular y conseguir una distribución de tamaño unimodal que favorezca su estabilidad.

El tamaño de las vesículas lipídicas de las dos lágrimas artificiales preparadas con 0,1% de Ciclosporina A, **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**, se determinó a tiempo cero y a diferentes tiempos a lo largo de todo el ensayo de estabilidad (1 y 6 meses). Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 75**, siendo las distribuciones de tamaño obtenidas para ambas formulaciones unimodales.

Tabla 75: Diámetro medio de volumen de las vesículas lipídicas (promedio ± DE) de las formulaciones **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** almacenadas en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Tamaño de las vesículas lipídicas (µm)	
		FL-CsA _{sin}	FL-CsA _{con}
Recién preparada	Tiempo cero	204,2 ± 4,3	198,7 ± 6,0
Nevera	1 mes	199,1 ± 3,2	200,7 ± 1,2
	6 meses	201,7 ± 0,5	198,7 ± 9,6
Temperatura ambiente	1 mes	200,4 ± 6,0	204,7 ± 8,3
	6 meses	196,4 ± 3,0	199,9 ± 1,6

⁴⁰⁵ Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A, Ohtori A, Takeuchi H, Ohguro N, *et al.* Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(7):1266-71.

⁴⁰⁶ Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991;15(6):371-6.

⁴⁰⁷ Vibhute S, Kawtikwar P, Kshirsagar S, Sakarkar D. Formulation and evaluation of tear substitutes. *Int J Pharm Sci Revi Res.* 2010;2(1):17-20.

⁴⁰⁸ Akram M, Shyum SB, Gauhar S. Development of new ophthalmic suspension prednisolone acetate 1%. *Pak J Pharm Sci.* 2010;23(2):149-54.

• ***Ensayos de tolerancia in vitro***

La viabilidad celular de las lágrimas artificiales **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** se ha evaluado en las líneas celulares de conjuntiva y córnea para tiempos de contacto de 15 minutos, 1 hora y 4 horas simulándose de este modo tratamientos a corto (15 minutos) y largo plazo (1 y 4 horas).

Dichos estudios se han realizado con ambos preparados a tiempo cero y a diferentes tiempos durante su almacenamiento en nevera y temperatura ambiente (1, 3 y 6 meses). En cada ensayo de viabilidad se ha empleado un control negativo (solución de medio de cultivo) y un control positivo (solución isotónica de BAC al 0,005%).

○ ***Conjuntiva***

Las figuras **Figura 78** y **Figura 79** muestran la tolerancia *in vitro* de las formulaciones **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** en la línea celular conjuntival a lo largo del estudio de estabilidad.

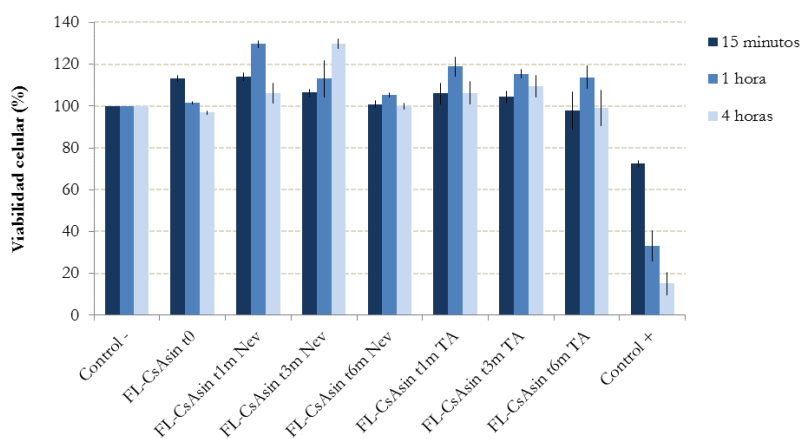


Figura 78: Viabilidad celular conjuntival (promedio ± EER) para las soluciones control y la formulación **FL-CsA_{sin}** almacenada a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 6 meses.

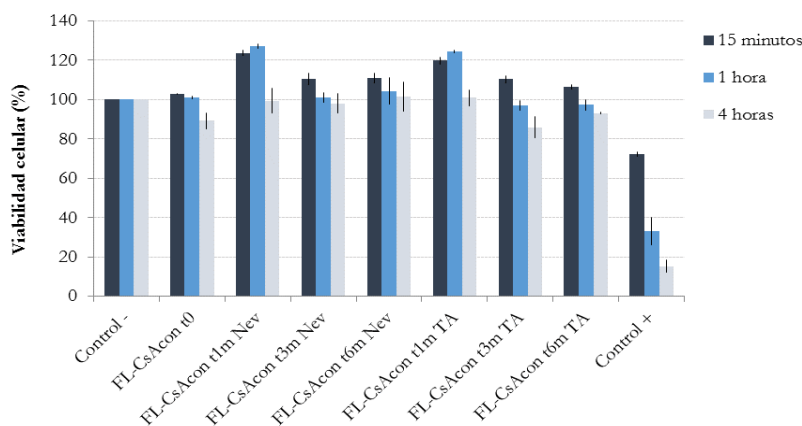


Figura 79: Viabilidad celular conjuntival (promedio ± EER) para las soluciones control y la formulación **FL-CsA_{con}** almacenada a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 6 meses.

Para todos los tiempos evaluados la viabilidad de ambas formulaciones en la línea celular conjuntival, tanto a tiempo cero como a lo largo de los 6 meses de estabilidad en condiciones de nevera y temperatura ambiente, ha sido superior al 80% lo que indica una buena tolerancia *in vitro*, pudiendo ser empleadas en tratamientos puntuales o prolongados de la superficie ocular.

○ Córnea

Los resultados obtenidos de tolerancia *in vitro* de las formulaciones **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}** para la línea celular corneal a lo largo del estudio de estabilidad se ilustran en las siguientes figuras (**Figura 80** y **Figura 81**). Al igual que lo observado en la línea celular conjuntival, la viabilidad celular corneal fue mayor del 80% en todas las muestras analizadas por lo que ambos preparados se consideran óptimos para ser administrados a nivel tópico ocular en tratamientos agudos o prolongados de la superficie ocular, pudiendo ser instiladas hasta 6 meses después de su fecha de preparación sin requerirse condiciones especiales de conservación.

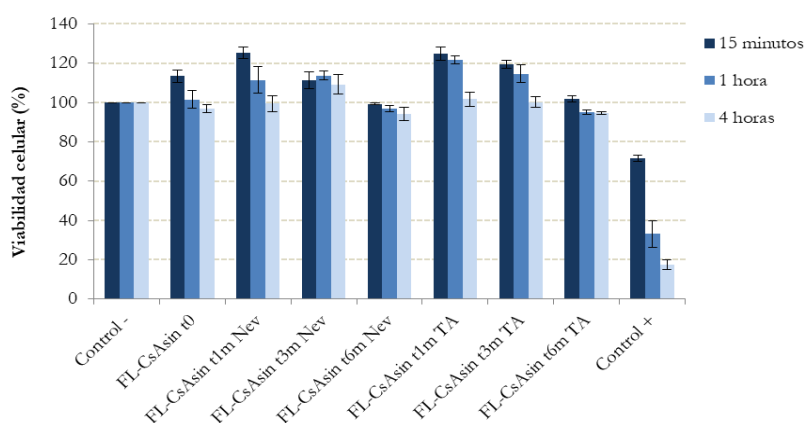


Figura 80: Viabilidad celular corneal (promedio \pm EER) para las soluciones control y la formulación **FL-CsA_{sin}** almacenada a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 6 meses.

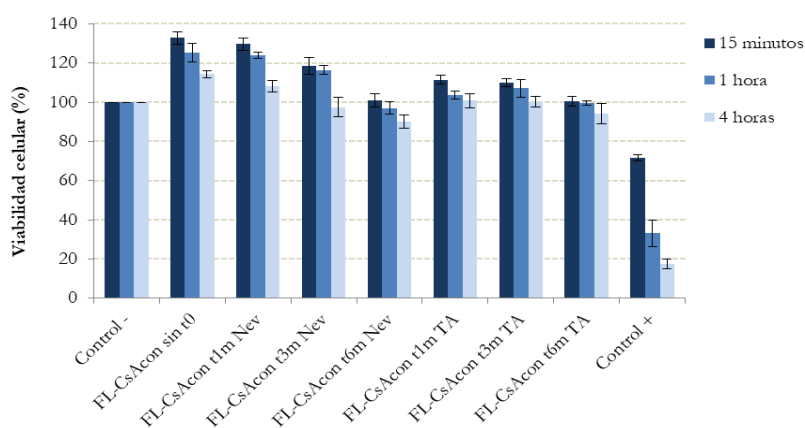


Figura 81: Viabilidad celular corneal (promedio \pm EER) para las soluciones control y la formulación **FL-CsA_{con}** almacenada a temperatura ambiente (TA) y nevera (Nev) durante 6 meses.

b) Ensayos de tolerancia *in vivo* de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A

Los estudios de tolerancia *in vivo* de las formulaciones liposomales con Ciclosporina A al 0,1% (**FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**) han sido realizados en conejos machos albinos de Nueva Zelanda (n=6).

Antes de administrar las formulaciones a testear, el estado de la superficie ocular de los conejos fue evaluado macroscópicamente y por tinción con fluoresceína para identificar posibles daños o alteraciones en la misma. Todos los animales evaluados mostraron una superficie ocular normal, sin defectos o lesiones en córnea, conjuntiva, iris y párpados, siendo aptos para ser incluidos en los estudios de tolerancia *in vivo*.

Tras 24, 48 y 72 horas desde la administración de la lágrima artificial se evaluó de nuevo la superficie ocular de todos los individuos. Ninguno de los conejos tratados mostró síntomas de molestias ni alteraciones en el proceso de secreción lagrimal. Así mismo, la córnea se mantuvo transparente, no apreciándose ningún tipo de alteración en córnea e iris, ni inflamación en párpados. Según el sistema de graduación empleado para la evaluación macroscópica de la superficie ocular, todos los parámetros analizados a lo largo del estudio de tolerancia *in vivo* de ambas formulaciones con 0,1% de Ciclosporina A presentaron valores de grado 0 (**Tabla 76**).

Tabla 76: Resultados obtenidos en la evaluación macroscópica de los signos y síntomas de la superficie ocular en el estudio de tolerancia *in vivo* para las formulaciones **FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**.

Parámetro a evaluar	Grado de alteración
Molestias	Grado 0: no hay reacción de discomfort
Secreción	Grado 0: no hay secreción al administrar la formulación
Córnea	Grado 0: no aparece ulceración u opacidad
Conjuntiva	Grado 0: ausencia de alteraciones en la conjuntiva
Iris	Grado 0: ausencia de alteraciones en el iris
Párpados	Grado 0: no hay presencia de hinchazón

Los resultados obtenidos demuestran una buena tolerancia *in vivo* de las formulaciones evaluadas sobre la superficie ocular en conejos. Estos datos podrían ser extrapolados a humanos puesto que se ha demostrado una buena concordancia cuando el estudio se realiza con pequeños volúmenes de instilación sobre la superficie ocular⁴⁰⁹.

⁴⁰⁹ Freeberg FE, Nixon GA, Reer PJ, Weaver JE, Bruce RD, Griffith JF, *et al.* Human and rabbit eye responses to chemical insult. *Fundam Appl Toxicol* 1986;7(4):626-34.

c) Estudio de estabilidad de la Ciclosporina A en la formulación liposomal FL-CsA_{sin}

El estudio de estabilidad se ha realizado en la formulación sin polímero (FL-CsA_{sin}) bajo condiciones de oscuridad y nevera (2 – 8 °C) o temperatura ambiente. La **Tabla 77** recoge los resultados obtenidos para los diferentes tiempos evaluados (15 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses). El tratamiento de los datos se ha realizado utilizando las concentraciones remanentes expresadas en porcentaje de la concentración inicial a tiempo cero.

Tabla 77: Porcentajes remanentes de Ciclosporina A (promedio \pm DE) obtenidos en la formulación FL-CsA_{sin} almacenada en nevera y a temperatura ambiente a lo largo del estudio de estabilidad.

Condiciones de almacenamiento	Tiempo de estudio	Porcentaje remanente de CsA en FL-CsA _{sin}
Nevera	15 días	100,5 \pm 6,2
	1 mes	100,1 \pm 3,1
	3 meses	99,8 \pm 4,7
	6 meses	97,3 \pm 2,7
Temperatura ambiente	15 días	98,2 \pm 10,4
	1 mes	95,8 \pm 9,7
	3 meses	94,8 \pm 14,0
	6 meses	90,3 \pm 2,0

Al representar gráficamente los logaritmos de los porcentajes remanentes de Ciclosporina A a lo largo del tiempo (**Figura 82**) se puede observar que los datos se ajustan adecuadamente a funciones lineales, por lo que se puede asumir una cinética de orden 1.

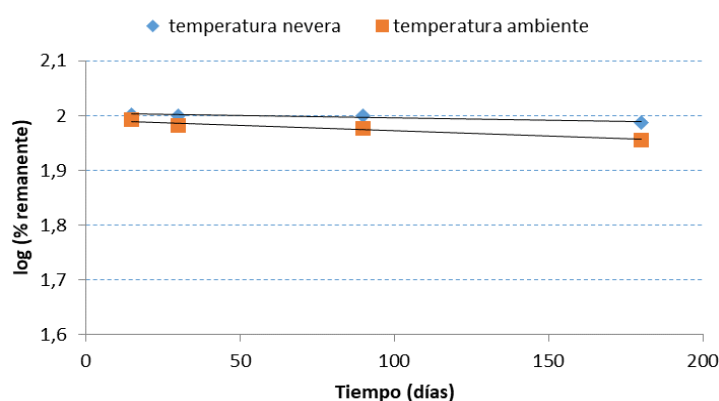


Figura 82: Representación gráfica del logaritmo de los porcentajes remanentes de Ciclosporina A obtenidos a lo largo del tiempo en los ensayos de estabilidad realizados con la formulación FL-CsA_{sin}

Assumiendo esta cinética de orden 1, se obtienen los resultados recogidos en la **Tabla 78** y la **Tabla 79** para los análisis de regresión del logaritmo (% remanente) frente al tiempo.

Tabla 78: Resultados obtenidos en la regresión lineal logaritmo % remanente-tiempo (días) a partir de los datos de estabilidad en nevera (**FL-CsA_{sin}**).

Parámetro	Estimado por mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada al origen	2,00389	0,0016808	1192,22	0,0000
Pendiente	-0,0000816115	0,0000164767	-4,95316	0,0384

Tabla 79: Resultados obtenidos en la regresión lineal logaritmo % remanente-tiempo (días) a partir de los datos de estabilidad a temperatura ambiente (**FL-CsA_{sin}**).

Parámetro	Estimado por mínimos cuadrados	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada al origen	1,99211	0,00346736	574,533	0,0000
Pendiente	-0,000198362	0,0000339901	-5,83587	0,0281

Los resultados recogidos en la **Tabla 78** y la **Tabla 79** confirman la existencia de pendiente (p-valor = 0,038 y p-valor = 0,031) tanto a temperatura ambiente como en nevera obteniéndose coeficientes de determinación (r^2) de 0,925 y 0,939, respectivamente. A partir de estos datos se pueden determinar los valores de constante de degradación, de vida media y del tiempo necesario para que se produzca una degradación del 10% de Ciclosporina A en ambas situaciones ensayadas (**Tabla 80**).

Tabla 80: Parámetros obtenidos en los estudios de estabilidad realizados con la formulación **FL-CsA_{sin}**.

Parámetro	Almacenamiento nevera	Almacenamiento temperatura ambiente
Constante de degradación (meses ⁻¹)	0,00564	0,01370
Vida media de degradación (meses)	122,9	50,6
Tiempo para de gradación del 10% de la CsA inicial (meses)	20,3	6,4

d) Comentario general

Las formulaciones liposomales con Ciclosporina A al 0,1% (**FL-CsA_{sin}** y **FL-CsA_{con}**) presentan características similares a las del vehículo base correspondiente (**FL_{sin}** y **FL_{con}**, respectivamente), siendo adecuadas para su utilización tópica ocular.

El estudio de estabilidad refleja que, independientemente de las condiciones de almacenamiento, ambas formulaciones presentan buena viabilidad celular durante 6 meses. Considerando dichos datos, se concluye que Ciclosporina A actúa como conservante en ambos preparados, ya que tanto las formulaciones liposomales blanco como las lágrimas enriquecidas desarrolladas, las cuales no contienen Ciclosporina A, presentan citotoxicidad a los 6 meses cuando se almacenan a temperatura ambiente.

5.4.4. Ensayos de eficacia *in vivo* de la formulación liposomal FL-C_sA_{con} en un modelo animal de la enfermedad de ojo seco

Con el objetivo de analizar la eficacia de la formulación liposomal **FL-C_sA_{con}** se ha diseñado un ensayo en perros con la enfermedad de ojo seco.

El estudio se realizó en el Hospital Clínico Veterinario de la UCM con la colaboración de veterinarios expertos en superficie ocular que pertenecen a nuestro grupo de investigación (UCM n.º 920415). En él participaron 6 perros, cinco de los cuales (n = 9 ojos) no habían recibido ningún tipo de tratamiento previo a su enfermedad, mientras que a uno de ellos se le estaba administrando dos veces al día una pomada comercial de ciclosporina al 0,2% (Optimmune[®]) habiéndose obtenido una respuesta parcial al tratamiento.

Durante el ensayo de eficacia, cada animal recibió durante 30 días, una gota de la formulación liposomal **FL-C_sA_{con}** en ambos ojos, con una frecuencia de tres veces al día.

Para evaluar la eficacia de la formulación liposomal ensayada, los perros fueron sometidos a una exploración oftalmológica antes de comenzar el estudio (día 0) y 30 días después de haberse iniciado el tratamiento (día 30). Durante dicha exploración oftalmológica se valoró el estado de la conjuntiva y córnea de los pacientes y la producción lagrimal por el test de Schirmer según los procedimientos descritos en el apartado 3.5.2, además de tomarse fotografías de la superficie ocular de todos los animales a los dos tiempos estudiados.

En este apartado se incluyen los resultados obtenidos de las diferentes pruebas clínicas realizadas.

Al finalizar el ensayo clínico, cinco propietarios de los 6 perros que participaron en el ensayo manifestaron su satisfacción con el tratamiento por la mejora observada en sus mascotas, mientras que un propietario retiró la administración de la formulación porque le provocaba prurito. El resto de los propietarios no indicaron la existencia de prurito tras la administración del preparado liposomal **FL-C_sA_{con}**.

a) Exploración oftalmológica

En la exploración oftalmológica se ha valorado el estado de la conjuntiva y córnea de los perros, antes y después del tratamiento con la formulación **FL-CsA_{con}**.

La **Figura 83** muestra los resultados obtenidos en la exploración conjuntival teniéndose en cuenta el grado de secreción y la hiperemia bulbar y palpebral. En la mayoría de los pacientes, se produjo una mejoría de ambos síntomas.

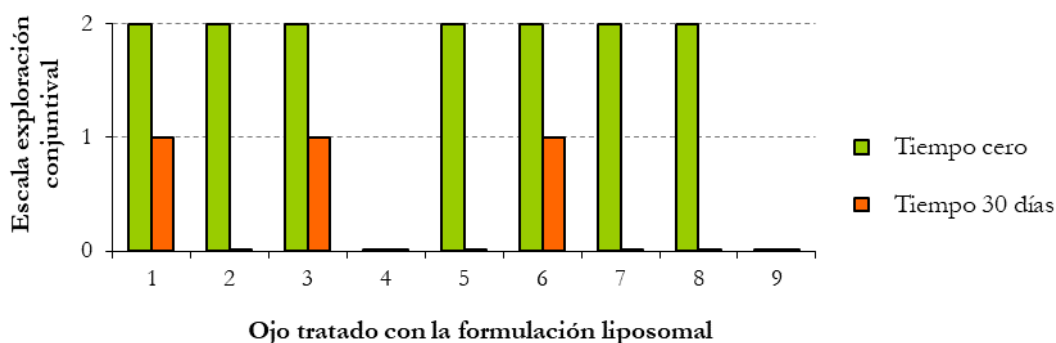


Figura 83: Resultados obtenidos en la exploración oftalmológica conjuntival para ambos ojos de los perros ($n = 9$ ojos) antes de iniciarse el tratamiento con la formulación **FL-CsA_{con}** (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).

En cuanto al estado corneal, se evaluó la integridad del epitelio y la opacidad corneal, el grado de neovascularización y la presencia de infiltrado inflamatorio. Los resultados obtenidos en estas pruebas se recogen en las siguientes figuras (**Figura 84**, **Figura 85**, **Figura 86** y **Figura 87**). En la **Figura 88** y la **Figura 89** se muestra, a modo de ejemplo, la evolución de la superficie ocular en dos de los perros tratados con la formulación **FL-CsA_{con}**.

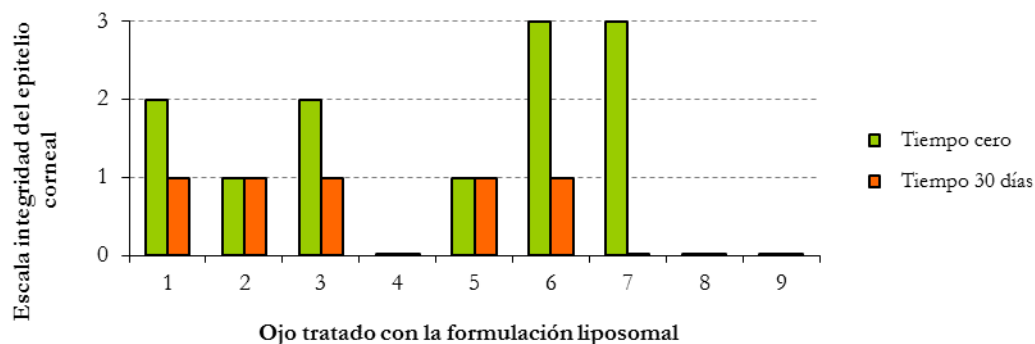


Figura 84: Resultados obtenidos en la valoración del grado de la integridad del epitelio corneal mediante exploración oftalmológica para ambos ojos de los perros ($n = 9$ ojos) antes de iniciarse el tratamiento con la formulación liposomal **FL-CsA_{con}** (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).

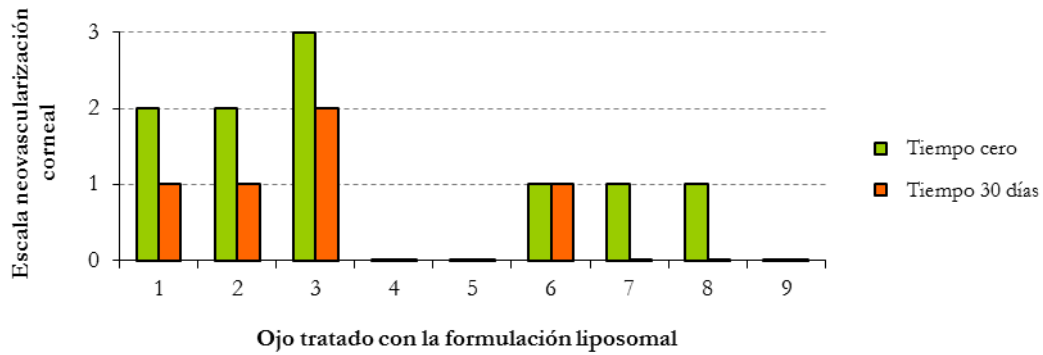


Figura 85: Resultados obtenidos en la valoración del grado de neovascularización corneal mediante exploración oftalmológica para ambos ojos de los perros ($n = 9$ ojos) antes de iniciarse el tratamiento con la formulación *FL-CsA_{con}* (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).

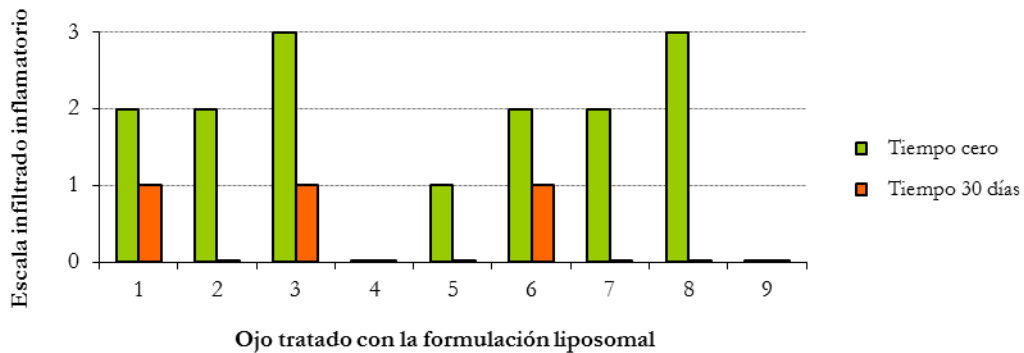


Figura 86: Resultados obtenidos en la valoración del grado de presencia de infiltrado inflamatorio corneal mediante exploración oftalmológica para ambos ojos de los perros ($n = 9$ ojos) antes de iniciarse el tratamiento con la formulación *FL-CsA_{con}* (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).

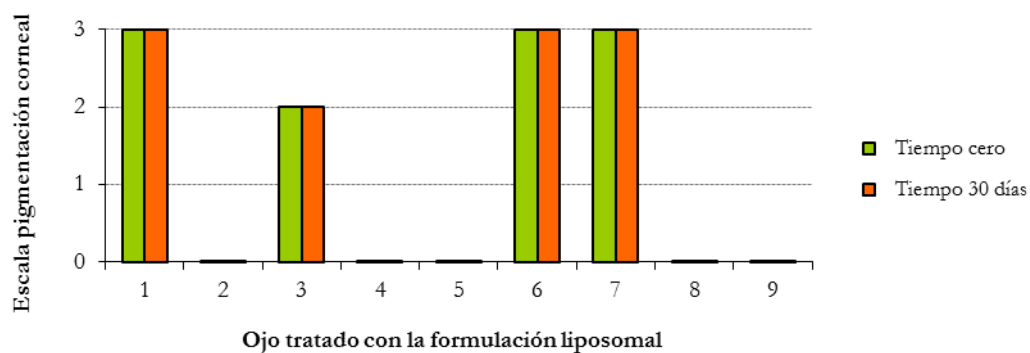
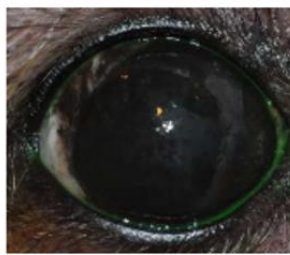


Figura 87: Resultados obtenidos en la valoración del grado de pigmentación corneal mediante exploración oftalmológica para ambos ojos de los perros ($n = 9$ ojos) antes de iniciarse el tratamiento con la formulación *FL-CsA_{con}* (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).



Ojo n° 1 a tiempo cero



Ojo n° 1 a tiempo 30 días

Figura 88: Fotografías de la superficie ocular del ojo n° 1 durante la prueba de tinción con fluoresceína, antes de iniciarse el tratamiento con (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).



Ojo n° 7 a tiempo cero



Ojo n° 7 a tiempo 30 días

Figura 89: Fotografías de la superficie ocular del ojo n° 7 durante la prueba de tinción con fluoresceína, antes de iniciarse el tratamiento con (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).

Considerando estos resultados, se puede concluir que la mayoría de los parámetros que definen el estado corneal han mejorado (integridad del epitelio y opacidad corneal, grado de neovascularización y presencia de infiltrado inflamatorio), a excepción del grado de pigmentación corneal, el cual es un signo crónico característico de la enfermedad de ojo seco. Posiblemente, la duración del ensayo (1 mes) no ha sido suficiente para observar mejoría en síntomas tan crónicos.

a) Test de Schirmer

En perros, los valores normales para la prueba de producción lagrimal mediante el test de Schirmer sin la administración de anestesia se encuentran entre $20 \pm 4 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Antes de iniciarse el tratamiento con el preparado **FL-CsA_{con}**, todos los perros presentaron valores iguales o inferiores a $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$, lo que indica la presencia de alteraciones en la superficie ocular. Tras 30 días de tratamiento, se observó un aumento de la puntuación de la prueba de Schirmer en todos los pacientes según queda recogido en la **Tabla 81** y **Figura 90**. El valor promedio pasó de $5,11 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ a $13,44 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$, lo que supone un aumento

significativo de la producción lagrimal en la población de estudio (test t-Student - contraste de medias: p-valor < 0,05).

Cabe mencionar el elevado incremento en la producción lagrimal del animal que previamente había estado en tratamiento con Optimune® (números de ojo 4 y 9 correspondientes con el ojo derecho e izquierdo, respectivamente).

Tabla 81: Resultados obtenidos en la prueba de producción lagrimal mediante el test de Schirmer en los ojos de los pacientes tratados con la formulación *FL-Csa_{con}* (n = 9 ojos) antes de iniciarse el tratamiento (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).

Ojo tratado (numeración)	Producción lagrimal - Test de Schirmer (mm·min ⁻¹)		Incremento en la producción lagrimal (%)
	Tiempo cero	Tiempo 30 días	
1	6	12	100
2	0	10	900 ⁽¹⁾
3	6	9	50
4	9	21	133,33
5	0	10	900 ⁽¹⁾
6	10	12	20
7	5	10	100
8	5	19	280
9	5	18	260
Promedio ± EER	5,11 ± 22,22	13,44 ± 11,37	304,81 ± 38,09

⁽¹⁾ Para el cálculo del incremento en la producción lágrimas se ha tomado como valor 1 a tiempo cero.

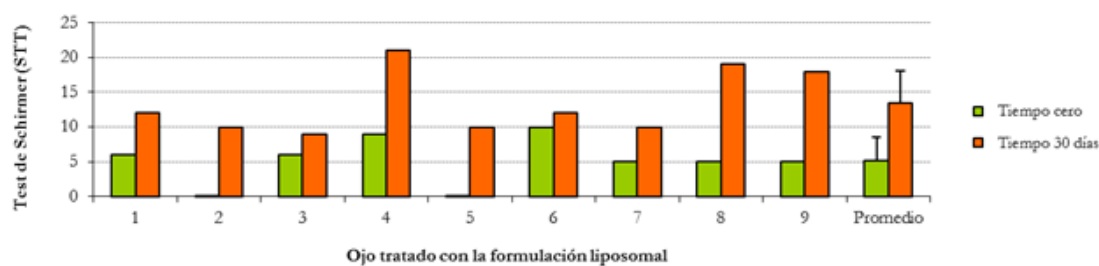


Figura 90: Representación gráfica de los valores de producción lagrimal individuales y promedio (± DE) obtenidos en la prueba de producción lagrimal mediante el test de Schirmer en los ojos de los pacientes tratados (n = 9 ojos) antes de iniciarse el tratamiento con la formulación *FL-Csa_{con}* (tiempo cero) y 30 días después (tiempo 30 días).

6. CONCLUSIONES

1. Las formulaciones liposomales blanco con una concentración de 20 mg/mL de fosfatidilcolina, presentan características fisicoquímicas óptimas para su administración tópica ocular. Dado que dichas formulaciones contienen componentes con características similares a los de la película lagrimal y muestran una buena tolerancia, tanto *in vitro* (conjuntival y corneal) como *in vivo* (conejos), se consideran adecuadas para su utilización como lágrimas artificiales en el tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

2. De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad, los preparados lagrimales blanco pueden ser empleados durante al menos 12 meses desde su preparación, siempre y cuando se conserven en nevera. En el caso de conservarse a temperatura ambiente, no se deben administrar a partir del tercer mes de almacenamiento.

3. Las formulaciones liposomales blanco pueden ser empleadas como vehículo base de formulaciones más complejas en las que se incluyan otros activos. La incorporación del polímero bioadhesivo hialuronato sódico al 0,4% incrementa la viscosidad del preparado pudiéndose aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular.

4. Las lágrimas artificiales enriquecidas que contienen vesículas liposomales y componentes activos con función regenerativa, antioxidante y osmoprotectora (vitamina A, vitamina C y trehalosa) mantienen las características fisicoquímicas adecuadas del vehículo base para su utilización por vía tópica ocular.

5. La lágrima artificial enriquecida con hialuronato sódico al 0,4% ha mostrado ser eficaz en un modelo animal de la enfermedad de ojo seco desarrollado en cobayas. Su administración cada 6 horas logra revertir la enfermedad en menor tiempo que el tratamiento con una solución isotónica de NaCl al 9‰. Asimismo, su administración en voluntarios sanos mejora significativamente los parámetros basales de osmolaridad lagrimal, calidad visual y el tiempo de ruptura de la película precorneal durante al menos 60 minutos después de su instilación.

6. Con la preparación de los liposomas de Ciclosporina A se consigue vehiculizar el principio activo hasta una concentración del 0,1% en medio acuoso. En los colirios comercializados, disoluciones oleosas, emulsiones o suspensiones, la concentración habitual se sitúa entre el 0,05% y el 0,1%.

7. Las formulaciones liposomales desarrolladas de Ciclosporina A presentan características fisicoquímicas óptimas para su administración tópica ocular. Los estudios de estabilidad realizados durante 6 meses aseguran su posible utilización a lo largo de este periodo tras su almacenamiento a temperatura ambiente o de nevera.

8. El tratamiento durante 1 mes con la formulación liposomal con Ciclosporina A al 0,1% e hialuronato sódico al 0,4% ha mejorado la sintomatología de la enfermedad de ojo seco espontánea en la especie canina de forma significativa.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Akram M, Shyum SB, Gauhar S. Development of new ophthalmic suspension prednisolone acetate 1%. *Pak J Pharm Sci.* 2010;23(2):149-54.
- Albertsmeyer AC, Kakkassery V, Spurr-Michaud S, Beeks O, Gipson IK. Effect of pro-inflammatory mediators on membrane-associated mucins expressed by human ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2010;90(3):444-51.
- Aragona P, Bucolo C, Spinella R, Giuffrida S, Ferreri G. Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and PGE1 tear content in Sjögren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(12):4474-9.
- Aragona P, Papa V, Micali A, Santocono M, Milazzo G. Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(2):181-4.
- Argüeso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjögren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1004-11.
- Argüeso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res.* 2001;73(3):281-9.
- Asane GS, Nirmal SA, Rasal KB, Naik AA, Mahadik MS, Rao YM, *et al.* Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008;34(11):1246-66.
- Aulenta F, Hayes W, Rannard S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *Eur Polym J.* 2003;39:1741-71.
- Bachman WG, Wilson G. Essential ions for maintenance of the corneal epithelial surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985;26(11):1484-8.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965;13(1):238-52.
- Barabino S, Chen W, Dana MR. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitation. *Exp Res Eye.* 2004;79(5):613-21.
- Barabino S, Rolando M, Camicione P, Ravera G, Zanardi S, Giuffrida S, *et al.* Systemic linoleic and gamma-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea.* 2003;22(2):97-101.
- Barton K, Nava A, Monroy DC, Pflugfelder SC. Cytokines and tear function in ocular surface disease. *Adv Exp Med Biol.* 1998;438:461-9.

- Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(4):312-34.
- Baudouin C, Riancho L, Warnet JM, Brignole F. In vitro studies of antiglaucomatous prostaglandin analogues: travoprost with and without benzalkonium chloride and preserved latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4123-8.
- Baudouin C. Conditions bordering on allergy. *J Fr Ophtalmol.* 2007;30(3):306-13.
- Begley CG, Caffery B, Nichols KK, Chalmers R. Responses of contact lens wearers to a dry eye survey. *Optom Vis Sci.* 2000;77(1):40-6.
- Begley CG, Edrington TB, Chalmers R. Effect of lens care systems on corneal fluorescein staining and subjective comfort in hydrogel lens wearers. *Int Contact Lens Clin.* 1994;21(1-2):7-13.
- Benítez del Castillo JM, Durán de la Colina J, Rodríguez Ares MT, (Eds) (2004) *Superficie Ocular*, Madrid, España: Mac Line, S.L.
- Benítez del Castillo JM, Vico E. Tratamiento del ojo seco. *Gaceta óptica.* 2004; 385:10-4.
- Bernauer W, Thiel MA, Kurrer M, Heiligenhaus A, Rentsch KM, Schmitt A, *et al.* Corneal calcification following intensified treatment with sodium hyaluronate artificial tears. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(3):285-8.
- Beuerman RW, Mircheff A, Pflugfelder SC, Stern ME. The lacrimal functional unit, in Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME (eds). *Dry eye and ocular surface disorders.* New York. Marcel Dekker, 2004.
- Boas U, Heegaard PM. Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev.* 2004;33(1):43-63.
- Bontempo AR, Rapp J. Protein and lipid deposition onto hydrophilic contact lenses in vivo. *CLAO J.* 2001;27(2):75-80.
- Borel JF. Pharmacology of cyclosporine (sandimmune). IV. Pharmacological properties in vivo. *Pharmacol Rev.* 1990;41(3):259-371.
- Bosman AW, Janssen HM, Meijer EW. About dendrimers: structure, physical properties and applications. *Chem Rev.* 1999;99(7):1665-88.
- Brasnu E, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Warnet JM, Baudouin C. Comparative study on the cytotoxic effects of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines. *Mol Vis.* 2008;14:394-402.
- Brennan NA, Coles ML, Ang JH. An evaluation of silicone-hydrogel lenses worn on a daily wear basis. *Clin Exp Optom.* 2006;89(1):18-25.

- Brignole F, Pisella PJ, De Saint Jean M, Goldschild M, Goguel A, Baudouin C. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS:6 months treatment with topical cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):90-5.
- Brignole F, Pisella PJ, Dupas B, Baeyens V, Baudouin Cl. Efficacy and safety of 0.18% sodium hyaluronate in patients with moderate dry eye syndrome and superficial keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(6):531-8.
- Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea.* 2003;22(7):640-50.
- Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):347-60.
- Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45 Suppl 2:221-6.
- Butovich IA, Uchiyama E, McCulley JP. Lipids of human meibum: mass-spectrometric analysis and structural elucidation. *J Lipid Res.* 2007;48(10):2220-35.
- Calonge M. The treatment of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(2):S227-39.
- Camillieri G, Bucolo C, Rossi S, Drago F. Hyaluronan-induced stimulation of corneal wound healing is a pure pharmacological effect. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2004;20(6):548-53.
- Carney LG, Hill RM. Human tear buffering capacity. *Arch Ophthalmol.* 1979;97(5):951-2.
- Carney LG, Mauger TF, Hill RM. Buffering in human tears: pH responses to acid and base challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(4):747-54.
- Cejková J, Ardan T, Cejka C, Luyckx J. Favorable effects of trehalose on the development of UVB-mediated antioxidant/prooxidant imbalance in the corneal epithelium, proinflammatory cytokine and matrix metalloproteinase induction, and heat shock protein 70 expression. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249(8):1185-94.
- Chalmers RL, Hunt C, Hickson-Curran S, Young G. Struggle with hydrogel CL wear increases with age in young adults. *Cont Lens Anterior Eye.* 2009;32(3):113-9.
- Chauhan SK, Dana R. Role of Th17 cells in the immunopathogenesis of dry eye disease. *Mucosal Immunol.* 2009;2(4):375-6.
- Chauhan SK, El Annan J, Ecoiffier T, Goyal S, Zhang Q, Saban DR, *et al.* Autoimmunity in dry eye is due to resistance of Th17 to Treg suppression. *J Immunol* 2009;182(3):1247-52.
- Chen W, Zhang X, Liu M, Zhang J, Ye Y, Lin Y, *et al.* Trehalose protects against ocular surface disorders in experimental murine dry eye through suppression of apoptosis. *Exp Eye Res.* 2009;89(3):311-8.

- Chetty E, Gillan WDH. Reviewing the tear film's lipid layer. *S Afr Optom*. 2008;67(4):155-9.
- Chiou AG, Florakis GJ, Kazim M. Management of conjunctival cicatrizing diseases and severe ocular surface dysfunction. *Surv Ophthalmol*. 1998;43(1):19-46.
- Comunicación oral realizada por los expertos Alfonso Rodríguez Álvaro y Elisa Margarita González Alonso-Alegre. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.
- Corrales RM., Luo L, Chang EY, Pflugfelder SC. Effect of osmoprotectants on hyperosmolar stress in cultured human corneal epithelial cells. *Cornea*. 2008;27(5):574-9.
- Cousen P, Cackett P, Bennett H, Swa K, Dhillon B. Tear production and corneal sensitivity in diabetes. *J Diabetes Complications*. 2007;21(5):371-3.
- Craig JP, Nelson JD, Azar DT, Belmonte C, Bron AJ, Chauhan SK, *et al*. TFOS DEWS II Report executive summary. *Ocul Surf*. 2017;15(4):802-12.
- Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C, *et al*. TFOS DEWS II Definition and Classification report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):273-83.
- Craig JP, Willcox MD, Argueso P, Maissa C, Stahl U, Tomlinson A, *et al*. The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort: report of the contact lens interactions with the tear film subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(11):TFOS123-56.
- Culty M, Nguyen HA, Underhill CB. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol*. 1992;116(4):1055-62.
- Dauil P, Feraille L, Elena PP, Garrigue JS. Comparison of the anti-inflammatory effects of artificial tears in a rat model of corneal scraping. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016;32(2):109-18.
- Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000;27(7):558-62.
- De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, Pitcher JD, Fang B, Zheng X, *et al*. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol*. 2009;2(3):243-53.
- De Paiva CS, Hwang CS, Pitcher JD, Pangelinan SB, Rahimy E, Chen W, *et al*. Age-related T-cell cytokine profile parallels corneal disease severity in Sjogren's syndrome-like keratoconjunctivitis sicca in CD25KO mice. *Rheumatology*. 2010;49(2):246-58.
- Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(3):642-52.

- Debbasch C, De La Salle SB, Brignole F, Rat P, Warnet JM, Baudouin C. Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(11): 3409-15.
- Diebold Y, Calonge M, Enríquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Sáez V, *et al*. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(10):4263-74.
- Diebold Y, Jarrín M, Sáez V, Carvalho ELS, Orea M, Calonge M, *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. *Pharm Sci Technol Today*. 1998;1(8):328-35.
- Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol*. 2009;54(3):321-38.
- Efron N, Brennan NA. A survey of wearers of low water content hydrogel contact lenses. *Clin Exp Optom*. 1988;71(3):86-90.
- Efron N, Young G. Dehydration of hydrogel contact lenses *in vitro* and *in vivo*. *Ophthalm Physiol Opt*. 1988;8(3):253-6.
- Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreno E, García-Vázquez C, *et al*. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis*. 2010;16:862-73.
- Enríquez-de-Salamanca A, Diebold Y, Calonge M, García-Vázquez C, Callejo S, Vila A, *et al*. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(4):1416-25.
- Epstein SP, Ahdoot M, Marcus E, Asbell PA. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocu Pharmacol Ther*. 2009;25(2):113-9.
- Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today*. 2001;6(8):427-36.
- Finis D, Hayajneh J, König C, Borrelli M, Schrader S, Geerling G. Evaluation of an automated thermodynamic treatment (Lipiflow) system for meibomian gland dysfunction: a prospective, randomized, observed-masked trial. *Ocul Surf*. 2014;12(2):146-54.
- Foco A, Gasperlin M, Kristl J. Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection. *Int J Pharm*. 2005;291(1-2):21-9.

- Fonn D, Situ P, Simpson T. Hydrogel lens dehydration and subjective comfort and dryness ratings in symptomatic and asymptomatic contact lens wearers. *Optom Vis Sci.* 1999;76(10):700-4.
- Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol.* 2007;52(4):369-74.
- Freeberg FE, Nixon GA, Reer PJ, Weaver JE, Bruce RD, Griffith JF, *et al.* Human and rabbit eye responses to chemical insult. *Fundam Appl Toxicol.* 1986;7(4):626-34.
- Gan L, Han S, Shen J, Zhu J, Zhu C, Zhang X, *et al.* Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: improving precocular retention and ocular bioavailability. *Int J Pharm.* 2010;396(1-2):179-87.
- Gao J, Schwalb TA, Addeo JV, Ghosn CR, Stern ME. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporine A therapy. *Cornea.* 1998;17(6):654-63.
- Gaudana R, Ananthula H, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. *AAPS J.* 2010;12(3):348-60.
- Gaudana R, Jwala J, Boddu S, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res.* 2009;26(5):1197-216.
- Geerling G, Daniels JT, Dart JK, Cree IA, Khaw PT. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(5):948-56.
- Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(11):1467-74.
- Georgiev GA, Yokoi N, Ivanova S, Dimitov T, Andreev K, Krastev R, *et al.* Surface chemistry study of the interactions of hyaluronic acid and benzalkonium chloride with meibomian and corneal cell lipids. *Soft Matter.* 2013;9(45):10841-56.
- Gillies ER, Fréchet JM. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today.* 2005;10(1):35-43.
- Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argüeso P, Tisdale A, Fong T, Russo CL. Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2496-506.
- Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):379-88.

- Glasson MJ, Stapleton F, Keay L, Willcox MD. The effect of short term contact lens wear on the tear film and ocular surface characteristics of tolerant and intolerant wearers. *Contact Lens Anterior Eye*. 2006;29(1):41-7.
- Gomes JAP, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(6):821-5.
- González-Méijome JM, López-Alemay A, Almeida JB, Parafita MA, Refojo MF. Qualitative and quantitative characterization of the *in vitro* dehydration process of hydrogel contact lenses. *J Biomed Mater Res B Appl Bio-mater*. 2007;83(2):512-26.
- Gouveia SM, Tiffani JM. Human tear viscosity: an interactive role for proteins and lipids. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1753(2):155-63.
- Greaves JL, Wilson CG. Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 1993;11(3):349-83.
- Gressel PD, Roehrs RE, Ubels JL, Edelhauser HF. Topical ophthalmic compositions containing one or more retinoids. US 4826871A. Publicada: 02-05-1989.
- Guenoun JM, Baudouin C, Rat P, Pauly A, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. In vitro study of inflammatory potential and toxicity profile of latanoprost, travoprost, and bimatoprost in conjunctiva-derived epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(7):2444-50.
- Gupta U, Agashe HB, Asthana A, Jain NK. A review on *in vitro* – *in vivo* investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers. *Nanomedicine*. 2006;2(2):66-73.
- Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*. 2002;84(2-3):153-66.
- Hattori Y, Nakanishi N. Effects of cyclosporin A and FK506 on nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in bacterial lipopolysaccharide-treated J774 macrophages. *Cell Immunol*. 1995;165(1):7-11.
- Heigle TJ, Pflugfelder SC. Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis. *Cornea*. 1996;15(2):135-8.
- Herrero Vanrell R, Benítez del Castillo JM, Vico Ruiz E, Vicario de la Torre M, Molina Martínez IT. Formulation of liposomal vesicles in aqueous solutions with tear film Characteristics US 9539002. Publicada: 10-01-2017.
- Hirayama M, Murat D, Liu Y, Kojima T, Kawakita T, Tsubota K. Efficacy of a novel moist cool air device in office workers with dry eye disease. *Acta Ophthalmol*. 2013;91(8):756-62.

- Ho WT, Chiang TH, Chang SW, Chen YH, Hu FR, Wang JJ. Enhanced corneal wound healing with hyaluronic acid and high-potassium artificial tears. *Clin Exp Optom*. 2013;96(6):536-41.
- Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol*. 1977;22(2):69-87.
- Holly FJ. Surface chemistry of tear film component analogs. *J Colloid Interface Sci*. 1974;49(2):221-31.
- Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argüeso P. Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(1):114-22.
- Horrobin DF, Campbell A. Sjogren's syndrome and the sicca syndrome: the role of prostaglandin E1 deficiency. Treatment with essential fatty acids and vitamin C. *Med Hypotheses*. 1980;6(3):225-32.
- Houlsby RD, Ghajar M, Chavez GO. Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986; 29(5):803-6.
- <http://www.msdsalud-animal.mx/productos/rojo/perros/optimmune>
- Inoue M, Katakami C. The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(7):2313-5.
- Isacke CM, Yarwood H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(7):718-21.
- Isreb MA, Greiner JV, Korb DR, Glonek T, Mody SS, Finnemore VM, *et al*. Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break-up time and Schirmer's test. *Eye*. 2003;17(1):79-83.
- Jedrzejewski MJ, Mello LV, de Groot BL, Li S. Mechanism of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. Structures of complexes with the substrate. *J Biol Chem*. 2002;277(31):28287-97.
- Jee JP, Lim SJ, Park JS, Kim CK. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;63(2):134-9.
- Johnson ME, Murphy PJ, Boulton M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(1):109-12.
- Johnson ME, Murphy PJ. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(4):449-74.
- Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, *et al*. TFOS DEWS II Management and therapy report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):575-628.

- Jones L, May C, Nazar L, Simpson T. *In vitro* evaluation of the dehydration characteristics of silicone hydrogel and conventional hydrogel contact lens materials. *Cont Lens Anterior Eye*. 2002;25(3):147-56.
- Jones L, Senchyna M, Glasier MA, Schickler J, Forbes I, Louie D, *et al.* Lysozyme and lipid deposition on silicone hydrogel contact lens materials. *Eye Contact Lens*. 2003;29(1):S75-9.
- Kahn GC, Shaw LM, Kane MD. Routine monitoring of cyclosporine in whole blood and kidney tissue using high performance liquid chromatography. *J Anal Toxicol*. 1986;10(1):28-34.
- Kallarackal GU, Ansari EA, Amos N, Martin JC, Lane C, Camilleri JP. A comparative study to assess the clinical use of fluorescein meniscus time (FMT) with tear break up time (TBUT) and Schirmer's tests (ST) in the diagnosis of dry eyes. *Eye*. 2002;16(5):594-600.
- Kaur IP, Lal S, Rana C, Kakkar S, Singh H. Ocular preservatives: associated risks and newer option. *Cutan Ocul Toxicol*. 2009;28(3):93-103.
- Kaur IP, Smitha R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. *Drug Dev Indl Pharm*. 2002;28(4):353-69.
- Kawakami K, Yoshikawa T, Moroto Y, Kanaoka E, Takahashi K, Nishihara Y, *et al.* Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. I. Prescription Design. *J. Control. Release*. 2002;81(1-2):65-74.
- Kim EC, Choi JS, Joo CK. A comparison of vitamin a and cyclosporine a 0.05% eye drops for treatment of dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2009;147(2):206-13.
- Kim Y, Moon CH, Kim BY, Young S. Oral Hyaluronic Acid Supplementation for the Treatment of Dry Eye Disease: A Pilot Study. *J Ophthalmol*. 2019;2019:5491626.
- King-Smith PE, Hinel EA, Nichols JJ. Application of a novel interferometric method to investigate the relation between lipid layer thickness and tear film thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(5):2418-23.
- King-Smith PE, Nichols JJ, Nichols KK, Fink BA, Braun RJ. Contributions of evaporation and other mechanisms to tear film thinning and break-up. *Optom Vis Sci*. 2008;85(8):623-30.
- Kobayashi TK, Tsubota K, Takamura E, Sawa M, Ohashi Y, Usui M. Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: a cytological evaluation. *Ophthalmologica*. 1997; 211(6):358-61.
- Kojima T, Ishida R, Dogru M, Goto E, Matsumoto Y, Kaido M, *et al.* The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(2):242-6.

Korb DR, Scaffidi RC, Greiner JV, Kneyon KR, Herman JP, Blackie CA, *et al.* The effect of two novel lubricant eye drops on tear film lipid layer thickness in subjects with dry eye symptoms. *Optom Vis Sci.* 2005;82(7):594-601.

Krenzer KL, Dana MR, Ullman MD, Cermak JM, Tolls DB, Evans JE, *et al.* Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(12):4874-82.

Kruszka P, O'Brian R. Diagnosis and management of Sjögren syndrome. *Am Fam Physician.* 2009; 79(6):465-70.

Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, Nigavekar SS, Majoros IJ, Thomas TP, *et al.* Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.* 2005;65(12):5317-24.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. (2007). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*, Madrid, España: S.A. Elsevier.

Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, Smith JA, Gipson IK. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol.* 2000;118(11):1489-96.

Lajvardi L, Camelo S, Agnely F, Luo W, Goldenberg B, Naud MC, *et al.* New formulations of vasoactive intestinal peptide using liposomes in hyaluronic acid gel for uveitis. *J Control Release.* 2009;139(1):22-30.

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

Lawrence MS, Redmond DE, Elsworth JD, Taylor JR. The D1 receptor antagonist, SCH23390, induces signs of Parkinsonism in African green monkeys. *Life Sci* 1991;49(25):PL229-34.

Li J, Roubexis C, Wang Y, Shi S, Liu G, Baudouin C, *et al.* Therapeutic efficacy of trehalose eye drops for treatment of murine dry eye induced by an intelligently controlled environmental system. *Mol Vis.* 2012;18:317–29.

Li Z, Choi J-H, Oh H-J, Park S-H, Lee J-B, Yoon KC. Effects of eye drops containing a mixture of omega-3 essential fatty acids and hyaluronic acid on the ocular surface in desiccating stress-induced Murine dry eye. *Curr Eye Res.* 2014;39(9):871-8.

Liu L, Tiffany J, Dang Z, Dart JK, Watson SL, Daniels JT, *et al.* Nourish and nurture: development of a nutrient ocular lubricant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(6):2932-9.

López-Quintela MA, Tojo C, Blanco MC, García Rio L, Leis JR. Microemulsion dynamics and reactions in microemulsions. *Curr Opin Colloid Interfase Sci.* 2004;9(3-4):264-78.

- Lorentz H, Jones L. Lipid deposition on hydrogel contact lenses: how history can help us today. *Optom Vis Sci.* 2007;84(4):286-95.
- Lorentz H, Rogers R, Jones L. The impact of lipid on contact angle wettability. *Optom Vis Sci.* 2007;84(10):946-53.
- Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(11):1595-639.
- Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(5):477-83.
- Mark HF (Ed). (2014). *Encyclopedia of polymer science and technology*, New Jersey, USA: Wiley Interscience.
- Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):119-25.
- Matsuo T, Tsuchida Y, Morimoto N. Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome. *Ophthalmology.* 2002;109(11):2024-9.
- Matsuo T. Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(5): 610-2.
- Matsuo T. Trehalose versus hyaluronan or cellulose in eyedrops for the treatment of dry eye. *Jpn J Ophthalmol.* 2004;48(4):321-7.
- McCulley JP, Shine WE. Eyelid disorders: the meibomian gland, blepharitis, and contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2003 Jan;29(1 Suppl):S93-5;discussion S115-8, S192-4.
- McCulley JP, Shine WE. Meibomian gland and tear film lipids: structure, function and control. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506 (Pt A):373-8.
- McCulley JP, Uchiyame E, Aronowicz JD, Butovich IA. Impact of evaporation on aqueous tear loss. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2006;104:121-8.
- Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 1995;16(1):75-93.
- Milani JK, Pleyer U, Dukes A, Chou HJ, Lutz S, Rückert D, *et al.* Prolongation of corneal allograft survival with liposome-encapsulated cyclosporine in the rat eye. *Ophthalmology.* 1993;100(6):890-6.
- 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. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(4):887-93.

Mintzer J, Burns, A. Anticholinergic side-effects of drugs in elderly people. *J R Soc Med.* 2000;93(9):457-62.

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

Mochizuki H, Yamada M, Hato S, Nishida T. Fluorophotometric measurement of the precorneal residence time of topically applied hyaluronic acid. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(1):108-11.

Molina Martínez IT, Vicario de la Torre M, Benítez del Castillo JM, Vico Ruiz E, Herrero Vanrell R. Formulación de vesículas liposomales en soluciones acuosas con características de película lagrimal. N° publicación: 2284398 y fecha de publicación 16-12-2008.

Molina Martínez IT, Vicario de la Torre M, Benítez del Castillo JM, Vico Ruiz E, Herrero Vanrell R. Formulation of liposomal vesicles in aqueous solutions with tear film characteristics EP 2.016.937 B1. Publicada: 21-01-2015.

Morgan PB, Efron N. *In vivo* dehydration of silicone hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2003;29(3):173-6.

Morgan RV, Abrams KL. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199(8):1043-6.

Moss SE, Klein R, Klein BE. Long-term incidence of dry eye in an older population. *Optom Vis Sci.* 2008;85(8):668-74.

Murube J. (1996). *Avances en el manejo y tratamiento del ojo seco.* Highlights of ophthalmology. 22:12-16.

Murube J. (2005). *Manejo del ojo seco - Tratamiento no médico - Parte1.* Highlights of Ophthalmology. 33:2-3.

Nagyová B, Tiffany JM. Components responsible for surface tension of human tears. *Curr. Eye Res.* 1999;19(1):4-11.

Nakamura S, Okada S, Umeda Y, Saito F. Development of a rabbit model of tear film instability and evaluation of viscosity of artificial tear preparations. *Cornea.* 2004;23(4):390-7.

Nanjawade BK, Manvi FV, Manjappa AS. *In situ*-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. *J Control Release.* 2007;122(2):119-34.

Nelson JD, Helms H, Fiscella R, Southwell Y, Hirsch JD. A new look at dry eye disease and its treatment. *Adv Ther.* 2000;17(2):84-93.

Nguyen CQ, Peck AB. Unraveling the pathophysiology of Sjogren syndrome-associated dry eye disease. *Ocul Surf.* 2009;7(1):11-27.

Nichols JJ, Ziegler C, Mitchell GL, Nichols KK. Self-reported dry eye disease across refractive modalities. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(6):1911-4.

Nichols KK, Foulks GN, Bron AJ, Glasgow BK, Dogru M, Tsubota K, *et al.* The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(4):1922-9.

No authors listed. Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of Dry Eye WorkShop. *Ocul Surf.* 2007;5(2):163-78.

No authors listed. 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.

Noble BA, Loh RS, MacLennan S, Pesudovs K, Reynolds A, Bridges LR, *et al.* Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomized controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(5):647-52.

Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther.* 2001;18(5):205-15.

O'Neil EC, Henderson M, Massaro-Giordano M, Bunya V. Advances in dry eye disease treatment. *Curr Opin Ophthalmol.* 2019;30(3):166-78.

Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clin Chim Act.* 2006;369(1):17-28.

Olivero DK, Davidson MG, English RV, Nasisse MP, Jamieson VE, Gerig TM. Clinical evaluation of 1% cyclosporine for topical treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199(8):1039-42.

Organization for Economic Co-operation and Development. Test guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. 2 Oct 2012. Available on line at < <http://www.oecd.org>.

Ousler GW, Abelson MB, Nally LA, Welch D, Casavant JS. Evaluation of the time to “natural compensation” in normal and dry eye subject populations during exposure to a controlled adverse environment. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506:1057-63.

Papa V, Aragona P, Russo S, Di Bella A, Russo P, Milazzo G. Comparison of hypotonic and isotonic solutions containing sodium hyaluronate on the symptomatic treatment of dry eye patients. *Ophthalmologica.* 2001;215(2):124-7.

Park Y, Cho S, Linhardt RJ. Exploration of the action pattern of *Streptomyces* hyaluronate lyase using high-resolution capillary electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1337(2):217-26.

Pastor Jimeno JC, Maldonado López MJ. (2011). *Guiones de Oftalmología*, Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.

Patel S, Farrell JC. Age-related changes in precorneal tear film stability. *Optom Vis Sci.* 1989;66(3):175-8.

Patri AK, Majoros IJ, Baker JR. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002;6(4):466-71.

Peppas NA, Khare AR. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Adv Drug Deliv Rev.* 1993;11(1-2):1-35.

Petrone D, Condemi JJ, Fife R, Gluck O, Cohen S, Dalgin P. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of cevimeline in Sjögren's syndrome patients with xerostomia and keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(3):748-54.

Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five year review. *Cornea.* 2000;19(5):644-9.

Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol.* 2004;137(2):337-42.

Pisarcik M, Bakos D, Ceppan M. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. *Colloids Surf A* 1995;97(3):197-202.

Pleyer U, Elkins B, Rückert D, Lutz S, Grammer J, Chou J, *et al.* Ocular absorption of cyclosporine A from liposomes incorporated into collagen shields. *Curr Eye Res.* 1994;13(3):177-81.

Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(11):1188-97.

Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruyse KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Control Release.* 1998;53(1-3):93-103.

Qiu W, Liu Z, Ao M, Li X, Wang W. Punctual plugs versus artificial tears for treating primary Sjögren's syndrome with keratoconjunctivitis sicca: a comparative observation of their effects on visual function. *Rheumatol Int.* 2013;33(10):2543-8.

Ramamoorthy P, Nichols JJ. Mucins in contact lens wear and dry eye conditions. *Optom Vis Sci.* 2008;85(8):631-42.

Ramamoorthy P, Sinnott LT, Nichols JJ. Treatment, material, care, and patient-related factors in contact lens-related dry eye. *Optom Vis Sci.* 2008;85(8):764-72.

- Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, Barabino S, Schaumberg DA, Dana MR. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(2):219-25.
- Reinhard P, Reinhard P. (2006). *Sobotta. Atlas de Anatomía Humana. Tomo 2*, Madrid, España: Panamericana.
- Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. *Br J Ophthalmol*. 1992;76(3):157-8.
- Rivas L. Pruebas histológicas en el ojo seco. En: Murube del Castillo J, compilador. *Ojo seco*. Madrid: Tecnimedia Editorial; 1997:159-66.
- Rolando M, Lester M., Macrí A., Calabria G. Low spatial-contrast sensitivity in dry eyes. *Cornea*. 1998;17(4):376-9.
- Roncone M, Bartlett H, Eperjesi F. Essential fatty acids for dry eye: a review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2010;33(2):49-54.
- Roorda WE, Boddé HE, De Boer AG, Bouwstra JA, Junginger HE. Synthetic hydrogels as drug delivery systems. *Pharm Weekbl Sci*. 1986;8(3):165-89.
- Sade de Paiva C, Pflugfelder SC. Tear clearance implications for ocular surface health. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):395-7.
- Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today*. 2018;13(3-4):144-51.
- 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(4):631-9.
- Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv*. 2007;4(4):297-305.
- Sauer R, Bluthner K, Seitz B. Sterility of non-preserved autologous serum drops for treatment of persistent corneal epithelial defects. *Ophthalmologe*. 2004;101(7):705-9.
- Scardovi C, De Felice GP, Gazzaniga A. Epidermal growth factor in the topical treatment of traumatic corneal ulcers. *Ophthalmologica*. 1993;206(3):119-24.
- Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *JAMA*: 2001;286(17):2114-9.
- Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol*. 2003;136(2):318-26.

- Schroeder A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chem Phys Lipids*. 2009;162(1-2):1-16.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, *et al*. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988;48(17):4827-33.
- Serra HM, Cafaro TA. Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquim Clin Latinoam*. 2007;41(4):525-32.
- Shishir MRI, Karim N, Gowd V, Zheng X, Chen W. Liposomal delivery of natural product: a promising approach in health research. *Trends Food Sci Technol*. 2019;85:177-200.
- Sindt CW, Longmuir RA. Contact lens strategies for the patient with dry eye. *Ocul Surf*. 2007;5(4):294-307.
- Skotnitsky C, Sankaridrug PR, Sweeney DF, Holden BA. General and local contact lens induced papillary conjunctivitis (CLPC). *Clin Exp Optom*. 2002;85(3):193-7.
- Skotnitsky CC, Naduvilath TJ, Sweeney DF, Sankaridurg PR. Two presentations of contact lens-induced papillary conjunctivitis (CLPC) in hydrogel lens wear: Local and general. *Optom Vis Sci*. 2006;83(1):27-36.
- Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(11):1556-68.
- Smith J, Steinemann TL. Vitamin A deficiency and the eye. *Int Ophthalmol Clin*. 2000;40(4):83-91.
- Snibson GR, Greaves JL, Soper ND, Tiffany JM, Wilson CG, Bron AJ. Ocular surface residence times of artificial tear solutions. *Cornea*. 1992;11(4):288-93.
- Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I. Assay of mucins in human tear fluid. *Exp Eye Res*. 2007;84(5):939-50.
- Stahl JL, Cook EB, Barney NP, Graziano FM. Pathophysiology of ocular allergy: the roles of conjunctival mast cells and epithelial cells. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002;2(4):332-9.
- Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, *et al*. TFOS DEWS II Epidemiology report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):334-65
- Stern ME, Gao J, Siemarko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res*. 2014;78(3):409-16.
- Stern ME, Pflugfelder, SC. Inflammation in dry eye. *Ocul Surf*. 2004;2(2):124-30.

- Stevenson D, Tauber J, Reis BL. Efficacy and safety of Cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group. *Ophthalmology*. 2000;107(5):967-74.
- Subbaraman LN, Bayer S, Glasier MA, Lorentz H, Senchyna M, Jones L. Rewetting drops containing surface active agents improve the clinical performance of silicone hydrogel contact lenses. *Optom Vis Sci*. 2006;83(3):143-51.
- Subbaraman LN, Glasier MA, Senchyna M, Sheardown H, Jones L. Kinetics of in vitro lysozyme deposition on silicone hydrogel, PMMA, and FDA groups I, II, and IV contact lens materials. *Curr Eye Res*. 2006;31(10):787-96.
- Subbaraman LN, Glasier MA, Varikooty J, Srinivasan S, Jones L. Protein deposition and clinical symptoms in daily wear of etafilcon lenses. *Optom Vis Sci*. 2012;89(10):1450-9.
- Sullivan BD, Evans JE, Dana MR, Sullivan DA. Influence of aging on the polar and neutral lipid profiles in human meibomian gland secretions. *Arch Ophthalmol*. 2006;124(9):1286-92.
- Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I, Dana MR. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(6):1261-5.
- Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, Kelleher RS, da Silveira LA, Toda I. Influence of gender, sex steroid hormones, and the hypothalamic-pituitary axis on the structure and function of the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol*. 1998;438:11-42.
- Sumiyoshi M, Ricciuto, J., Tisdale, A., Gipson, I.K., Mantelli, F., Argüeso P. Antiadhesive character of mucin O-glycans at the apical surface of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(1):197-203.
- Suwala M, Glasier MA, Subbaraman LN, Jones L. Quantity and conformation of lysozyme deposited on conventional and silicone hydrogel contact lens materials using an in vitro model. *Eye Contact Lens*. 2007;33(3):138-43.
- Svenson S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(3):445-62.
- Tesoriere L, Bongiorno A, Pintaudi AM, D'Anna R, D'Arpa D, Livra MA. Synergistic interactions between vitamin A and vitamin E against lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes. *Arch. Biochem. Biophys*. 1996;326(1):57-63.
- Thomas J, Jacob GP, Abraham L, Noushad B. The effect of smoking on the ocular surface and the precorneal tear film. *Australas Med J*. 2012;5(4):221-6.

- Tiffany JM, Winter N, Bliss G. Tear film stability and tear surface tension. *Curr Eye Res.* 1989;8(5):507-15.
- Tiffany JM. Tears in health and disease. *Eye.* 2003;17(8):923-6.
- Tiffany JM. The normal tear film. *Dev Ophthalmol.* 2008;41:1-20.
- Tiffany JM. The viscosity of human tears. *Int Ophthalmol.* 1991;15(6):371-6.
- Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(10):4309-15.
- Torrás J, Moreno S. Revisión: lágrimas artificiales. *Annals d'Oftalmologia.* 2006;14(2):70-84.
- Toshida H, Nakayasu K, Kanai A. Effect of cyclosporine a eyedrops on tear secretion in rabbit. *Jpn J Ophthalmol.* 1998;42(3):168-73.
- Toshida H, Odaka A, Koike D, Murakami A. Effect of retinol palmitate eye drops on experimental keratoconjunctival epithelial damage induced by n-heptanol in rabbit. *Cur Eye Res.* 2008;33(1):13-8.
- Trost K, Skalicky M, Nell B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Vet Ophthalmol.* 2007;10(3):143-6.
- Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, *et al.* Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(4):390-5.
- Tu EY. Balancing antimicrobial efficacy and toxicity of currently available topical ophthalmic preservatives. *Saudi J Ophthalmol.* 2014;28(3):182-7.
- Turner K, Pflugfelder SC, Ji Z, Feuer WJ, Stern M, Reis BL. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea.* 2000;19(4):492-6.
- Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(11):1131-5.
- Vandamme TF. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21(1):15-34.
- Vibhute S, Kawtikwar P, Kshirsagar S, Sakarkar D. Formulation and evaluation of tear substitutes. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2010;2(1):17-20.
- Vicario de la Torre M. Desarrollo y caracterización de nuevas formulaciones para el tratamiento del síndrome de ojo seco. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2011.

Vico E, Quereda A, Benítez-Del-Castillo JM, Fernández Pérez C, García-Sánchez J. Estudio comparativo entre el hialuronato sódico al 0,15% y el alcohol polivinílico como tratamiento para el ojo seco. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2005;80(7):387-94.

Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, LeVeque FG, Salisbury PL, Tran-Jonhson TK, *et al*. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren Syndrome: a randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. P92-01 Study Group. *Arch Intern Med*. 1999;159(2):174-81.

Vogel R, Crockett RS, Oden N, Laliberte TW, Molina L. Demonstration of efficacy in the treatment of dry eye disease with 0.18% sodium hyaluronate ophthalmic solution (Vismed, Rejena). *Am J Ophthalmol*. 2010;149(4):594-601.

Wakamatsu TH, Dogru M, Tsubota K. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq Bras Ophthalmol*. 2008;71(6 Suppl):72-9.

Wallace DJ, (Ed). (2012). *The Sjogren's book*, New York, USA: Oxford University Press.

Walsh K, Jones L. The use of preservatives in dry eye drops. *Clin Ophthalmol*. 2019;13:1409-25.

Wegener AR, Meyer LM, Schönfeld CL. Effect of viscous agents on corneal density in dry eye disease. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015;31(8):504-8.

Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, *et al*. TFOS DEWS II Tear film report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):366-403.

Williams DL. A comparative approach to topical cyclosporine therapy. *Eye*. 1997;11(4):453-64.

Wilson SE, Linag Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(10):2185-90.

www.arvo.org

www.tearlab.com

Xiong C, Chen D, Liu J, Liu B, Li N, Zhou Y, *et al*. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(5):1850-6.

Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A, Ohtori A, Takeuchi H, Ohguro N, *et al*. Mucoadhesive properties of chitosan-coated ophthalmic lipid emulsion containing indomethacin in tear fluid. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(7):1266-71.

Yang G, Espandar L, Mamalis N, Prestwich GD. A cross-linked hyaluronan gel accelerates healing of corneal epithelial abrasion and alkali burn injuries in rabbits. *Vet Ophthalmol*. 2010;13(3):144-50.

Yee RW, Sperling HG, Kattek A, Paukert MT, Dawson K, Garcia M, *et al.* Isolation of the ocular surface to treat dysfunctional tear syndrome associated with computer use. *Ocul Surf.* 2007;5(4):308-15.

Yoshino K, Garg R, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Production and secretion of transforming growth factor beta (TGF-beta) by the human lacrimal gland. *Curr Eye Res.* 1996;15(6):615-24.

Zimmerman TJ, Kooner KS, Kandarakis AS, Ziegler LP. Improving the therapeutic index of topically applied ocular drugs. *Arch Ophthalmol.* 1984;102(4):551-3.

Zuazo F, López-Ponce DE, Salinas-Toro D, Valenzuela F. Citología de impresión conjuntival en pacientes con valores de OSDI normales y alterados. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2014;89(10):391-6.

8. ABREVIATURAS

A.S.: altamente significativo

Ac Asc: ácido ascórbico

AHAG: ω -acil- ω -hidroxi ácidos grasos

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARN: *ácido ribonucleico*

Asc Na: ascorbato sódico

BAC: cloruro de benzalconio (Benzalkonium Chloride)

BUT: tiempo de ruptura de la película lagrimal (Tear Breakup Time)

CAI: Centro de Apoyo a la Investigación

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

Cht: colesterol

CIC: Citología de impresión conjuntival

CsA: Ciclosporina A

CV: coeficiente de variación

DE: desviación estándar

DEQ: cuestionario de ojo seco (Dry Eye Questionnaire)

DEQS: cuestionario de ojo seco (Dry Eye-Related Quality-of-Life Score)

DEWS: taller sobre ojo seco (Dry Eye WorkShop)

DGM: disfunción de las glándulas de Meibomio

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)

EER: error estándar relativo

EGF: factor de crecimiento epitelial (Epithelial Growth Factor)

EMA: Agencia Europea del Medicamento (European Medical Agency)

EOS: enfermedad de ojo seco

FBS: suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum)

FC: fosfatidilcolina

FL_{con}: formulación liposomal blanco con polímero

FL_{sin}: formulación liposomal blanco sin polímero

FL-CsA_{con}: formulación liposomal con Ciclosporina A con polímero

FL-CsA_{sin}: formulación liposomal con Ciclosporina A sin polímero

FL-E_{con}: formulación liposomal enriquecida con polímero

FL-E_{sin}: formulación liposomal enriquecida sin polímero

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

H₃BO₃: ácido bórico

HaNa: hialuronato sódico

HCLE: línea celular del epitelio limbo-corneal humano (Human Corneal Limbal Epithelial)

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte Growth Factor)

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (High Pressure Liquid Chromatography).

HS-SPME-GCMS: cromatografía de gases - espectrometría de masas acoplado a microextracción en fase sólida (Headspace Solid Phase Microextraction – Gas Chromatography Mass Spectrometry)

Ig: inmunoglobulina

IL: interleucina

IOBA: Instituto de Oftalmobiología Aplicada

KCS: queratoconjuntivitis seca (Keratoconjunctivitis Sicca)

LUV: vesícula liposomal unilamelar grande (Large Unilamellar Vesicle)

MAO: monoamino oxidasa

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MLV: vesículas liposomales multilaminares (Multilamellar Vesicle)

MMPs: metalopeptidasas de matriz (Matriz MetalloProteinases)

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

N.S. no significativo

NaCl: cloruro sódico

NFkB: factor nuclear kB (Nuclear Factor kB)

NGF: factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor)

OD: ojo derecho

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (Organization for Economic, Cooperation and Development)

OI: ojo izquierdo

OQAS: sistema de análisis de la calidad óptica (Optical Quality Analysis System)

OSDA: ojo seco por deficiencia acuosa

OSDI: índice de trastorno de la superficie ocular (Ocular Surface Disease Index)

OSE: ojo seco evaporativo

OSI: índice de dispersión ocular (Oqas Scattering Index)

Palm Asc: palmitoil-L-ascórbico

PAS: ácido peryódico de Schiff (Periodic Acid Schiff)

PBS: solución tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

PGE: prostaglandinas E

SAP: sal trisódica del ácido 2-fosfo-L-ascórbico (Sodium Ascorbyl Phosphate)

SUV: vesículas unilamelares pequeños (Small Unilamellar Vesicle)

T: tiempo

TFOS: Sociedad para la película lagrimal y la superficie ocular (Tear Fill & Ocular Surface)

TGF: factor de crecimiento transformante (Transforming Growth Factor)

TNF: factor de necrosis tumoral (Tumoral Necrosis Factor)

UCM: Universidad Complutense de Madrid

v:v: relación volumen – volumen

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Vit A: vitamina A

Vit C: vitamina C

Vit E: vitamina E