UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Nano y microtecnología aplicada al diseño de nuevas formulaciones para el tratamiento del glaucoma

Nano and microtechnology applied to the design of novel formulations for glaucoma treatment

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miriam Ana González-Cela Casamayor

DIRECTORAS

Dra. Rocío Herrero Vanrell
Dra. Irene Teresa Molina Martínez
Dra. Marta Vicario de la Torre

© Miriam Ana González-Cela Casamayor, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

NANO Y MICROTECNOLOGÍA APLICADA AL DISEÑO DE NUEVAS FORMULACIONES PARA EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA.
NANO- AND MICRO- TECHNOLOGY APPLIED TO THE DESIGN OF NOVEL FORMULATIONS FOR GLAUCOMA TREATMENT.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Miriam Ana González-Cela Casamayor

DIRECTORAS

Dra. Rocío Herrero Vanrell
Dra. Irene Teresa Molina Martínez
Dra. Marta Vicario de la Torre

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DOCTORADO EN FARMACIA

TESIS DOCTORAL

NANO Y MICROTECNOLOGÍA APLICADA AL DISEÑO DE NUEVAS FORMULACIONES PARA EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA.
NANO- AND MICRO- TECHNOLOGY APPLIED TO THE DESIGN OF NOVEL FORMULATIONS FOR GLAUCOMA TREATMENT.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Miriam Ana González-Cela Casamayor

DIRECTORAS

Dra. Rocío Herrero Vanrell
Dra. Irene Teresa Molina Martínez
Dra. Marta Vicario de la Torre

AGRADECIMIENTOS

Este camino no hubiera sido posible sin la ayuda de todos los que se han cruzado en él. Quiero empezar dando las gracias a mis directoras las doctoras Rocío Herrero Vanrell, Irene Teresa Molina Martínez y Marta Vicario de la Torre por haberme permitido realizar el doctorado en este gran grupo de investigación. Gracias por todo el trabajo que han realizado a lo largo no solo de mis años de tesis doctoral, sino de toda su carrera, que me ha permitido completar mi formación en un grupo tan completo y enriquecedor. Quiero dar las gracias en particular a la Doctora Rocío Herrero Vanrell por su dedicación a la investigación y a todos nosotros sin importar la circunstancia, por apostar por mí y por todo el esfuerzo que ha puesto estos cinco años. También me gustaría dar las gracias a la Doctora Irene Teresa Molina Martínez por guiarme durante estos años como directora y por supuesto por haberme dado la oportunidad de aprender de ella. Gracias a la doctora Marta Vicario de la Torre, por todos los consejos y por estar siempre dispuesta a ayudar.

No pueden faltar los agradecimientos al resto de supervisoras del grupo de investigación, Irene Bravo Osuna y Vanessa Andrés Guerrero, por haberme guiado, enseñado y aconsejado durante toda mi tesis doctoral.

Gracias a la doctora Emilia Barcia Hernández y al doctor Damián Córdoba Díaz, directores del departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria durante mis años de tesis doctoral, por haberme permitido realizar la tesis en el departamento y haber brindado su ayuda en todo momento.

I would like to thank Dr. Wenxin Wang and Dra. Hongyun Tai and all the research group at Blafar Ltd. for allowing me to learn in their lab during my months of secondment. Gracias a la doctora Irene Lara Sáez y al doctor Darío Manzanares Sandoval de la University College of Dublin, por guiarme y ayudarme a completar mi formación en cultivo celular.

Thanks to Dr. Michael J. Young for allowing me to do a research stay at the Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School and allowing me to learn new techniques, also thanks to Dra. Karen Chan for being available to always help and teaching all her knowledge to me.

Gracias también al ministerio de educación por el contrato FPU que me ha permitido realizar el doctorado estos últimos 4 años.

Gracias por supuesto a mis compañeros de laboratorio, que han compartido esta experiencia conmigo y han sido un gran apoyo en todo momento, siendo los que mejor comprendían la situación. Gracias por todos los jueves de desconexión.

Gracias a David García por haberme enseñado durante mi año de beca de colaboración y también por la ayuda y por los consejos durante todos estos años. A Sergio Esteban por haberme puesto a prueba y haberme impulsado a tomar la decisión de emprender este camino.

Gracias a Alba Aragón, por haber sido mi compañera a tiempo completo durante mi tesis doctoral, incluso mi doble en muchas ocasiones. Gracias por haber compartido conmigo las dos estancias y ser un apoyo en ellas.

A Marco Brugnera, no solo por dedicar su tiempo a enseñarme en el laboratorio y aconsejarme, sino también por hacerme ver que soy una excelente profesora de español. Gracias por todos los cafés compartidos, por haber sido siempre un gran apoyo en el laboratorio y por haberme ayudado siempre que lo he necesitado, tanto a nivel laboral como personal.

Gracias por supuesto a Javier López por haber trabajado conmigo mano a mano durante gran parte de mi tesis. Gracias por haberme enseñado todo lo que se de cultivo celular, por haber tenido siempre paciencia y haber estado siempre dispuesto a ayudar. Ha sido un placer trabajar con un investigador como tú, capaz de contagiar la pasión por la ciencia, el optimismo y las ganas de descubrir y profundizar más. Ha sido muy enriquecedor aprender de ti.

También quiero agradecer a Elena, compañera de laboratorio durante un año y medio, que ojalá hubiera sido más. Gracias por la capacidad que tienes de alegrarle el día a cualquiera, por ponerle humor a todo, entender siempre la situación y escuchar. Gracias por todas las pausas que fueron tan necesarias, por haber mejorado gran parte de este camino haciéndolo más divertido, por ser una gran persona y por haberte convertido en una amiga en tan poco tiempo.

Gracias a Cristina Morilla por la ayuda brindada los últimos meses de tesis. Por estar siempre dispuesta a aprender y a ayudar. Muchas gracias por implicarte en mi trabajo y por la proactividad. Sin tu ayuda habría sido mucho más estresante esta etapa final de la tesis.

Gracias a las alumnas Maider, Matilde y Eni por estar siempre dispuestas a ayudar y por dar alegría a nuestro laboratorio.

Gracias a mis amigos por apoyarme en todo momento, por animarme día a día y por creer en mí.

Gracias a Michel por todo el apoyo brindado durante gran parte de mi tesis doctoral. Gracias por creer en mí más que yo misma, por animarme a superarme cada día, por aguantar en los malos momentos y por acompañarme con paciencia en este camino.

También quiero agradecer a mis padres por haberme sido siempre un gran apoyo, por haber confiado siempre en mí y haber estado para todo. Gracias por inculcarme el valor del esfuerzo a lo largo de toda mi vida y por haberme empujado siempre a apuntar alto. Gracias por supuesto por haber hecho un esfuerzo para permitirme tener la formación que tengo hoy y haberme dado las mejores oportunidades.

A mis padres

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS **21**

RESUMEN - SUMMARY **27**

INTRODUCCIÓN **41**

1 Anatomía y fisiología ocular 43

1.1 Capas del globo ocular 43

1.2 Segmentos del globo ocular 45

1.3 La retina 46

2 La superficie ocular 48

2.1 La película lagrimal 48

2.2 Córnea 52

2.3 Conjuntiva 54

3 Vías de administración para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares 55

3.1 Vía tópica 56

3.2 Vías perioculares 57

3.3 Vía intraocular 58

4 Patologías crónicas de la superficie ocular con etiología inflamatoria 59

4.1 La enfermedad del ojo seco (EOS) 59

4.2 Tratamiento de la enfermedad del ojo seco 63

4.2.1 Medidas higiénicas y ambientales y mejora de la dieta 64

4.2.2 Sustitutos de la lágrima 65

4.2.3 Tratamiento con secretagogos 70

4.2.4 Tratamientos de conservación de la lágrima 72

4.2.5 Antiinflamatorios 72

4.2.6 Procedimientos quirúrgicos 75

4.3 Nuevos sistemas para el tratamiento tópico de la enfermedad del ojo seco 76
4.3.1 Insertos y lentes de contacto. 77
4.3.2 Nanopartículas. 77
4.3.3 Microesferas 78
4.3.4 Hidrogeles 78
4.3.5 Dendrímeros 78
4.3.6 Nanosistemas lipídicos 79
5 Patologías que afectan al nervio óptico y la retina. 85
5.1 La enfermedad del Glaucoma 85
5.2 Hipotensión y neuroprotección como dianas terapéuticas para el tratamiento del glaucoma 88
5.2.1 Reducción de la presión intraocular en el tratamiento del glaucoma 88
5.2.2 Neuroprotección como diana terapéutica para el tratamiento del glaucoma. 92
5.3 Nanotecnología y nuevos sistemas de liberación controlada para el tratamiento del Glaucoma. 97
5.3.1 Liposomas. 97
5.3.2 Emulsiones/Microemulsiones. 99
5.3.3 Dendrímeros. 100
5.3.4 Hidrogeles. 100
5.3.5 Insertos e implantes intraoculares. 101
5.3.6 Micropartículas y nanopartículas. 102
OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO 105
CAPÍTULO I - CHAPTER I. A novel osmoprotective liposomal formulation from synthetic phospholipids to reduce *in vitro* hyperosmolar stress in dry eye treatments 111
1 Introduction 117
2 Materials and methods 120

2.1 Materials 120
2.2 Liposome preparation 121
2.3 Characterization 122
2.4 *In vitro* studies 123
2.4.1 Cell cultures 123
2.4.2 *In vitro* tolerance determination in human epithelial corneal and conjunctival cells 123
2.4.3 Osmoprotective studies by hyperosmolar stress simulation 124
2.5 *In vivo* acute tolerance studies 125
2.6 Data analysis 126
3 Results 126
3.1 Morphological studies and physicochemical characterization 126
3.2 *In vitro* tolerance studies 129
3.2.1 Preliminary studies for the selection of components 129
3.2.2 *In vitro* tolerance evaluation in hTERT-HCECs and IM-HConEpiC cells 131
3.2.3 Osmoprotective studies 133
3.3 *In vivo* acute tolerance studies 135
4 Discussion 136
5 Conclusions 142
6 Supplementary Materials 143
7 References 159

CAPÍTULO II - CHAPTER II. Novel Osmoprotective DOPC-DMPC Liposomes Loaded with Antihypertensive Drugs as Potential Strategy for Glaucoma Treatment 169

1 Introduction 175
2 Materials and Methods 176
2.1 Materials 176
2.2 Liposome Preparation 177

2.3 Determination of the Physicochemical Properties of the Liposomal Formulations 179
2.4 HPLC Quantification and Encapsulation Efficiency of the Active Ingredients 180
2.5 *In Vitro* Studies in Human Cell Lines 181
2.5.1 Cell Cultures 181
2.5.2 *In Vitro* Tolerance Determination in Human Corneal hTERT-HCECs Cells 182
2.5.3 *In Vitro* Tolerance Determination in Human Conjunctival IM-HConEpiC Cells 183
2.5.4 Osmoprotection Studies by Hyperosmolar Stress Simulation in hTERT-HCECs Corneal Cells 183
2.6 *In Vivo* Studies 184
2.6.1 Animals 184
2.6.2 *In Vivo* Hypotensive Studies 184
2.7 Data Analysis 185
3 Results 186
3.1 Physicochemical Determination 186
3.2 HPLC Quantification and Encapsulation Efficiency of Active Ingredients 188
3.3 *In Vitro* Studies 189
3.3.1 In Vitro Tolerance Evaluation in hTERT-HCECs 189
3.3.2 *In Vitro* Tolerance Evaluation in Human Conjunctival Cells 191
3.3.3 Osmoprotection Studies 192
3.4 *In Vivo* Hypotensive Efficacy Studies 193
3.4.1 Brimonidine Liposomal Formulations 193
3.4.2 Travoprost Liposomal Formulations 197
4 Discussion 200
5 Conclusions 207
6 Supplementary Materials 208

7 References 211

CAPÍTULO III - CHAPTER III. Tri-loaded PLGA microspheres with neuroprotective and hypotensive drugs for glaucoma treatment. 221

1 Introduction 227

2 Material and methods 229

2.1 Materials 229

2.2 PLGA Microspheres preparation 229

2.3 Latanoprost, ketorolac and melatonin quantification by HPLC. 230

2.4 Microspheres characterization 230

2.4.1 Mean particle size and particle distribution. 230

2.4.2 Morphology evaluation of MSs 231

2.4.3 Encapsulation efficiency 231

2.4.4 *In vitro* release studies 231

2.5 *In vitro* cytotoxicity studies 232

2.5.1 Cell Cultures 232

2.5.2 Cytotoxicity assay 232

3 Results 233

3.1 Polymer selection 233

3.1.1 Microspheres characterization 233

3.1.1.1 Size and morphology 233

3.1.1.2 Encapsulation efficiency 236

3.1.2 *In vitro* release studies 237

3.2 Technological development of multi-loaded formulations 238

3.2.1 Microspheres characterization 238

3.2.1.1 Size and morphology 238

3.2.1.2 Encapsulation efficiency 241

3.2.2 *In vitro* release studies 243

3.2.3 *In vitro* cell assays 246

3.2.3.1 Cytotoxicity assay 246
4 Discussion 247
5 Conclusion 251
6 References 252
DISCUSIÓN GENERAL 259
CONCLUSIONES – CONCLUSIONS 275
BIBLIOGRAFÍA 281

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

-**ADDE**: Ojo seco por deficiencia acuosa. Del inglés “Aqueous Deficient Dry Eye”.

- **AH**: Ácido hialurónico.

- **APV**: Alcohol polivinílico.

- **BDNF**: factor neurotrófico derivado del cerebro. Del inglés “Brain-Derived Neurotrophic Factor”.

- **CCG**: Capa de células ganglionares.

- **CGR**: Células ganglionares de la retina.

- **CNE**: Capa nuclear externa.

- **CNI**: Capa nuclear interna.

- **CPE**: Capa plexiforme externa.

- **CPI**: Capa plexiforme interna.

- **CMC**: Carboximetil celulosa.

- **CNTF**: Factor neurotrófico ciliar. Del inglés “Ciliary neurotrophic factor”.

- **CSE**: Segmentos externos e internos de fotorreceptores.

- **CsA**: Ciclosporina A.

- **DED**: Enfermedad de ojo seco. Del inglés “Dry Eye Disease”.

- **DMAE**: Degeneración macular asociada a la edad.

- **DMSO**: Dimetilsulfóxido.

- **EDE**: Ojo seco evaporativo. Del inglés “Evaporative Dry eye”.

- **EICH**: Enfermedad de injerto contra huésped.

ABREVIATURAS

- **EMD**: Edema macular diabético.

- **EOR:** Especies de oxígeno reactivo.

- **EOS**: Enfermedad del ojo seco.

- **EPR**: Epitelio pigmentario de la retina.

- **FDA**: Agencia Americana de alimentos y fármacos. Del inglés "Food and Drug Administration".

-**GDNF**: Factor neurotrófico derivado de la glía. Del inglés "Glial cell line-derived neurotrophic factor".

- **GPAA**: Glaucoma primario de ángulo abierto.

- **GAC**: Glaucoma de ángulo cerrado.

- **GAPDH**: Gliceraldehídos 3-fosfato deshidrogenasa.

- **HPC**: Hidroxipropilcelulosa.

- **HPMC**: Hidroxipropilmetilcelulosa.

- **ICAM-1**: Molécula 1 de adhesión intercelular.

- **IDDS**: Intraocular drug delivery systems.

- **IgA**: Inmunoglobulina A.

- **IGF-1**: Factor de crecimiento similar a la insulina 1.

- **IgG**: Inmunoglobulina G.

- **IgM**: Inmunoglobulina M.

- **IL**: Interleucina.

- **LFA-1**: Antígeno-1 asociado a la función linfocitaria.

- **LUV**: Vesículas unilamelares grandes. Del inglés "Large Unilamellar Vesicle".

- **MAPK**: Vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos. Del inglés “Mitogen Activated Protein Kinases”.

- **MLE**: Membrana limitante externa.

- **MLI**: Membrana limitadora interna.

- **MLV**: Vesículas multilamelares grandes. Del inglés “Multi Lamellar Vesicle”.

- **MSs**: Microesferas.

- **NMDA**: N-metil-D-aspartato.

- **MMP**: Metaloproteinasas de matriz Del inglés “Matrix Metalloproteinases”.

- **MPs**: Micropartículas.

- **NADPH**: Nicotiamida-Adenina Dinucleótido fosfato.

- **NF-kB**: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Del inglés “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”.

- **NLC**: Portadores lipídicos nanoestructurados.

- **NSL**: Nanopartículas lipídicas sólidas.

- **PAMAM**: Dendrímero de poliamidoamina.

- **PIO**: Presión intraocular.

- **PLGA**: Ácido poli(láctico-co-glicólico).

- **RD**: Retinopatía diabética.

- **RP**: Retinosis pigmentaria.

- **RH-NGF**: Factor de crecimiento nervioso humano recombinante.

- **TFG-β**: Factor de crecimiento transformante.

- **TFOS**: Sociedad internacional de la película lagrimal y la superficie ocular. Del inglés “Tear Film and Ocular surface Society”

- **TSG-6**: Gen/proteína 6 estimulado/a por el factor de necrosis tumoral alfa.

- **VEGF**: Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular.

RESUMEN - SUMMARY

RESUMEN-SUMMARY

RESUMEN

El glaucoma es una enfermedad ocular crónica de etiología multifactorial que cursa con degeneración de la retina y el nervio óptico, originando de forma progresiva una pérdida de visión. El principal factor de riesgo modificable asociado a la enfermedad del glaucoma es el aumento de la presión intraocular (PIO), por lo que actualmente la administración de fármacos antiglaucomatosos por vía tópica es la principal línea de tratamiento.

El mayor inconveniente del tratamiento tópico del glaucoma es la baja biodisponibilidad asociada a la administración tópica ocular, lo que conlleva una mayor frecuencia de administración, afectando al cumplimiento terapéutico y aumentando la aparición de efectos secundarios. Entre los efectos adversos de esta terapia destaca la relación entre la aplicación tópica de formulaciones de agentes hipotensores y la enfermedad del ojo seco (EOS), una patología con etiología inflamatoria de la superficie ocular producida por la desestabilización de la película lagrimal que produce elevadas molestias oculares, y cuyo tratamiento consiste principalmente en la aplicación de lágrimas artificiales en la superficie ocular con el fin de suplementar la película lagrimal y reducir los signos y síntomas. El desarrollo de la EOS en el glaucoma se ha relacionado con los principios activos antiglaucomatosos administrados y con la presencia de conservantes en las formulaciones tópicas de aplicación en la superficie ocular, lo que va a producir o empeorar el desarrollo de síntomas de la EOS, causando también una peor adherencia terapéutica por parte del paciente. Por este motivo ha cobrado importancia la necesidad de desarrollar formulaciones tópicas para el tratamiento del glaucoma que sean capaces de suplementar y proteger la superficie ocular. En este sentido resulta de gran interés el desarrollo de formulaciones de administración tópica que aporten componentes esenciales para restablecer la homeostasis de la película precorneal.

Atendiendo a su composición, la película precorneal cuenta con componentes acuo-proteicos y mucinosos que se combinan para formar un gel hidratado. Dicho gel queda recubierto por una capa lipídica cuya función principal es evitar la evaporación del agua de la lágrima y mejorar su estabilidad. Resulta por tanto prometedor el empleo de formulaciones liposomales con el objeto de suplementar la capa lipídica de la película lagrimal, favoreciendo así su estabilidad y evitando así la evaporación de la lágrima.

Además, desde el punto de vista tecnológico los liposomas gracias a su estructura formada por una bicapa lipídica y un núcleo acuoso van a permitir la encapsulación de principios activos tanto de naturaleza acuosa como oleosa. Otra ventaja del empleo de formulaciones liposomales es la posibilidad de incluir fácilmente compuestos osmoprotectores capaces de frenar el círculo vicioso producido por el estrés hiperosmolar característico de la EOS y polímeros bioadhesivos que aumenten el tiempo de contacto de las formulaciones con la superficie ocular y que puedan tener también un efecto osmoprotector.

Otro de los inconvenientes del tratamiento del glaucoma es que los fármacos hipotensores no son efectivos en todos los casos, y muchas veces no se consigue frenar el desarrollo de la enfermedad a pesar de mantener una disminución de la PIO. Además, hay que tener en cuenta que la degeneración de la retina y el nervio óptico puede aparecer en pacientes con valores de PIO normales como es el caso del glaucoma normotensivo. Esto, junto con la presencia de neurodegeneración de las células ganglionares de retina y la pérdida de visión en pacientes en los que se ha conseguido controlar la PIO aumenta la necesidad de recurrir a la terapia neuroprotectora para el tratamiento de esta enfermedad. Es por ello que la terapia multifactorial del glaucoma ha cobrado gran importancia los últimos años, ya que permite el tratamiento de la enfermedad abordando distintas dianas terapéuticas.

A diferencia del tratamiento hipotensor, cuando el foco se centra en la neuroprotección, la diana terapéutica se encuentra localizada en el segmento posterior del ojo. Esto hace necesario recurrir a la administración intraocular para alcanzar concentraciones efectivas en la retina. Sin embargo, en el caso de las inyecciones intraoculares el problema gira alrededor de los efectos adversos relacionados con su invasividad, especialmente importantes al tratarse de una enfermedad crónica que requiere múltiples administraciones, surgiendo así la necesidad de recurrir a la nano y microtecnología para conseguir liberaciones prolongadas y sostenidas tras la administración intraocular de los sistemas, reduciendo así el número de inyecciones necesarias.

En la presente tesis doctoral se han llevado a cabo formulaciones basadas en la nano y microtecnología para la mejora del tratamiento de la enfermedad del glaucoma, ya sea mediante la protección de la superficie ocular al reducir los efectos adversos del tratamiento, mediante el aumento de biodisponibilidad de fármacos antiglaucomatosos administrados de forma tópica o mediante el desarrollo de sistemas de liberación controlada de administración intravítrea.

Con este fin, en el **Capítulo I** de la tesis doctoral se empleó la nanotecnología para desarrollar una formulación liposomal compuesta por fosfolípidos sintéticos derivados de la fosfatidilcolina, colesterol y vitamina E incluyendo un polímero bioadhesivo y compuestos con actividad osmoprotectora que pudiera, por un lado, mejorar los síntomas y prevenir el desarrollo de la EOS en pacientes con glaucoma, y por otro lado servir de vehículo para la administración de principios activos antiglaucomatosos por vía tópica. Los fosfolípidos empleados fueron la 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y la 1,2-dimyristoyl-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC). El uso de lágrimas artificiales para el tratamiento del ojo seco a base de liposomas elaborados con este tipo de fosfolípidos aporta distintas ventajas como su buena tolerancia en la superficie ocular, así como la capacidad de suplementar la capa lipídica de la película lagrimal evitando así la evaporación de la lágrima. A esto hay que añadir la capacidad de los liposomas para aumentar la biodisponibilidad de fármacos por vía tópica gracias a su capacidad de interacción con las células de la superficie ocular. La inclusión de osmoprotectores en las lágrimas artificiales es un recurso de gran utilidad para frenar el círculo vicioso de la hiperosmolaridad producido en la superficie ocular de estos pacientes, evitando así el daño en las células de córnea y conjuntiva. Por este motivo se seleccionaron los osmoprotectores taurina y ribitol para completar la formulación. Para la selección de los componentes de las formulaciones liposomales se llevaron a cabo ensayos de tolerancia de todos ellos en células de córnea. Las formulaciones liposomales de aproximadamente 200 nm de diámetro de vesícula se prepararon con y sin la adición del polímero HPMC y fueron caracterizadas atendiendo a sus propiedades fisicoquímicas, obteniéndose valores adecuados de tamaño, pH, osmolaridad, tensión superficial y viscosidad para la administración de la superficie ocular. Además, tras la adición de HPMC a las formulaciones se observó un aumento de viscosidad, permitiendo así prolongar el tiempo de residencia de la formulación en la superficie ocular. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios de tolerancia *in vitro* de las formulaciones en dos líneas celulares humanas de células de la superficie ocular (córnea y conjuntiva), confirmando una tolerancia óptima (>80% de viabilidad celular). Además, la buena tolerancia de las formulaciones observada *in vitro* fue confirmada con la realización de ensayos de tolerancia aguda *in vivo* en conejos albinos neozelandeses normotensos, mostrando en todos los casos una ausencia de molestias y alteraciones en la córnea, conjuntiva y los párpados. Como paso final, la capacidad osmoprotectora *in vitro* de las formulaciones liposomales desarrolladas en el capítulo I fue evaluada en un modelo de estrés hiperosmolar desarrollado en células

epiteliales de córnea humana, obteniéndose como resultado un aumento de viabilidad celular de entre el 33% y el 47% con respecto al control sin tratamiento y por tanto demostrando una elevada protección de la superficie ocular frente al estrés hiperosmolar característico de la EOS.

Tras el desarrollo de una lágrima artificial con potencial para tratar y prevenir el desarrollo de EOS a base de liposomas en el capítulo I, y partiendo de la misma, se llevó a cabo el desarrollo de formulaciones para el tratamiento tópico del glaucoma. Para ello se aprovechó el desarrollo previo de las formulaciones liposomales utilizándose como plataforma debido a su conocida capacidad para aumentar la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía tópica, y en el **Capítulo II** se seleccionaron las dos formulaciones con mejores propiedades, una con el polímero HPMC y otra sin el mismo, y se incluyeron dos principios activos antiglaucomatosos: Por un lado se desarrollaron formulaciones liposomales empleando el principio activo acuoso brimonidina (FL-B y FLP-B), y por otro lado el principio activo oleoso travoprost (FL-T y FLP-T). Todas las formulaciones liposomales antiglaucomatosas mantuvieron las características fisicoquímicas adecuadas para la administración en la superficie ocular y nuevamente se observó un aumento de viscosidad con la adición del HPMC (FLP-B y FLP-T). La tolerancia *in vitro* en células de córnea y conjuntiva fue evaluada, y se compararon los resultados con los de las formulaciones de referencia de brimonidina y travoprost. Los resultados mostraron una superioridad en la tolerancia *in vitro* de las formulaciones liposomales respecto a los preparados comerciales de referencia, siendo un indicador de la buena tolerancia de nuestras formulaciones. Además, en el capítulo II se comprobó que el efecto osmoprotector *in vitro* de las formulaciones liposomales se mantuvo con la adición de los principios activos antiglaucomatosos. Para comprobar la eficacia de las formulaciones liposomales desarrolladas en este capítulo se llevó a cabo el estudio de la reducción de la PIO *in vivo* en conejos albinos neozelandeses, y los resultados fueron comparados con los referentes a los preparados comerciales de referencia. En ambos casos, las formulaciones liposomales mostraron ventajas significativas respecto a los preparados comerciales. Tanto la formulación liposomal de brimonidina como la de travoprost tuvieron un comienzo del efecto hipotensor más rápido con respecto a sus respectivos preparados comerciales, comenzando 1 hora tras la administración en el caso de las formulaciones liposomales en comparación con las 2 horas para las formulaciones comerciales. Además, las formulaciones liposomales prolongaron el tiempo de reducción

de la PIO, aumentando de 7 horas a 10 horas en el caso de las formulaciones liposomales de brimonidina, y de 24 a 48 horas en el caso de las de travoprost. Cabe destacar que la adición de HPMC a las formulaciones liposomales supuso ventajas para ambos principios activos, de forma que las áreas bajo la curva de la reducción de la PIO obtenida para las formulaciones liposomales FL-B y FLP-B fueron 1,3 y 1,5 veces mayores respectivamente que la obtenida para el preparado comercial. De forma similar, las áreas bajo la curva para FL-T y FLP-T fueron 1,5 y 1,7 veces superiores a las correspondientes a la formulación comercial de travoprost respectivamente.

Finalmente, en el **Capítulo III** se desarrolló una formulación de liberación sostenida de administración intravítrea para abordar el tratamiento del glaucoma desde el punto de vista multifactorial. Además del tratamiento enfocado en reducir la PIO en los pacientes de glaucoma, también es necesario abordar el tratamiento desde el punto de vista de la neuroprotección, con el objetivo de frenar la progresión de la neurodegeneración de las células ganglionares de la retina característica de esta enfermedad. Con este objetivo se encuentra en auge el uso de sistemas de liberación intraocular, capaces de liberar cantidades efectivas de fármacos neuroprotectores durante periodos prolongados de tiempo. Dentro de estos sistemas destaca el uso de microesferas biodegradables de PLGA, un polímero aprobado por la EMA y la FDA para la elaboración de dispositivos de administración intraocular que resulta bien tolerado. Por ello, en el capítulo III se elaboraron microesferas de PLGA multicargadas con un principio activo antiinflamatorio (ketorolaco) y un principio activo antioxidante (melatonina) y se realizó una selección del tipo de PLGA más adecuado para logar una liberación sostenida, para posteriormente estudiar la adición de vitamina E y del agente hipotensor latanoprost a la formulación. Las microesferas obtenidas fueron esféricas y de un tamaño aproximado de 30 µm. El PLGA que logró un mejor perfil de liberación fue el PLGA 85:15. Posteriormente, se llevaron a cabo la caracterización y los estudios de liberación *in vitro* de los principios activos a partir de las MSs de PLGA 85:15, en primer lugar con la adición del antioxidante vitamina E, y posteriormente de dos cantidades diferentes de latanoprost. Para confirmar la buena tolerancia de microesferas de PLGA descrita en la bibliografía, se realizaron estudios de tolerancia *in vitro* en células del epitelio pigmentario de la retina, mostrando tolerancias superiores al 90% para todas las microesferas de PLGA 85:15 (Sin cargar, cargadas con todos los principios activos, y con los principios activos de forma individual). Las eficacias de encapsulación de ketorolaco y melatonina no sufrieron

cambios significativos con la adición de vitamina E o latanoprost y la similitud de los perfiles de liberación de ketorolaco, melatonina y latanoprost de las diferentes MSs se estudió mediante el factor f_2, demostrado que las formulaciones resultaron similares en todos los casos. Además, las formulaciones desarrolladas con MSs de PLGA 85:15 que contenían ketorolaco, melatonina y latanoprost lograron liberar todos los principios activos durante más de 70 días, destacando la liberación sostenida de latanoprost, que a los 70 días de liberación todavía no había alcanzado el 70% de la cantidad encapsulada en las microesferas.

Los resultados obtenidos indican que las microesferas multicargadas con tres agentes activos presentan unas características idóneas para su administración por vía intraocular en el tratamiento del glaucoma.

SUMMARY

Glaucoma is a chronic eye disease of multifactorial etiology that causes degeneration of the retina and optic nerve, leading to progressive loss of vision. The main modifiable risk factor associated with glaucoma disease is the increase in intraocular pressure (IOP), so topical administration of antiglaucomatous drugs is currently the main line of treatment.

The major drawback of topical glaucoma treatment is the low bioavailability associated with topical ocular administration, which leads to a higher frequency of administration, affecting therapeutic compliance and increasing the occurrence of side effects. Among the adverse effects of this therapy is the relationship between the topical application of hypotensive agent formulations and dry eye disease (DED), a pathology with inflammatory etiology of the ocular surface produced by the destabilization of the tear film that produces high ocular discomfort, and whose treatment consists mainly of the application of artificial tears on the ocular surface in order to supplement the tear film and reduce the signs and symptoms. The development of DED in glaucoma has been related to the antiglaucomatous active substances administered and the presence of preservatives in the topical formulations for application to the ocular surface, which will produce or worsen the development of DED symptoms, also causing poor therapeutic patient adherence. For this reason, the need to develop topical formulations for the treatment of glaucoma that are capable of supplementing and protecting the ocular surface has become increasingly important. In this sense, the development of topical formulations that provide essential components to restore the homeostasis of the precorneal film is of great interest.

According to its composition, the precorneal film has aqueous-protein and mucinous components that combine to form a hydrated gel. This gel is covered by a lipid layer whose main function is to prevent evaporation of tear water and improve its stability. Therefore, the use of liposomal formulations to supplement the lipid layer of the tear film, thus favoring its stability and preventing tear evaporation, is promising. Moreover, from a technological angle, liposomes, thanks to their structure formed by a lipidic bilayer and an aqueous core, will allow the encapsulation of active substances of both aqueous and oily nature. Another advantage of the use of liposomal formulations is the possibility of easily including osmoprotective compounds capable of stopping the vicious circle produced by the hyperosmolar stress characteristic of DED and bioadhesive polymers

that increase the contact time of the formulations with the ocular surface and that can also have an osmoprotective effect.

Another of the disadvantages of glaucoma treatment is that hypotensive drugs are not effective in all cases, and often the development of the disease cannot be halted despite maintaining a decrease in IOP. Furthermore, it should be taken into account that retinal and optic nerve degeneration can appear in patients with normal IOP values, as in the case of normotensive glaucoma. This, together with the presence of neurodegeneration of retinal ganglion cells and loss of vision in patients in whom IOP control has been achieved, increases the need to resort to neuroprotective therapy for the treatment of this disease. This is why multifactorial glaucoma therapy has gained great importance in recent years since it allows treatment of the disease by addressing different therapeutic targets.

Unlike hypotensive treatment, when the focus is on neuroprotection, the therapeutic target is located in the posterior segment of the eye. This makes it necessary to resort to intraocular administration to achieve effective concentrations in the retina. However, in the case of intraocular injections the problem revolves around the adverse effects related to their invasiveness, especially important in the case of a chronic disease that requires multiple administrations, thus arising the need to resort to nano- and micro-technology to achieve prolonged and sustained releases after intraocular administration of the systems, thus reducing the number of injections required.

In this doctoral thesis, nano- and micro- technology based formulations have been developed to improve the treatment of glaucoma disease, either by protecting the ocular surface reducing the adverse effects of treatment, by increasing the bioavailability of topically administered antiglaucomatous drugs, or by developing controlled release systems for intravitreal administration.

To this end, in **Chapter I** of the doctoral thesis, nanotechnology was used to develop a liposomal formulation composed of synthetic phospholipids derived from phosphatidylcholine, cholesterol and vitamin E including a bioadhesive polymer and compounds with osmoprotective activity that could, on the one hand, improve the symptoms and prevent the development of DED in glaucoma patients, and on the other hand, serve as a vehicle for the administration of antiglaucomatous drugs topically. The

phospholipids used were 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC). The use of artificial tears for the treatment of dry eye based on liposomes made with this type of phospholipids provides several advantages such as good tolerance on the ocular surface, as well as the ability to supplement the lipid layer of the tear film, thus preventing tear evaporation. To this must be added the ability of liposomes to increase the bioavailability of topical drugs thanks to their capacity to interact with the cells of the ocular surface. The inclusion of osmoprotectants in artificial tears is a very useful resource to stop the vicious circle of hyperosmolarity produced on the ocular surface of these patients, thus avoiding damage to corneal and conjunctival cells. For this reason, the osmoprotectants taurine and ribitol were selected to complete the formulation. For the selection of the components of the liposomal formulations, tolerance tests of all of them were carried out on corneal cells. Liposomal formulations of approximately 200 nm vesicle diameter were prepared with and without the addition of the HPMC polymer and were characterized according to their physicochemical properties, obtaining adequate values of size, pH, osmolarity, surface tension and viscosity for ocular surface administration. In addition, after the addition of HPMC to the formulations, an increase in viscosity was observed, thus allowing prolonging the residence time of the formulation on the ocular surface. Subsequently, *in vitro* tolerance studies of the formulations were carried out on two human cell lines of the ocular surface (cornea and conjunctiva), confirming optimal tolerance (>80% cell viability). Furthermore, the good tolerance of the formulations observed *in vitro* was confirmed by performing *in vivo* acute tolerance tests in normotensive New Zealand albino rabbits, showing in all cases an absence of discomfort and alterations in the cornea, conjunctiva and eyelids. As a final step, the *in vitro* osmoprotective capacity of the liposomal formulations developed in chapter I was evaluated in a hyperosmolar stress model developed in human corneal epithelial cells, resulting in an increase in cell viability of between 33% and 47% with respect to the untreated control and thus demonstrating a high protection of the ocular surface against the hyperosmolar stress characteristic of DED.

Following the development of an artificial tear based on liposomes with the potential to treat and prevent the development of DED in chapter I, and based on it, the development of formulations for the topical treatment of glaucoma was carried out. For this purpose, the previous development of liposomal formulations was used as a platform due to their

known capacity to increase the bioavailability of drugs administered topically, and in **Chapter II** the two formulations with the best properties were selected, one with the HPMC polymer and the other without it, and two antiglaucomatous drugs were included: On the one hand liposomal formulations were developed employing an aqueous active substance brimonidine (FL-B and FLP-B) , and on the other hand the oily active substance travoprost (FL-T and FLP-T). All antiglaucomatous liposomal formulations maintained physicochemical characteristics suitable for ocular surface administration and again an increase in viscosity was observed with the addition of HPMC (FLP-B and FLP-T). *In vitro* tolerance in corneal and conjunctival cells was evaluated, and the results were compared with those of the reference formulations of brimonidine and travoprost. The results showed a superiority in the *in vitro* tolerance of the liposomal formulations with respect to the commercial reference preparations, being an indicator of the good tolerance of our formulations. In addition, in chapter II it was found that the *in vitro* osmoprotective effect of the liposomal formulations was maintained with the addition of the antiglaucomatous drugs. To test the efficacy of the liposomal formulations developed in this chapter, the study of IOP reduction *in vivo* in New Zealand albino rabbits was carried out, and the results were compared with those concerning commercial reference preparations. In both cases, the liposomal formulations showed significant advantages over the commercial preparations. Both the liposomal formulation of brimonidine and travoprost had a faster onset of the hypotensive effect with respect to their respective commercial preparations, starting 1 hour after administration in the case of the liposomal formulations compared to 2 hours for the commercial formulations. In addition, the liposomal formulations prolonged the IOP reduction time, increasing from 7 hours to 10 hours for the liposomal formulations of brimonidine, and from 24 to 48 hours for those of travoprost. It is noteworthy that the addition of HPMC to the liposomal formulations was advantageous for both active substances, such that the areas under the curve of IOP reduction obtained for the liposomal formulations FL-B and FLP-B were 1.3 and 1.5 times greater, respectively, than that obtained for the commercial preparation. Similarly, the areas under the curve for FL-T and FLP-T were 1.5 and 1.7 times higher than those corresponding to the commercial formulation of travoprost, respectively.

Finally, in **Chapter III**, a sustained-release formulation for intravitreal administration was developed to approach glaucoma treatment from a multifactorial angle. In addition to treatment focused on reducing IOP in glaucoma patients, it is also necessary to

approach treatment from neuroprotection, with the aim of slowing the progression of neurodegeneration of retinal ganglion cells characteristic of this disease. With this objective in mind, the use of intraocular release systems, capable of releasing effective quantities of neuroprotective drugs over prolonged periods of time, is on the rise. Among these systems, the use of biodegradable PLGA microspheres, a polymer approved by the EMA and the FDA for the development of intraocular delivery devices that is well tolerated, stands out. Therefore, in **Chapter III**, PLGA microspheres were prepared multi-loaded with an anti-inflammatory active substance (ketorolac) and an antioxidant active substance (melatonin) and a selection of the most suitable type of PLGA to achieve sustained release was made, and then the addition of vitamin E and the hypotensive agent latanoprost to the formulation was studied. The microspheres obtained were spherical and approximately 30 µm in size. The PLGA that achieved the best release profile was PLGA 85:15. Subsequently, characterization and *in vitro* release studies of the active principles from the PLGA 85:15 MSs were carried out first with the addition of the antioxidant vitamin E, and subsequently of two different amounts of latanoprost. To confirm the good tolerance of PLGA microspheres described in the literature, *in vitro* tolerance studies were performed on retinal pigment epithelium cells, showing tolerances above 90% for all PLGA 85:15 microspheres (Unloaded, loaded with all active substances, and with the active substances individually). The encapsulation efficiencies of ketorolac and melatonin did not change significantly with the addition of vitamin E or latanoprost and the similarity of the release profiles of ketorolac, melatonin and latanoprost from the different MSs was studied using the f_2 factor, showing that the formulations were similar in all cases. In addition, the formulations developed with 85:15 PLGA MSs containing ketorolac, melatonin and latanoprost managed to release all the active substances for more than 70 days, highlighting the sustained release of latanoprost, which at 70 days of release had not yet reached 70% of the amount encapsulated in the microspheres.

The results obtained indicate that the multi-loaded microspheres with three active agents present ideal characteristics for intraocular administration in the treatment of glaucoma.

RESUMEN-SUMMARY

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 Anatomía y fisiología ocular

El sentido de la vista nos permite crear imágenes del mundo exterior a partir de estímulos luminosos, transformándolas en impulsos nerviosos que llegan al cerebro a través del nervio óptico. El ojo es el órgano de la visión. El globo ocular tiene un tamaño comprendido entre los 2,2 y los 2,7 cm de diámetro y está compuesto por varias capas. Anatómicamente se encuentra dividido en dos segmentos separados por el cristalino: el segmento anterior y el segmento posterior [1].

1.1 Capas del globo ocular

Atendiendo a su estructura, el globo ocular está dividido en varias capas: la capa fibrosa o córneoescleral, la capa vascular o úvea y la capa nerviosa.

- Capa fibrosa: La capa fibrosa está formada por la córnea y la esclerótica. La **córnea** se encuentra en la zona anterior del globo ocular y está unida a la esclerótica por el limbo corneal. Es transparente y su espesor es de aproximadamente 600 µm. Gracias a sus propiedades refractivas permite el paso de la luz del exterior al interior del ojo, además de tener función protectora, evitando infecciones oculares. La córnea está formada por el epitelio corneal, formado a su vez por de 5 a 7 capas, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio [2].
- La **esclerótica** es la capa superficial y servirá de protección al globo ocular. Esta capa es más fina en la parte anterior, y su grosor aumenta en la parte posterior. En la parte posterior se encuentra la lámina cribosa con perforaciones a través de las cuales salen los haces nerviosos del nervio óptico y las fibras se mielinizan [3,4]. La esclera está recubierta por la cápsula de Tenon, una lámina fibrosa que abarca desde el limbo esclerocorneal hasta el nervio óptico.
- Capa vascular: La capa vascular o úvea está compuesta por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. El **iris** se encuentra delante del cristalino y es un diafragma en cuyo centro se encuentra la pupila, un orificio circular que regula la entrada de luz al

ojo. En la periferia del iris se encuentra el borde ciliar, que consta de dos arterias encargadas de abastecer al iris. El iris es el responsable del color de los ojos característico de cada persona, y está altamente pigmentado gracias a la presencia de melanocitos. El **cuerpo ciliar** está unido al iris por la raíz del iris y es el encargado de producir el humor acuoso necesario para la hidratación de la córnea y del cristalino, estructuras oculares sin riego sanguíneo. Otra de sus funciones es modificar la forma del cristalino permitiendo enfocar los objetos, gracias a la musculatura lisa involuntaria llamada músculo ciliar, compuesto por fibras circulares, radiales y longitudinales que actúan sobre las fibras de la zónula ajustando la curvatura del cristalino [5]. Por último, la **coroides**, situada entre la esclerótica y la retina, es una zona altamente vascularizada, lo que va a permitir nutrir y aportar oxígeno a la retina. Está formada por tres capas: la lámina externa o estroma que contiene venas y arterias, la lámina capilar conocida como capa de Sattler y la capa de Haller constituida por células pigmentadas [5]. Los coriocapilares de la coroides y el epitelio pigmentario retiniano (EPR) están separados por la membrana de Bruch, la capa más interna de la coroides.

- Capa nerviosa: Está formada por la **ora serrata**, límite anterior de la retina en contacto con el cuerpo ciliar que ocupa el tercio anterior de la capa nerviosa, siendo la parte más delgada, y la **retina neural**, cuya función es la de transformar los estímulos lumínicos en impulsos nerviosos gracias a la presencia de los fotorreceptores (conos y bastones), enviando señales a través del nervio óptico hasta el cerebro.

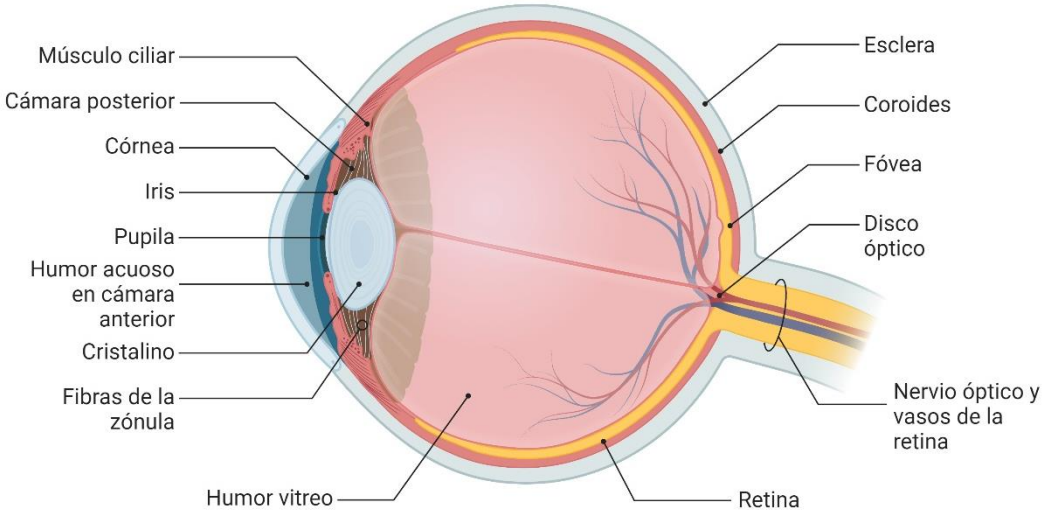

Figura 1: Anatomía del globo ocular. Creada con Biorender (biorender.com).

1.2 Segmentos del globo ocular

- El **segmento anterior** del ojo está formado por dos cámaras: **la cámara anterior**, situada entre la córnea y el iris, y la **cámara posterior**, situada entre el iris y el cristalino. El segmento anterior se encuentra bañado por el humor acuoso, fluido transparente producido por el cuerpo ciliar, de naturaleza similar al plasma sanguíneo con funciones de nutrición y deshecho de productos del metabolismo. Para mantener la forma del globo ocular es necesario que la producción y drenaje del humor acuoso se encuentren equilibradas.

  La producción y drenaje del humor acuoso está mediada por el cuerpo ciliar, la vía trabecular, la vía uveoescleral y el iris [6]. El epitelio ciliar es el encargado de producir el humor acuoso que será secretado a través del cuerpo ciliar, accediendo así a la cámara posterior, desde donde fluirá hasta atravesar la pupila y pasar a la cámara anterior. Posteriormente el humor acuoso saldrá de la cámara anterior a través de la malla trabecular llegando al canal de Schlemm. Finalmente, el humor acuoso llega a los canales colectores, desde donde se absorbe en las venas epiesclerales.
- El **segmento posterior** está formado por la coroides, la retina y el disco óptico. El fluido que rellena este espacio es el humor vítreo, encargado de estabilizar el

globo ocular y aportar oxígeno a la retina y el cristalino. El **humor vítreo** es un fluido transparente de 4 mL de volumen en humanos con una alta viscosidad. Su naturaleza es acuosa, y contiene macromoléculas como colágeno, fibrilina y ácido hialurónico [3], las cuales van a aportar viscosidad y rigidez y van a permitir la expansión del humor vítreo en forma de matriz. El humor vítreo contribuye a mantener la presión interna en el globo ocular, además de permitir la transmisión de la luz.

1.3 La retina

La retina, al igual que el nervio óptico, es una prolongación del sistema nervioso central. Gracias al sistema óptico va a recibir la imagen visual, transformando la energía luminosa en una señal que, a través del nervio óptico, llegará a la corteza visual [7]. La retina tiene un doble suministro de sangre. El tercio exterior de la retina recibe su nutrición a través de los coriocapilares, y los dos tercios interiores a través de la arteria y la vena central de la retina [3]. Cabe destacar que la retina es un tejido altamente especializado. En el área periférica se encuentra la ora serrata, que va a conectar la retina con el cuerpo ciliar. En el área central de la retina se encuentran la mácula lútea, la fóvea y el disco óptico. La mácula contiene una elevada cantidad de pigmentos xantofílicos, lo que le va a proporcionar el color amarillo. En el centro de la mácula lútea se encuentra la fóvea central, una depresión considerada el centro óptico. El disco óptico está formado por fibras nerviosas que no tienen capacidad visual, por lo que ha recibido el nombre de “punto ciego”.

Estructuralmente hablando, la retina está dividida en la retina externa o epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la retina interna o sensorial.

Epitelio pigmentario de la retina (EPR): El epitelio pigmentario está formado por una capa de células epiteliales pigmentarias cuboidales con poca capacidad de regeneración, y que se encuentra repleta de melanosomas. Va a actuar de barrera entre la retina y la coroides, y entre sus funciones destacan el aporte de vitaminas, la fagocitosis de los extremos de los fotorreceptores y la reducción de la dispersión de la luz, protegiendo ante la fotooxidación. Cada una de las células del EPR tiene varias prolongaciones de la membrana apical, dando servicio hasta a 45 fotorreceptores. En el espacio extracelular entre el EPR y los fotorreceptores se encuentra la matriz

interfotorreceptora, formada por una sustancia compuesta por glicosaminoglicanos [8].

Retina neural: Si nos centramos en su estructura microscópica la neurorretina está dividida en nueve capas, como se aprecia en la Figura 2:

- Segmentos externos e internos de los fotorreceptores (CSE): Formado por los bastones y conos, elementos sensibles a la luz.
- Membrana limitante externa (MLE): Formada por las uniones intercelulares de las células de Müller y de los fotorreceptores.
- Capa nuclear externa (CNE): Formada por los núcleos de los fotorreceptores.
- Capa plexiforme externa (CPE): Formada por la unión de las dendritas de las células horizontales y bipolares y los axones de los fotorreceptores.
- Capa nuclear interna (CNI): Formada por los cuerpos celulares de las células de Müller, las células amacrinas, horizontales y bipolares.
- Capa plexiforme interna (CPI): Formada por la sinápsis entre las dendritas de las células ganglionares y amacrinas con los axones de las células bipolares.
- Capa de células ganglionares (CCG).
- Capa de fibras nerviosas.
- Membrana limitante interna (MLI): Capa que separa la retina del humor vítreo y está formada por las terminaciones de las células de Müller y una capa basal.

Para llegar a los conos y bastones la luz debe atravesar todas estas capas.

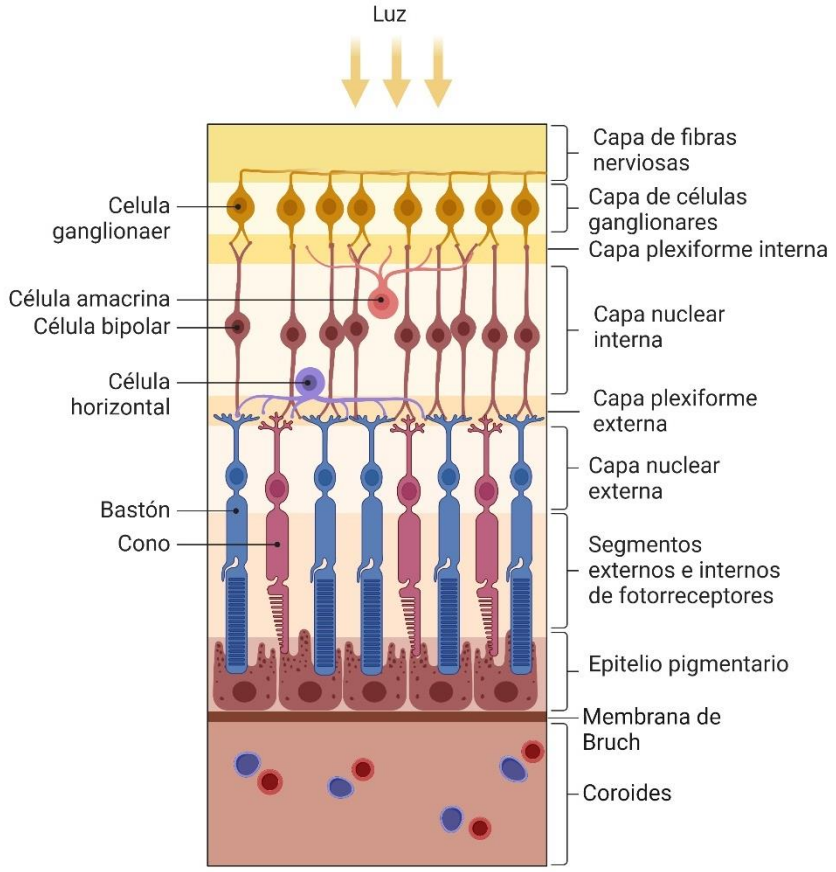

Figura 2: Estructura microscópica de la retina. Creada con Biorender (biorender.com).

2 La superficie ocular

La superficie ocular está formada por la película lagrimal, los párpados, la conjuntiva y la córnea. Tiene función protectora, tanto anatómica como fisiológica e inmunológica.

2.1 La película lagrimal

La película lagrimal conocida también como *film* lagrimal se dispone sobre la córnea, la conjuntiva y la esclera. Según el TFOS II, su grosor se encuentra comprendido entre 2 y 5,5 µm [9]. Tiene una importante función nutritiva y protectora, y está compuesta por dos capas: una capa acuomucinosa situada sobre la superficie ocular, y una capa lipídica externa (Figura 3) [10]. La producción de la fase acuosa de las lágrimas tiene lugar en la glándula lagrimal y los tejidos

lagrimales accesorios, mientras que la producción de la capa lipídica se produce en las glándulas de Meibomio [11] El parpadeo facilita la extensión de la película sobre la superficie ocular. Cuando la superficie ocular está expuesta a condiciones ambientales adversas se produce una alteración de la película precorneal con la consiguiente evaporación del agua de la lágrima y el aumento de la tonicidad de la lágrima. Esto producirá un flujo de agua a través del epitelio corneal por los canales de acuaporina, recuperando la tonicidad inicial.

Como se ha señalado en el párrafo anterior la película lagrimal cuenta con una capa acuomucinosa y una lipídica.

- Capa acuomucinosa: La capa acuosa de la película lagrimal es secretada por la glándula lagrimal y por los tejidos lagrimales. Su función es muy importante, ya que proporciona nutrientes y oxígeno a la córnea y ayuda a eliminar toxinas y cuerpos extraños de la superficie ocular. Además de agua, dentro de su composición se encuentran glucosa, albúmina, sales, urea y otras proteínas con importante función. Otra de las funciones principales de la película lagrimal es la de protección. Esto se debe en parte a la presencia de anticuerpos, entre los que se encuentran la inmunoglobulina A (IgA), la inmunoglobulina G (IgG) y la inmunoglobulina M (IgM). La principal inmunoglobulina presente en la película lagrimal precorneal es la IgA (10-80 mg/dL) y desempeña un papel importante en la inmunidad que protege contra virus, bacterias y parásitos [12,13]. También se debe destacar la presencia de proteínas como la lipocalina, la lactoferrina, transferrina, las glicoproteinas y la lisozima.

  La lactoferrina es un antimicrobiano inespecífico que actúa uniéndose al hierro y evita así que las bacterias lo metabolicen, se encuentra en la lágrima y también es capaz de unirse al cobre, a la IgA, a la IgG y a las proteínas del complemento, modulando así el sistema inmunitario [13]. Otra proteína también con función antimicrobiana es la lisozima. La lisozima es secretada por la glándula lagrimal y se considera una primera línea de defensa contra los patógenos oculares. Actúa hidrolizando el peptidoglicano que forma la pared celular bacteriana [13]. La lipocalina,

junto con la lactoferrina y la lisozima, es secretada por el tejido acinar de la glándula lagrimal. Se trata de una proteína con capacidad de unirse a los lípidos y parece interaccionar también con la lisozima y la lactoferrina [12]. Su principal función es la de estabilizar la película lagrimal teniendo un importante papel al ser capaz de unirse a lípidos como el colesterol, los ácidos grasos y los fosfolípidos, lo que permite su solubilización y transporte, eliminándolos de la superficie corneal y transportándolos a la capa lipídica para aumentar su estabilidad [2].

La película lagrimal contiene diferentes tipos de mucinas, todos ellos con una importante función. Estos mucopolisacárdos son secretados por los epitelios corneal y conjuntival y por la glándula lagrimal. Los dos tipos principales son las mucinas asociadas a la membrana también conocidas como transmembrana y las mucinas secretadas. Las mucinas secretadas pueden ser de dos tipos: mucinas formadoras de gel y mucinas solubles. Las mucinas solubles son capaces de reducir la tensión superficial de la película lagrimal, una función importante para garantizar la extensibilidad. Dentro de las mucinas solubles se encuentra la MUC7, cuya función aún no está del todo esclarecida, a pesar de que se presenta en diferentes cantidades en pacientes normales y en pacientes con enfermedad del ojo seco (EOS). Por otro lado, las mucinas formadoras de gel, gracias a sus propiedades reológicas, permiten el ajuste de la viscosidad de la película lagrimal preocular al parpadear. Su peso molecular es mayor, pudiendo alcanzar los 40 MDa. Una de las mucinas formadoras de gel más importantes es la MUC5AC, que es producida por las células caliciformes de la conjuntiva y es responsable de la hidratación de la superficie ocular. Cabe destacar que se ha encontrado una disminución de la MUC5AC en pacientes con patologías de la superficie ocular como la EOS. Otra de sus funciones es la de eliminar patógenos de la superficie ocular atrapándolos en la capa de moco y con ayuda del parpadeo [9].

Las mucinas asociadas a la membrana se encuentran en los epitelios estratificados de la superficie ocular, formando un glicocálix entre el epitelio y la película lagrimal. Se anclan a la membrana plasmática de las células epiteliales de la córnea y la conjuntiva a través de su dominio

transmembrana de carácter hidrofóbico, y sirven de anclaje para las mucinas secretadas por su dominio hidrófilo. Dentro del repertorio de mucinas asociadas a membrana podemos encontrar la MUC1, MUC4 y MUC16. Estas mucinas también se encuentras alteradas en pacientes con patologías de la superficie ocular.

Las mucinas secretadas son mucinas hidrofílicas y están cargadas negativamente, lo que favorece una repulsión que les permite deslizarse sobre las mucinas ancladas a membrana, facilitando así que el párpado se deslice sobre el epitelio. Por otro lado, la carga negativa también facilitará la repulsión de patógenos de la superficie ocular. Entre los residuos terminales responsables de conferir alta carga negativa se encuentra el ácido siálico, que además podría favorecer el bloqueo de la adhesión de bacterias patógenas al unirse a las adhesinas en su lugar [14].

- Capa lipídica: La capa lipídica es la capa más externa de la película lagrimal. Su producción tiene lugar en las glándulas de Meibomio e incluye una compleja variedad de lípidos. Dentro de sus funciones, destaca la protección frente a la evaporación de la lágrima y la reducción de la tensión superficial favoreciendo la extensión de la película lagrimal sobre la superficie ocular. Dentro de la capa lipídica podemos encontrar lípidos anfifílicos y lípidos apolares. El grupo de los lípidos anfifílicos parece formar una subcapa que interactúa con los compuestos lagrimales polares y no polares, de forma que las cabezas polares se orientan hacia la capa acuosa y las apolares junto con los lípidos apolares, favoreciendo así la estabilidad de la película. Está compuesto por fosfolípidos que incluyen la fosfatidilcolina, la lisofosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina y otros como los esfingolípidos. La subcapa lipídica apolar comprende principalmente ésteres de cera, ésteres de colesterol y triglicéridos. Esta subcapa está directamente en contacto con el aire y cuando está en cantidades adecuadas impide la evaporación de la capa acuosa. Si la capa lipídica se desestabiliza, la evaporación acuosa aumenta, lo que provoca patologías como la enfermedad del ojo seco (EOS). Además, un desequilibrio entre los lípidos anfifílicos y apolares producirá un desequilibrio en las propiedades viscoelásticas de la película lagrimal [9].

2.2 Córnea

La córnea es la estructura central de la superficie ocular. Tiene una función importante en la visión, ya que es un tejido transparente con propiedades refractivas. Además, tiene otras funciones como la de hidratación y protección contra daños mecánicos e infecciones.

La córnea se divide en cinco capas (Figura 3):

- El epitelio corneal: Es un tejido estratificado, escamoso y no queratinizado que se renueva constantemente. Es responsable de la protección de la córnea y está formado por varias capas. La capa más profunda está compuesta por células basales con propiedades mitóticas, seguidas de células alares y, por último, una capa de células que se encuentran en la superficie. Cuando se produce una lesión, las células epiteliales se deslizan cubriendo la región dañada. Posteriormente tiene lugar un proceso mitótico regenerando la región. Además, las células corneales epiteliales expresan acuaporina-5 que forma los canales encargados de transportar agua a través del epitelio.

  En su parte más interna, entre el epitelio corneal y el estroma se encuentra la membrana basal epitelial (BM), encargada de la adhesión de las células epiteliales al estroma. Su función es la de regular los niveles de citoquinas y factores de crecimiento y está implicada en la migración, la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales. Además, tiene un papel importante en la cicatrización de la córnea. Tiene un alto contenido de colágeno tipo IV y laminina producida por las células basales [15,16].
- La membrana de Bowman: Se localiza entre la membrana basal y el estroma anterior. Su formación parece deberse a la interacción entre los queratocitos del estroma y las células epiteliales. Se cree que las influencias quimiotácticas mediadas por las citocinas del epitelio regulan el desarrollo y el mantenimiento de la membrana de Bowman en el ser humano. Está formada por colágeno, principalmente de tipo I, III y V, y

no tiene capacidad regenerativa. Su función consiste en proteger el plexo nervioso subepitelial [17].

- El estroma: Ocupa la mayor parte de la córnea, representando el 90% de su grosor. Su componente principal es el colágeno, que formará láminas regulares. Además, también destaca su contenido en queratocitos y proteoglicanos. Es una capa muy inervada, y gracias a su disposición va a permitir el paso de la luz y su dispersión. Esto se consigue gracias a la interacción entre los proteoglicanos (como el lumican y el queratocan) con el colágeno tipo I, IV y XII, permitiendo que las fibrillas de colágeno mantengan su posición. Los queratocitos están dispuestos entre las láminas de colágeno y son los encargados de sintetizar los componentes del estroma. Además, en respuesta a las señales de las células epiteliales de la córnea van a entrar en apoptosis o convertirse en fenotipos reparadores en la presencia de daño [18].
- La membrana de Descemet: Está formada por dos capas y alcanza un grosor de 10 µm en la edad adulta. La capa anterior está compuesta por colágeno tipo IV y VIII formando un entramado hexagonal. La capa posterior es secretada por el endotelio y con el paso del tiempo aumenta su grosor. La función de la membrana de Descemet es mantener la hidratación de la córnea y proteger el endotelio. De hecho, se han observado episodios de edema corneal en pacientes en los que se produce una ruptura de esta membrana. Además, parece tener capacidad de resistencia frente a la presión intraocular [19].
- Endotelio: Es la capa más profunda de la córnea, separando la misma del humor acuoso y está formada por una única capa de células hexagonales. Las células endoteliales van a tener una lenta capacidad de proliferación, lo que hace que su número disminuya con la edad al no poder remplazar la pérdida de células [20]. Su función principal es regular la hidratación del estroma gracias a la presencia de bombas iónicas, manteniendo así la transparencia de la córnea. Por otro lado, se ha sugerido que los canales de acuaporina-1 presentes en el endotelio son los responsables de regular el transporte de agua a través del endotelio y la clave para prevenir el edema corneal [21,22].

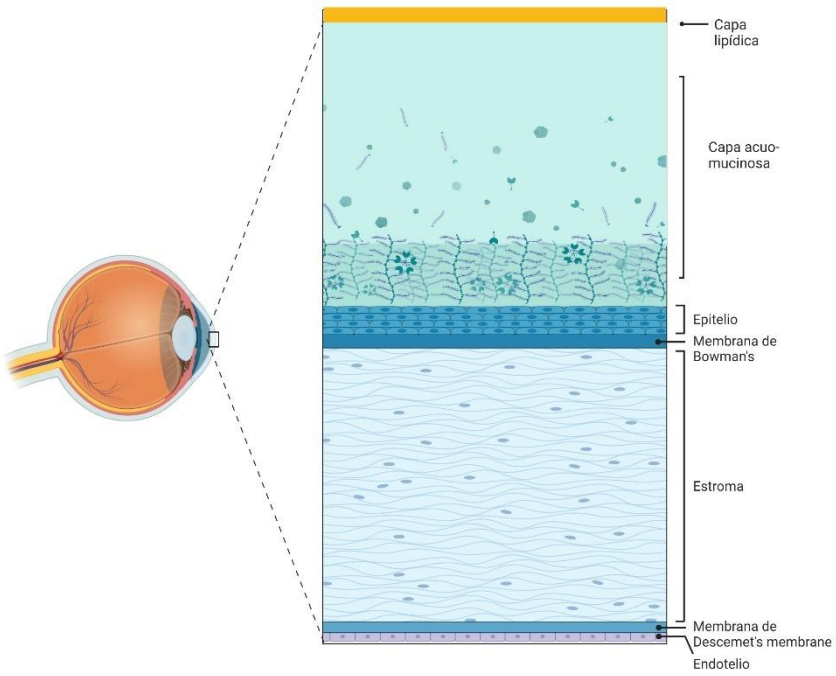

Figura 3: Estructura de la córnea y de la película lagrimal. Creada con Biorender (biorender.com).

2.3 Conjuntiva

La conjuntiva se divide en la conjuntiva bulbar, que se encuentra cubriendo la esclerótica, y la conjuntiva palpebral que recubre la capa interna de los párpados. Estos dos tipos de conjuntiva están unidos por la conjuntiva del fórnix. Se trata de una fina capa mucosa transparente muy vascularizada y está formada por el epitelio conjuntival, la membrana basal y la lámina propria [5].

- Epitelio conjuntival: Consta de 3-5 capas celulares. La más profunda se denomina epitelio basal y está separada del epitelio corneal por el epitelio limbal. Contiene dos tipos principales de células regulados por factores de crecimiento: células escamosas estratificadas y células caliciformes. Las células escamosas estratificadas van a secretar agua y electrolitos. Las células calciformes son responsables de la secreción de las mucinas presentes en la película lagrimal. Esta función es esencial para mantener una correcta lubricación del ojo, y su reducción puede ser responsable de

patologías como la enfermedad de ojo seco. En la superficie apical de la conjuntiva se encuentran las llamadas microvellosidades y microplacas, pliegues apicales que van a aumentar la superficie y que estabilizan la película lagrimal [5]. Se ha demostrado la presencia de células de Langerhans en esta zona implicadas en la respuesta inmunitaria, capaces de migrar a la córnea cuando se produce una inflamación de la conjuntiva [23].

- Lámina propria: Compuesta por tejido conectivo. Es una zona muy vascularizada y está formada por una capa adenoidea, y otra fibrosa. La capa adenoidea actúa como barrera inmunológica, ya que presenta gran cantidad de linfocitos. Por otro lado, la capa fibrosa está formada por colágeno, y posee gran cantidad de vasos sanguíneos y nervios. Cabe destacar el sistema linfático asociado a la conjuntiva (CALT) que se encuentra sobre todo en la conjuntiva palpebral. Está formado por folículos linfoides, que se encuentran formando acumulaciones de linfocitos B y células dendríticas foliculares, vasos especializados, linfocitos intraepiteliales y una capa linfoide. La capa linfoide contiene a su vez linfocitos, principalmente células T, y células plasmáticas que producen principalmente IgA. Además, estas células se acompañan a veces de mastocitos granulares. Su función es la protección inmunitaria de la superficie ocular [24].

3 Vías de administración para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares

El tratamiento de patologías oftálmicas es de vital importancia debido a la gravedad derivada de las molestias oculares y la pérdida de visión. Para su tratamiento, se puede emplear tanto una administración que implique efecto sistémico como la administración local. El principal inconveniente de la administración de fármacos que actúan a nivel ocular es conseguir que el fármaco llegue a los tejidos y células diana, lo cual se ve dificultado por la presencia de barreras mecánicas y fisiológicas oculares.

La utilización de administraciones que implican efecto sistémico se ve dificultada por las barreras hematoacuosa y hematoretiniana que limitan la difusión de los fármacos al globo ocular y la necesidad de utilizar dosis elevadas para alcanzar concentraciones eficaces en el lugar de acción, lo que provoca un aumento de la toxicidad [25].

En cuanto a la administración oftálmica, existen varias vías: La vía tópica, las vías perioculares y la vía intraocular. Si se pretende que el fármaco acceda al interior del ojo el acceso a la diana terapéutica cuando se emplea la vía tópica se encuentra limitado por diversos factores como el drenaje lagrimal, el parpadeo, el drenaje linfático, el epitelio corneal de baja permeabilidad, la barrera hematoocular, la absorción sistémica, etc. Por tanto, para la administración de los fármacos que actúan en el segmento posterior se recurre a las vías perioculares e intraocular que son más efectivas [25].

3.1 Vía tópica

La vía tópica es la primera línea de tratamiento para las patologías oculares debido a su baja invasividad y su alta aceptación por parte del paciente.

La administración tópica ocular se realiza frecuentemente mediante la administración de gotas oftálmicas en la superficie ocular, depositándose en el saco conjuntival. Las gotas oftálmicas suelen tener un volumen aproximado de 35-50 µL. Sin embargo, el volumen máximo que admite el saco conjuntival ronda los 25-30 µL, produciéndose una eliminación parcial de la formulación. Además, también se produce la eliminación del fármaco debido al parpadeo y a la renovación de la película lagrimal, que no dura más de 2-3 minutos. Por lo tanto, el mayor inconveniente de la vía tópica ocular es su baja biodisponibilidad, ya que solo un 5% del principio activo es el que alcanza su objetivo terapéutico [26,27]. El paso a través del epitelio de la córnea puede producirse por dos vías: La vía paracelular y la vía transcelular. La vía paracelular consiste en el paso a través de las uniones intercelulares. Esta penetración está más dificultada en el epitelio corneal debido a que los espacios son pequeños. Por el contrario, en el endotelio las uniones son menos limitantes facilitando la penetración. En la vía transcelular, como su nombre indica, la sustancia atraviesa las células corneales. El epitelio corneal y el endotelio ofrecen resistencia al paso de moléculas de naturaleza hidrófila debido su naturaleza lipófila. El estroma corneal, por el contrario, al estar formado por fibrillas de colágeno tiene propiedades hidrofílicas, lo

que dificulta el paso de las moléculas lipofílicas. Por lo tanto, el paso de sustancias a través de la córnea va a estar condicionado por su tamaño y su coeficiente de reparto. Una vez atravesada la córnea, el fármaco pasa al humor acuoso, desde donde puede difundir a los tejidos intraoculares del segmento anterior [2,28,29].

En la incorporación del fármaco a través de la conjuntiva, la pérdida por vía sistémica es mayor debido a la gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos existentes, especialmente cuando se trata de moléculas de pequeño tamaño. El principio activo no eliminado por vía sistémica pasará a los tejidos intraoculares del segmento posterior [30].

Por todo ello, la vía tópica será útil para el tratamiento de patologías del segmento anterior. Sin embargo, para el tratamiento de patologías del segmento posterior esta vía es muy limitada.

3.2 Vías perioculares

Consisten en la administración del fármaco en los tejidos de alrededor del ojo (tejidos perioculares) para conseguir un efecto local o para alcanzar dianas terapéuticas intraoculares. La administración periocular se puede llevar a cabo mediante inyecciones en diferentes lugares, siendo las principales la subconjuntival, subtenoniana, yuxtaescleral posterior, retrobulbar y peribulbar.

Para alcanzar los tejidos intraoculares los fármacos administrados por esta vía deberán atravesar barreras como la esclera, con una alta permeabilidad, la coroides, los vasos sanguíneos y linfáticos conjuntivales, la unión a proteínas o la barrera hematoretiniana. Esto supone que solo una pequeña concentración logrará alcanzar el humor vítreo, siendo una vía con baja biodisponibilidad. A pesar de ello, la administración periocular va a permitir alcanzar concentraciones más elevadas en el segmento posterior que la vía tópica, sin ser tan invasiva como las inyecciones intraoculares [31].

3.3 Vía intraocular

La vía intraocular es la más efectiva para conseguir concentraciones terapéuticas en los segmentos anterior y posterior del ojo, ya que la inyección de los principios activos en solución o suspensión se realizará directamente en los compartimentos o tejidos oculares deseados [32,33].

Las inyecciones intraoculares pueden realizarse en diferentes lugares según su objetivo. Por ejemplo, la inyección intracameral se utilizará cuando el objetivo del tratamiento sea actuar en el segmento anterior del ojo. Por otro lado, la vía subretiniana consiste en la administración entre el EPR y la retina neural y es utilizada cuando el objetivo del tratamiento es alcanzar los fotorreceptores y el EPR. Por último, la inyección intravítrea consiste en la administración del principio activo directamente en el humor vítreo y es la más eficiente para el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior [25].

El inconveniente de la vía intraocular es que es una vía invasiva. La administración intravítrea en particular, a pesar de ser la más eficiente, provoca la ruptura de tejidos oculares, y además la elevada concentración de fármaco en el humor vítreo inmediatamente después de la inyección puede resultar tóxica.

Por otro lado, la vía intravítrea se utiliza mayormente para el tratamiento de patologías crónicas, lo que requiere mantener concentraciones eficaces de fármaco en el segmento posterior durante periodos prolongados y, por tanto, la administración de inyecciones repetidas que pueden causar efectos adversos como el desprendimiento de retina, hemorragias vítreas y endoftalmitis, entre otras. Además, el riesgo de que se produzcan los efectos secundarios aumenta con el número de inyecciones. La eliminación de fármacos en el humor vítreo ocurre generalmente de forma rápida y se puede producir por diferentes mecanismos. El fármaco puede pasar hacia el humor acuoso produciéndose un aclaramiento anterior o puede eliminarse a través de la barrera hematoocular, produciéndose en este caso un aclaramiento posterior. Esto hace que incluso los fármacos que tienen una semivida larga requieran de dichas inyecciones repetidas. Por ello, el uso de sistemas de liberación controlada para administración intraocular está en auge, siendo una buena solución para mantener los

principios activos durante largos periodos de tiempo en el segmento posterior y evitar la necesidad de inyecciones repetidas [26].

4 Patologías crónicas de la superficie ocular con etiología inflamatoria

4.1 La enfermedad del ojo seco (EOS)

Según la Sociedad de la película lagrimal y la superficie ocular (TFOS DEWS II), la enfermedad del ojo seco se define de la siguiente manera: "*Dry eye is a multifactorial disease of the ocular surface characterized by a loss of homeostasis of the tear film, and accompanied by ocular symptoms, in which tear film instability and hyperosmolarity, ocular surface inflammation and damage, and neurosensory abnormalities play etiological roles*." [34]. Siendo, por tanto, una enfermedad multifactorial de la superficie ocular producida por una pérdida de la homeostasis de la película lagrimal, que cursa con unos mecanismos fisiopatológicos característicos (inestabilidad de la película lagrimal, inflamación, hiperosmolaridad y daño en la superficie ocular). La pérdida económica generada por la EOS es elevada, especialmente en cuanto a disminución de la productividad y la calidad de vida. Respecto a su prevalencia, aumenta con la edad, especialmente los signos de la enfermedad. Su prevalencia es mayor en población asiática y en mujeres, sobre todo de edad avanzada [35]. El síntoma principal de la EOS es el gran disconfort que presentan los pacientes con síntomas oculares.

Respecto a su **clasificación**, podemos distinguir dos tipos principales, como se observa en la Figura 4.

- Ojo seco por disminución de la secreción acuosa (ADDE):
  La EOS se produce por una disminución de la producción lagrimal. Ocurre, por ejemplo, cuando se produce un daño en las glándulas lagrimales. Esta disminución en la secreción de lágrima, a pesar de que la evaporación sea normal, produce sequedad. Cabe resaltar que la hiperosmolaridad producida por la pérdida de agua y con ello la concentración de solutos de la lágrima, va a activar cascadas inflamatorias, produciendo daño en la superficie ocular. Dentro de este tipo de EOS, podemos encontrar el ADDE asociado a síndrome de Sjögren, y el ADDE no asociado a síndrome de Sjögren. El **síndrome de Sjögren** es una patología en

la que el sistema inmune ataca a las glándulas salivares y lagrimales. Los linfocitos T, al infiltrar las glándulas, van a producir muerte celular e inflamación, y con ello una menor producción de saliva y lágrima. Los pacientes, además de presentar síntomas de EOS, presentarán otros síntomas como sequedad bucal. El ADDE no asociado a síndrome de Sjögren se caracteriza por una disfunción lagrimal, pero, a diferencia del síndrome de Sjögren, la respuesta autoinmune sistémica no está presente. Dentro de este tipo de ADDE se encuentra el ojo seco asociado a la edad, antiguamente llamado queratoconjuntivitis seca (KCS) [34].

- Ojo seco evaporativo (EDE): El ojo seco evaporativo es la forma más frecuente de ojo seco, y está producida por un aumento en la evaporación de la lágrima, manteniendo una producción de lágrima normal. La causa más común de EDE es la disfunción de la glándula de Meibomio, que puede producirse como consecuencia de algunos tipos de dermatitis y tratamientos para el acné, entre otras causas. La disfunción de la glándula de Meibomio supone una menor llegada de lípidos a la película lagrimal, lo que produce una desestabilidad de la capa lipídica, y como consecuencia una mayor evaporación de la lágrima [34].

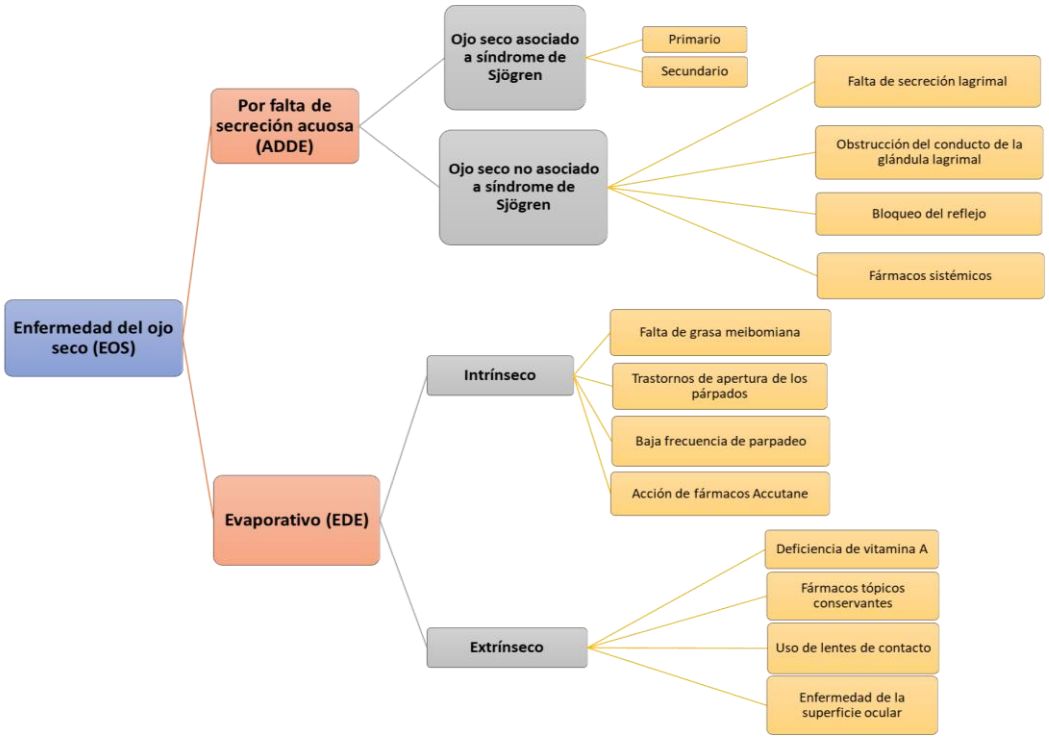

Figura 4: Clasificación y principales causas de la enfermedad del ojo seco. Imagen adaptada de TFOS DEWS II.

Cabe destacar que es común la presencia de la **enfermedad híbrida del ojo seco**, que comparte características de ambos tipos: deficiencia acuosa y ojo seco evaporativo. Además, los mecanismos fisiopatológicos se solapan, de forma que ambos tipos acaban empezando el mismo círculo vicioso. Actualmente, la clasificación mantiene los dos tipos de ojo seco mencionados anteriormente, sin embargo, para la elección del tratamiento no atiende a estos tipos, sino a criterios fisiopatológicos, considerando fundamentales los signos y los síntomas presentados (Figura 5) [36].

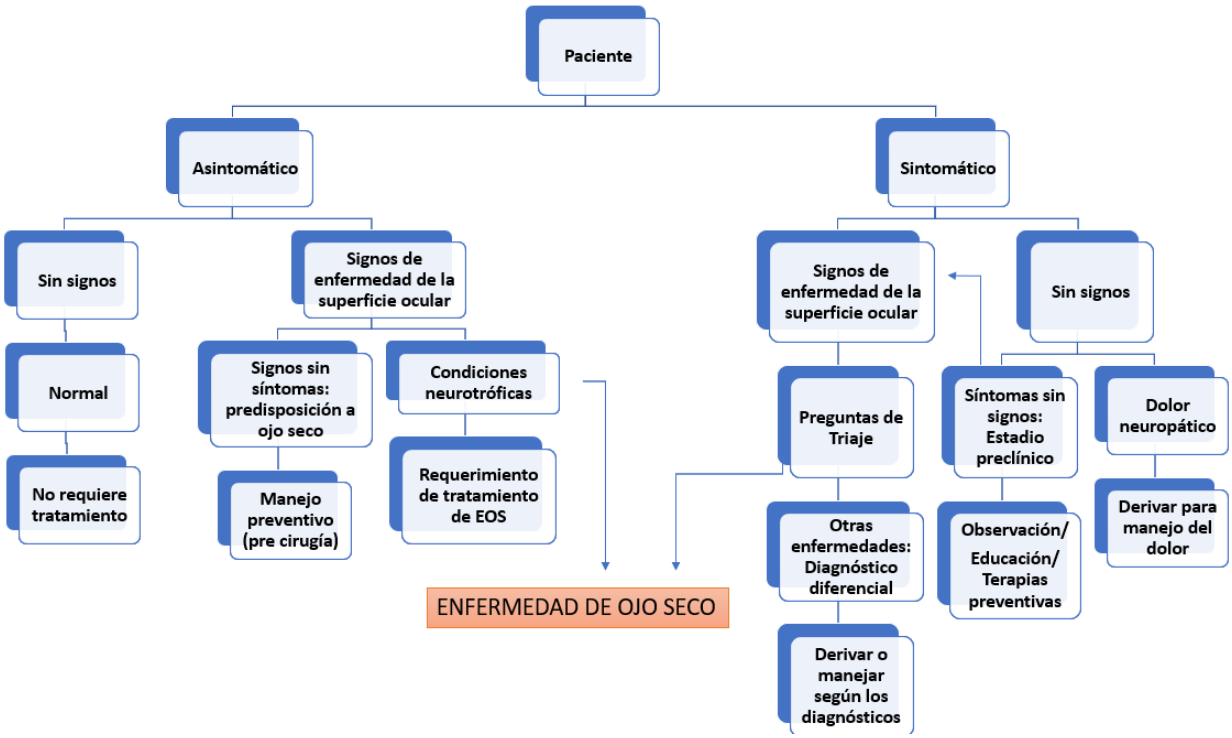

Figura 5: Clasificación y evaluación clínica del EOS según el informe DEWS de 2017 [34].

Entre los factores del entorno que afectan al desarrollo de ojo seco, podemos encontrar los de ambiente externo (relacionado con el exterior), y los de ambiente interno (relacionado con el paciente):

- **<u>Ambiente interno</u>**

  -Baja frecuencia de parpadeo

  -VTU (Terminales de video)

  -Microscopía

  -Párpados muy abiertos posición de mirada fija

  -Envejecimiento

-Baja reserva de andrógenos

-Medicamentos sistémicos: Antihistamínicos, bloqueantes beta, antiespasmódicos, diuréticos y algunos medicamentos psicotrópicos.

- **<u>Ambiente externo</u>**

  -Baja humedad relativa

  -Alta velocidad del viento

  -Entorno laboral

Respecto al mecanismo fisiopatológico de la EOS, las alteraciones que se producen en la superficie ocular se van a mantener por retroalimentación, en un círculo vicioso que implica la hiperosmolaridad, la inflamación y la inestabilidad de la película lagrimal (Figura 6).

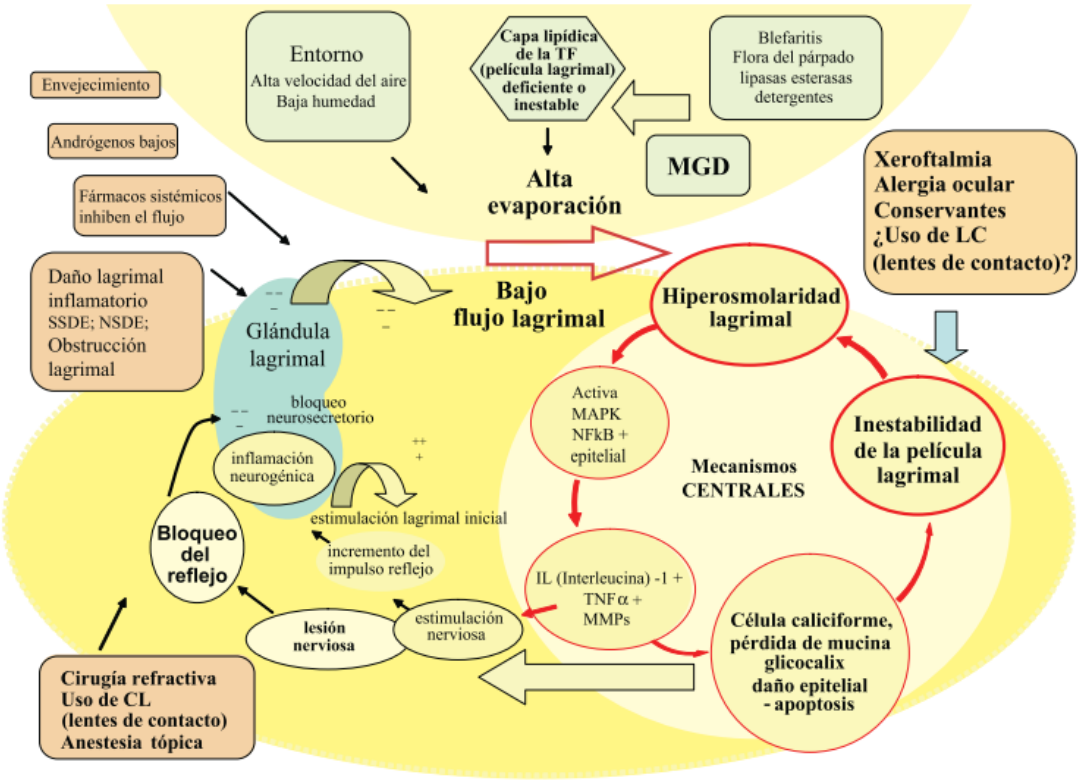

Figura 6: Mecanismos fisiopatológicos para el desarrollo de ojo seco. Imagen recuperada de "Definición y clasificación de la enfermedad del ojo seco. THE OCULAR SURFACE. 2007: 5(2)" [37].

Centrándonos en el mecanismo, cuando se produce una alta evaporación o una baja producción de la lágrima, se producirá un ambiente hiperosmolar, pasando de valores

menores de 308 mOsm/L aproximadamente en pacientes sin EOS a una osmolaridad de aproximadamente 316 mOsm/L en pacientes con EOS de moderada/grave. Este ambiente hiperosmolar va a activar la cascada inflamatoria de la vía de las MAP cinasas (MAPK) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NfκB). La activación de estas vías va a producir un aumento de interleucinas proinflamatorias, especialmente metaloproteinasa de la matriz extracelular (MMPs), Interleucina - 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF-α). Las MMP son enzimas proteolíticas implicadas en la cicatrización y en la inflamación. Estas enzimas producirán una ruptura de la barrera epitelial al romper las uniones epiteliales intercelulares. Dentro de esta familia, la MMP-9 es la que parece tener mayor importancia en el desarrollo de EOS, apareciendo aumentada en pacientes con esta enfermedad, y correlacionándose con la gravedad de la misma. La IL-1 y el TNF-α van a aumentar la inflamación al reclutar células inmunitarias activadas en la superficie ocular. Además, ambas también van a actuar aumentando la producción de MMPs [38].

Todo ello va a tener dos consecuencias. En primer lugar, a pesar del aumento de la producción de lágrima que se dará inicialmente, la inflamación de la glándula lagrimal acabará por disminuir su producción. Por otro lado, las MMPs, la IL-1 y el TNF-α van a producir daño en las células calciformes, conllevando una pérdida de mucina, así como apoptosis y perdida de células epiteliales por otros mecanismos. Como consecuencia, se va a producir una desestabilización de la película lagrimal causada por la disminución de la secreción de elementos importantes como los lípidos y mucinas, lo que va a aumentar todavía más la evaporación de la lágrima, volviendo a empezar el ciclo. El conjunto de hiperosmolaridad, inflamación, disminución de la lubricación en la superficie ocular y factores neurosensoriales va a producir dolor. Además, al producirse una disrupción en la integridad de la película lagrimal y un daño en la superficie ocular, también puede verse alterada la visión [38].

4.2 Tratamiento de la enfermedad del ojo seco

El objetivo del tratamiento del ojo seco es disminuir la sequedad ocular y aliviar los síntomas y molestias, para así mejorar la calidad de vida del paciente y prevenir el daño ocular. Para ello, se pretende recuperar el equilibrio homeostático de la superficie ocular y la película lagrimal, frenando el círculo vicioso. Dentro de las diferentes modalidades de tratamiento del ojo seco, las más frecuentes son las de

alivio de síntomas o paliativos, como por ejemplo las lágrimas artificiales sustitutorias.

Además de las medidas higiénicas, la mejora de la dieta y los sustitutos de la lágrima se puede recurrir a otros tratamientos como los fármacos secretagogos, el tratamiento antiinflamatorio y el tratamiento quirúrgico, reservándose este último para los casos más graves de ojo seco [39].

Otro de los tratamientos propuestos para la enfermedad del ojo seco consiste en **corregir anomalías en los párpados**. El foco en este caso se centra en pacientes con disfunción en las glándulas de Meibomio, con el objetivo de mejorar su funcionamiento. Ejemplos de estos tratamientos son la correcta higiene de los párpados con el fin de desobstruir los orificios glandulares y permitir la salida de los componentes lipídicos, que se puede realizar con toallitas o bastones de algodón. También se pueden realizar masajes palpebrales para aumentar la producción lagrimal, tratamientos de luz pulsada o aplicar compresas calientes sobre el ojo cerrado. Como ejemplo encontramos el LipiFlow®, un sistema capaz de calentar ambos párpados que ha mostrado eficacia para mejorar la función de la glándula de Meibomio y reducir los síntomas de ojo seco [40]. Las alternativas quirúrgicas como la tarsorrafia, dedicada a reducir la apertura del párpado, se reservan para los casos de mayor gravedad.

4.2.1 Medidas higiénicas y ambientales y mejora de la dieta

Las **medidas higiénicas** pueden suponer ventajas en el desarrollo de síntomas en pacientes con ojo seco. Entre las medidas higiénicas recomendadas se encuentra el lavado de los párpados, evitar pasar tiempo prolongado utilizando el ordenador, evitar el exceso de luz solar etc. [41].

Para el manejo de la enfermedad del ojo seco, la **dieta** tiene un papel importante. Dentro de las mejoras en la dieta podemos encontrar:

-**Mantenimiento de una adecuada hidratación**.

-**Suplementos de ácidos grasos esenciales**: Los ácidos grasos esenciales omega 3 y omega 6 tienen importantes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes en el organismo. Por ejemplo, el omega-3 es capaz de inhibir citocinas proinflamatorias y la proliferación de linfocitos T, además de aumentar el contenido intercelular de lípidos. Varios estudios han mostrado la posible ventaja del suplemento oral con estos

dos ácidos grasos esenciales para mejorar la función de la glándula de Meibomio y el curso del ojo seco, aunque todavía son necesarios más datos [42,43].

-**Lactoferrina**: La lactoferrina es una glicoproteína importante para la función lagrimal. Varios estudios llevados a cabo en animales y humanos han mostrado una mejora en la función de las glándulas lagrimales tras el suplemento oral con esta proteína [39].

4.2.2 Sustitutos de la lágrima

La terapia de sustitución de la lágrima es una terapia paliativa, no actuando sobre el mecanismo fisiopatológico de la EOS. Sin embargo, su uso está ampliamente extendido, siendo un gran pilar en el tratamiento del ojo seco. Su función es suplementar la película lagrimal, aumentando la lubricación y disminuyendo los síntomas.

- **Lágrimas artificiales**: Las lágrimas artificiales son el tratamiento de primera línea para el ojo seco, su uso está muy extendido y se trata de productos comercializados sin receta. Actualmente hay lágrimas artificiales comercializadas de diferentes marcas que contienen activos capaces de suplementar la película lagrimal. Estas sustancias pueden actuar suplementando la capa acuosa, las mucinas o la capa lipídica y generalmente son de base acuosa. Son capaces de humectar y lubricar la superficie ocular, permitiendo la reducción de los síntomas de ojo seco, y facilitando el deslizamiento de los párpados, mejorando también la visión.

  Las **propiedades fisicoquímicas** de las lágrimas artificiales deben encontrarse dentro de unos rangos específicos para poder simular las características de la lágrima natural, además, deben ser bien toleradas y estériles.

  - **pH**: Las lágrimas artificiales deben tener un pH neutro, comprendido en el rango de 6,5-7,5 para no distorsionar el pH de la lagrima natural. De lo contrario, se podrían producir molestias y daño en la superficie ocular. Para mantener valores adecuados de pH las lágrimas artificiales pueden contener tampones, como el tampón citrato, fosfato o boratos. Se debe tener especial precaución con los tampones a base de fosfatos, ya que su uso prolongado puede producir calcificaciones corneales [41]. Los

tampones a base de boratos también son utilizados con este fin, mostrando además propiedades antimicrobianas [44].

- **Osmolaridad**: La osmolaridad de las lágrimas artificiales tiene una especial importancia en el tratamiento de ojo seco debido a la importancia de la hiperosmolaridad en el mecanismo fisiopatológico de esta enfermedad. La osmolaridad de la lágrima natural normal se encuentra rondando los 300 mOsm/L [9]. Sin embargo, debido a la hiperosmolaridad asociada al ojo seco, se han desarrollado numerosas lagrimas artificiales ligeramente hipotónicas con el objetivo de compensar esta hiperosmolaridad [45,46]. A pesar de ello, no se recomienda administrar lágrimas artificiales con osmolaridades menores de 150 mOsm/L, ya que podrían dañar la superficie ocular.

- **Tensión superficial**: La tensión superficial de la película lagrimal permite la adecuada extensibilidad de la lágrima. Los valores fisiológicos de tensión superficial de la lágrima natural se sitúan en 40-46 mN/m, permitiendo una adecuada estabilidad y extensibilidad [47]. Estos valores de tensión superficial se mantienen gracias a las mucinas, las proteínas y los lípidos de la película lagrimal [48]. Las lágrimas artificiales deben mantener una tensión superficial similar a la de la lágrima natural, lo que se consigue con el uso de surfactantes. Entre los surfactantes utilizados destaca el uso de fosfolípidos

- **Viscosidad**: Muchas lágrimas artificiales utilizan agentes viscosizantes. El uso de agentes que aumentan la viscosidad resulta favorable en el tratamiento del ojo seco debido a su capacidad para engrosar la película lagrimal, protegiendo frente a la desecación y aumentando el tiempo de retención de la formulación en la superficie ocular. Además, el aumento de la viscosidad mejora la densidad de células calciformes, mantiene el grosor corneal y disminuye las molestias causadas por la EOS. Si la viscosidad es demasiado elevada se pueden producir efectos adversos como la visión borrosa, por lo que se recomienda que estos preparados no superen los 12 mPa·s y que se utilicen durante la noche [41]. Entre los

agentes viscosizantes más empleados para la preparación de lágrimas artificiales se encuentran los derivados de la celulosa, los polímeros derivados de polisacáridos y otros tipos como la goma guar y el alcohol polivinílico (APV). Dentro de los derivados de celulosa destaca el uso de la carboximetilcelulosa (CMC), que es capaz de unirse a las células epiteliales de la córnea favoreciendo su curación, la hidroxipropilcelulosa (HPC), presente también en el inserto comercial LACRISERT® [49], que mostró una disminución de los síntomas de ojo seco y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), la cual ha demostrado tener un efecto positivo en el mantenimiento de la densidad corneal [50]. Dentro de los derivados de polisacáridos el más utilizado es el ácido hialurónico (AH), un polímero aniónico biodegradable y biocompatible presente en la matriz extracelular de tejidos animales. El AH puede contener diferentes pesos moleculares y ha mostrado beneficios en la disminución de los síntomas de EOS y un aumento en la estabilidad de la película lagrimal [51].

Las lágrimas artificiales pueden contener numerosas sustancias capaces de suplementar algún componente de la película lagrimal o proporcionar un valor añadido, como pueden ser osmoprotectores, antioxidantes y lípidos.

- **Osmoprotectores**: Los agentes osmoprotectores son sustancias capaces de proteger a las células del estrés osmótico. Estas sustancias van a tener una especial importancia debido a la necesidad de proteger a las células de la superficie ocular del daño hiperosmolar característico de la EOS. Se han estudiado numerosos agentes osmoprotectores, entre los que destaca la trehalosa. La trehalosa es un disacárido capaz de retener grandes cantidades de agua y proporcionar un efecto osmoprotector. Se han realizado numerosos estudios con la trehalosa, mostrando capacidad de protección frente a la desecación, el estrés oxidativo y la apoptosis en células corneales [41]. Actualmente se encuentra comercializada la formulación Thealoz® Duo, compuesta por AH y trehalosa, que ha mostrado efectividad en la EOS frenando el círculo vicioso inflamatorio característico y restaurando la homeostasis de la película lagrimal [52]. Además, otros osmoprotectores como la betaína, la L-carnitina y la

taurina, así como los polímeros HA y HPMC han mostrado tener un efecto osmoprotector en células corneales *in vitro* [53].

- **Antioxidantes**: El uso de antioxidantes ha cobrado importancia en el manejo de la EOS debido a la presencia de radicales libres de oxígeno en esta patología [54]. Se han empleado variedad de antioxidantes para el tratamiento de ojo seco, como la Vitamina A, que ha mostrado ser efectiva en la reducción de síntomas de la EOS [55]. Otro antioxidante utilizado en el tratamiento de la EOS es la acetilcisteína, la cual ha logrado mejoras en la inflamación de la superficie ocular en un modelo de ojo seco en ratón [56].

- **Lípidos**: Las lágrimas artificiales suplementadas con lípidos permiten mimetizar la película lagrimal de forma más completa, ya que presentan tanto el contenido acuoso como el lipídico. Estas formulaciones son capaces de aumentar la estabilidad de capa lipídica de la película lagrimal, disminuyendo la evaporación de la lágrima. Entre las formulaciones con componentes lipídicos se encuentran gran número de emulsiones y liposomas [57]. Actualmente se encuentran comercializadas numerosas lágrimas artificiales con fosfolípidos dentro de su composición, como el Neovis®, el Systane® Balance y el Systane® Complete que han demostrado reducir los síntomas de ojo seco y aumentar de la estabilidad de la película lagrimal [2].

Además de estos componentes, las lágrimas artificiales han contenido tradicionalmente conservantes. Los conservantes se utilizan en los preparados multidosis para prevenir la contaminación bacteriana. Sin embargo, actualmente se ha demostrado una relación entre el uso prologado de conservantes y el daño en la superficie ocular [58]. Este daño en la superficie ocular es especialmente importante si hablamos de pacientes con EOS, ya que la superficie ocular se encontrará más expuesta y sensible al daño. Dentro de los conservantes usados en los preparados tópicos oculares se encuentra el cloruro de benzalconio (BAK), agente capaz de emulsionar los lípidos de las paredes bacterianas. Este daño en las paredes de las células bacterianas se puede traducir también en un daño en las

células de la superficie ocular. El BAK es capaz de producir inflamación en células de córnea y conjuntiva, así como favorecer el desarrollo de síntomas de ojo seco, como ha sido observado en diversos estudios [59–61].

Actualmente se encuentran en el mercado dispositivos multidosis para la aplicación de lágrimas artificiales como ABAK® o COMOD®, que incluyen filtros de nylon con un tamaño de poro de 0,22 µm, evitando la contaminación de los preparados sin la necesidad de usar conservantes en las formulaciones [58].

- **Sueros biológicos**
  - **Suero autólogo**: El suelo autólogo ha sido utilizado desde hace años para el tratamiento de la EOS grave. Una de sus ventajas es que sus características fisicoquímicas y biológicas son parecidas a las de la lágrima, siendo muy favorable su administración. Entre sus componentes destaca la presencia de factores epiteliotróficos y proteínas como fibronectina y albúmina. Es capaz de aumentar la proliferación y migración de las células epiteliales, además de neutralizar citoquinas proinflamatorias, disminuyendo la inflamación. Un inconveniente que presenta este tipo de suero es su contraindicación en pacientes con inflamación sistémica o ciertas enfermedades crónicas. A lo largo del tiempo se han realizado numerosos ensayos clínicos que demuestran su efectividad en la reducción de síntomas y mejora del ojo seco [39].

  - **Suero alogénico**: Su producción es más rápida que la de suero autólogo, aunque presenta más riesgo de reacción ante agentes extraños.

  - **Suero proveniente de cordón umbilical**: Permite preparar cantidad para el tratamiento de varios pacientes, y presenta ventajas para la utilización en pacientes donde el suero autólogo está contraindicado, como pacientes con enfermedades crónicas e inflamación. Además, el suero proveniente del cordón umbilical presenta la ventaja de contener mayor cantidad de ciertos componentes lagrimales, como el factor de crecimiento transformante (TFG-β).

Además de los sueros, cabe destacar el uso de **preparados plaquetarios**, usados debido a su alto contenido en factores de crecimiento que aumentan la proliferación celular. Pueden usarse lisiados plaquetarios y plasma rico en plaquetas, A pesar de ello, ha mostrado tener un menor efecto que los mismos en la diferenciación y migración celular [39,62].

4.2.3 Tratamiento con secretagogos

El objetivo del tratamiento con secretagogos es aumentar la producción de componentes de la película lagrimal. Se puede aumentar la producción de componentes acuosos, mucosos y lipídicos de forma endógena.

- **Secretagogos orales**: Ciertos secretagogos orales pueden ser utilizados cuando el ojo seco se debe al síndrome de Sjögren. Los pacientes que presentan este síndrome tienen anticuerpos que atacan los receptores muscarínicos de acetilcolina. Por este motivo el uso de agonistas colinérgicos como la pilocarpina y la cevimelina son de gran utilidad para contrarrestar este efecto y aumentar la producción salival y lagrimal [63].

- **Secretagogos tópicos**:

  - Secretagogos acuosos:

  Los secretagogos acuosos tienen como objetivo aumentar la producción del componente acuoso de la película lagrimal. Actualmente destaca el Diquas®, una solución a base de diquafosol tetrasodio que a pesar de no estar aprobada por la FDA si está aprobada en otros países como Japón [64]. Su mecanismo de acción consiste en activar el receptor purinérgico P2Y2 aumentando así la secreción de agua y mucina. Además, estudios con este principio activo han mostrado una reducción de la inflamación y la apoptosis en el epitelio corneal [65]. También se emplea de forma tópica la lacritina, que como se ha mencionado anteriormente, aumenta la secreción de la glándula lagrimal, siendo especialmente beneficiosa en pacientes con ojo seco producido por deficiencia acuosa.

- Secretagogos de mucina:

Como se ha comentado anteriormente, las mucinas juegan un papel importante en la estabilidad de la película lagrimal. Además, numerosas mucinas sirven como marcadores biológicos para la EOS. Es por ello que los tratamientos encaminados a aumentar la producción de estas mucinas son de gran utilidad en el manejo del ojo seco. Dentro de los secretagogos de mucina destaca la rebamipida, que actúa sobre el receptor de factor de crecimiento epidérmico aumentando de esta manera los niveles de las mucinas MUC1 MUC4 y MUC16. Actualmente, está aprobado el Mucosta® (Otsuka Pharmaceutical) en Japón, una suspensión al 2% de rebamipida [64]. Además, este principio activo ha mostrado una mejora en la película lagrimal y en la queratitis corneal en pacientes con EOS asociada a la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) [66]. Otros secretagogos de mucina han mostrado buenos resultados en estudios, como es el caso del dipéptido JBP485, que parece aumentar la producción de las mucinas MUC5AC, MUC1, MUC4 y MUC16 en el epitelio conjuntival y corneal, así como la producción lagrimal en modelos animales [67]. Otro secretagogo que parece aumentar las células calciformes y estimular la producción de MUC5AC es el inhibidor de linfocitos micofenolato de mofetilo [68].

- Estimulación lipídica:

La capa lipídica de la película lagrimal tiene un papel importante en la disminución de la evaporación de la lágrima. Un importante marcador de EOS es la disminución del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), de forma que la disminución de este factor relacionada con la edad correlaciona con la presencia de síntomas de ojo seco y con la disminución de la producción lagrimal [69]. Estudios con este factor han mostrado que actúa sobre la glándula de Meibomio aumentando la acumulación de lípidos [70]. Por otro lado, la administración tópica de andrógenos como la testosterona parecen aumentar la secreción lipídica de las glándulas de Meibomio y reducir los síntomas en pacientes con ojo seco, como se ha visto en ensayos clínicos en fase II [71].

Además del empleo de secretagogos, existen otras técnicas que tienen como objetivo aumentar la producción de lágrima. Este es el caso, por ejemplo, de la **neuroestimulación nasal**. El objetivo de esta terapia es actuar sobre el reflejo nasolagrimal mediante pequeñas corrientes eléctricas, lo que aumenta la producción lagrimal de forma rápida. Entre los neuroestimuladores, el TrueTear (Allergan) está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration). Este neuroestimulador nasolagrimal ha mostrado mejorar la sequedad ocular y el discomfort [72].

4.2.4 Tratamientos de conservación de la lágrima

Al contrario que los sustitutos de la lágrima o los estimuladores de su producción, los tratamientos de conservación tienen como objetivo mantener una adecuada cantidad de lágrima recurriendo a técnicas que evitan su pérdida [39].

-**Oclusión del conducto lagrimal**: Bloquea el drenaje de la lágrima, lo que permite que sea retenida en la superficie ocular, aumentando la lubricación. La oclusión puede ser unilateral o bilateral, y su uso es controvertido en el caso de presentar inflamación de la superficie ocular, ya que no está claro si podría evitar la eliminación de elementos proinflamatorios. Una de las formas de llevar a cabo esta oclusión es con el uso de tapones lagrimales. Los tapones lagrimales pueden colocarse en la salida del conducto o en el canalículo, siendo todavía controvertido su uso. En casos más graves, se puede recurrir también a la oclusión permanente del conducto lagrimal mediante procedimiento quirúrgico [73].

-**Humidificadores y gafas con cámara de humedad**: Dispositivos que aumentan la humedad del ambiente, evitando la evaporación de la lágrima y el paso del flujo de aire por la superficie ocular.

4.2.5 Antiinflamatorios

Debido a la fisiopatología del ojo seco, en la que la hiperosmolaridad puede desencadenar cascadas inflamatorias, aumentando el daño en la superficie ocular y actuando de círculo vicioso, los antiinflamatorios son de particular utilidad.

-**Glucocorticoides tópicos**: Tienen actividad antiinflamatoria, lo que permite romper el círculo vicioso de la EOS. Existen numerosos glucocorticoides que pueden administrarse para el tratamiento de ojo seco, como por ejemplo la metilprednisolona, capaz de inhibir las citoquinas proinflamatorias y la MMP-9. Otros ejemplos son la dexametasona y prednisolona. El inconveniente de los glucocorticoides es que su uso está contraindicado a largo plazo, debido a sus efectos adversos como el aumento de la IOP o aparición de cataratas. También pueden tener efectos sobre el sistema inmune, aumentando la incidencia de infecciones oportunistas [74].

-**Hormonas sexuales**: Las glándulas de Meibomio contienen receptores tanto de andrógenos como de estrógenos. Por otro lado, la glándula lagrimal posee receptores para andrógenos, por lo que ambas hormonas influyen a nivel ocular. Si nos centramos en los estrógenos, van a tener actividad sobre las glándulas de Meibomio, además, la incidencia de ojo seco está aumentada en mujeres de avanzada edad, coincidiendo con la menopausia [75]. Sin embargo, el tratamiento con estrógenos tiene más efectos adversos que los andrógenos. Por otro lado, los andrógenos tienen gran influencia sobre las glándulas lagrimales, teniendo efecto antiinflamatorio, antiapoptótico y trófico. Los niveles bajos de esta hormona se han relacionado con sequedad ocular. Además, los andrógenos también tienen capacidad para aumentar la producción de lípidos en las glándulas de Meibomio. Por lo tanto, la terapia con andrógenos va a permitir mejorar los síntomas de ojo seco, siendo recomendable administrarlos por vía tópica para evitar efectos adversos [76,77].

-**Ciclosporina A**: La Ciclosporina A es un principio activo inmunomodulador que tiene propiedades antiinflamatorias. Se ha utilizado ampliamente en el trasplante de órganos para evitar el rechazo y también de forma tópica en alergias. Su mecanismo pasa por la inhibición de la activación de los linfocitos. Actualmente, la ciclosporina A está aprobada por la FDA y la EMA para su uso de forma tópica en el tratamiento de la EOS. Se ha comprobado que el uso de ciclosporina actúa disminuyendo la inflamación, reduciendo la osmolaridad y reduciendo la apoptosis. Estudios con ciclosporina A han mostrado un aumento de células caliciformes de la conjuntiva, así como la reducción de los síntomas de la EOS grave [78]. Cabe destacar que actualmente se encuentra comercializada Ikervis®,

una emulsión catiónica cargada con 0,1% ciclosporina A que ha mostrado ser altamente efectiva en patologías que cursan con inflamación de la superficie ocular [79].

-**Tacrolimus**: Es un fármaco utilizado también para el tratamiento del cáncer, que tiene la capacidad de bloquear a los linfocitos T con mayor actividad que la Ciclosporina A. Este principio activo se ha utilizado en varios estudios en pacientes a una concentración de 0,03% mostrando una mejora en la estabilidad lagrimal y en el estado de la superficie ocular [80,81].

-**Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)**: Los AINES han demostrado disminuir las molestias producidas por la EOS. Dentro de los AINES destaca el diclofenaco, que parece tener efecto osmoprotector y ser capaz de disminuir la sensibilidad corneal. La capacidad osmoprotectora del diclofenaco podría ser debida a la regulación del factor nuclear 5 de células T, que participa en la osmoprotección celular, protegiendo contra el daño hiperosmolar [82].

-**Productos biológicos**: A pesar de que son necesarias muchas investigaciones, varios productos biológicos se han estudiado para el tratamiento del ojo seco. Uno de estos compuestos es la lubricina, una glicoproteina con capacidad lubricante y antiinflamatoria presente en la superficie ocular. También nos encontramos el Factor de crecimiento nervioso humano recombinante (RH-NGF) con capacidad trófica sobre la superficie ocular, la proteína del gen 6 estimulada por el factor de necrosis tumoral (TSG-6) capaz de disminuir la producción de interleucinas y otros tratamientos capaces de disminuir la producción de citoquinas, como el antagonista del receptor de IL-1, el antagonista del TNF-α o el tratamiento contra la IL-17.

- **Antagonista del antígeno-1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1)**: Las integrinas son receptores presentes en la superficie ocular implicados en la supervivencia de los linfocitos T, entre las que se encuentra el LFA-1. El LFA-I se une principalmente a la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) de las células endoteliales y epiteliales y de las células presentadoras de antígenos, teniendo una función importante en la activación de linfocitos T. El bloqueo de la interacción de los linfocitos T con otros elementos es capaz de reducir la

inflamación, por lo que el uso de antagonistas del LFA-1 puede tener gran utilidad. El Lifitegrast es un antagonista que actúa sobre la unión entre el LFA-1 y la ICAM-1, inhibiendo la migración de linfocitos T y las citoquinas proinflamatorias. Actualmente hay una formulación comercializada de lifitegrast al 5% aprobada por la EMA y por la FDA (Xiidra™) para el tratamiento de la EOS [83,84].

-**Antibióticos**: La tetraciclina es un antibiótico de amplio espectro, y actúa inhibiendo la síntesis proteica. Debido al efecto sobre las enzimas lipolíticas y la inhibición de la lipasa su uso se ha contemplado para disminuir la descomposición de lípidos en las glándulas de Meibomio. Además, las tetraciclinas también poseen efecto antiinflamatorio, al inhibir algunas MMPs, el TNF-α y la IL-1 en el epitelio corneal. También se han utilizado macrólidos, como la azitromicina, que es capaz de aumentar la acumulación de colesterol y fosfolípidos en las células [39]. Los antibióticos podrían actuar regulando la flora de los párpados, sin embargo, su uso es controvertido en estos casos debido a las resistencias bacterianas.

4.2.6 Procedimientos quirúrgicos

Los procedimientos quirúrgicos se contemplan para los cuadros más graves [39]. Dentro del tratamiento quirúrgico podemos centrarnos en varios tipos:

-**Tarsorrafia**: La disminución de la apertura del párpado reduce la evaporación de la lágrima y la exposición de la superficie ocular.

-**Tratamiento quirúrgico de anomalías del párpado relacionadas con EOS**: Destacando el tratamiento del blefarospasmo con toxina botulínica, corrección de la dermatoclasia, la blefaroptosis y la blefaroplastia del párpado inferior.

-**Trasplante de glándulas salivares**: Va a proporcionarle al ojo un tejido exocrino capaz de lubricar y secretar factores de crecimiento del epitelio.

-**Trasplante de mucosa oral o nasal**: Permite reconstruir y aportar mucina a la superficie ocular. El uso de trasplante de mucosa y trasplante de glándula salival menor ha mostrado mejorar los síntomas de ojo seco, la producción lagrimal y el estado de la córnea en pacientes con Síndrome de Stevense-Johnson [85].

-**Trasplante de membrana amniótica**: En casos en los que la gravedad del EOS sea elevada, y haya causado como daños graves en el epitelio corneal se puede recurrir al trasplante de membrana amniótica para mejorar los síntomas. Actualmente se encuentra comercializado el dispositivo de membrana amniótica PROKERA®, el cual ha mostrado una aceleración de la cicatrización de la córnea [86,87].

-**Reservorios mecánicos**: Cuando el paciente presenta ojo seco muy grave, se puede recurrir al implante de dispositivos que administran lágrimas artificiales gracias a un catéter, evitando así la necesidad de administrar lágrimas artificiales de forma constante.

4.3 Nuevos sistemas para el tratamiento tópico de la enfermedad del ojo seco

Los últimos años han sido caracterizados por un auge en el desarrollo de nuevos sistemas de administración para el tratamiento tópico de la EOS y otras enfermedades de la superficie ocular, fundamentada en las dificultades de la vía tópica ocular. Estas dificultades se deben, en primer lugar, a la baja capacidad de la lágrima que solo permite retener pequeños volúmenes sobre la superficie ocular. Teniendo en cuenta que solo unos 30 µL son capaces de retenerse correctamente tras la aplicación tópica y que el tiempo de renovación de la lágrima es de tan solo 2 o 3 minutos, una gran parte del preparado administrado se perderá, y se estima que solo el 5% de la dosis de principio activo alcanzará los tejidos oculares. Además, la absorción de fármacos a través de la córnea y la conjuntiva se ve dificultada debido a las barreras biológicas, y dependerá de los coeficientes de reparto y el tamaño molecular de los principios activos [2].

Dentro de los nuevos sistemas de administración destacan los insertos, hidrogeles, lentes de contacto y los micro y nanosistemas, dentro de los cuales se encuentran los de composición polimérica y los de composición lipídica. Estos últimos son capaces de suplementar la capa lipídica de la película lagrimal.

4.3.1 Insertos y lentes de contacto.

Los insertos y las lentes de contacto son sistemas capaces de quedar retenidos en la superficie ocular, evitando la rápida eliminación de las sustancias activas administradas. Estos sistemas permiten una rápida acción y un efecto mantenido durante un tiempo prolongado, reduciendo la necesidad de administraciones repetidas. Dependiendo del biomaterial empleado para su fabricación pueden tener un efecto beneficioso sobre la superficie. De hecho, se han realizado estudios mostrando el potencial de las lentes de contacto capaces de liberar ácido hialurónico, que consiguen una curación más rápida en la superficie ocular [88], además, también se ha estudiado la vehiculización de principios activos antinflamatorios como la ciclosporina A, el diclofenaco y la dexametasona en lentes de contacto, consiguiendo una liberación prolongada durante días [89]. Dentro de los insertos comercializados para el tratamiento de la EOS nos encontramos en inserto de HMPC comercializado con el nombre de LACRISERT®, que ha demostrado buenos resultados en la reducción de los síntomas [90]. El inconveniente de los insertos y las lentes de contacto es que pueden generar molestias y los pacientes presentan dificultad a la hora de colocarlos, por lo que su uso no es muy extendido. Por otro lado, el uso de lentes de contacto puede producir disconfort y un aumento en la aparición de infecciones cuando su uso es prolongado [89].

4.3.2 Nanopartículas.

Las nanopartículas son sistemas poliméricos con un tamaño comprendido de entre los 10 y 1.000 nm empleados para aumentar la penetración corneal de sustancias activas cuando se administran por vía tópica. Tienen un gran interés para la vehiculización de fármacos lipófilos, cuya administración por vía tópica en formulaciones convencionales se ve limitada. Este es el caso de la ciclosporina A, agente activo con eficacia probada para el tratamiento del ojo seco severo, que ha sido estudiada en nanopartículas de ácido poli(lactico-co-glycolico) (PLGA), un polímero biodegradable y biocompatible aprobado por la FDA, que se degrada en ácido láctico y ácido glicólico por hidrólisis. Los resultados mostraron una liberación sostenida del principio activo [91].

4.3.3 Microesferas

Las microesferas son sistemas matriciales poliméricos que permiten una liberación controlada de sus principios activos. Uno de los polímeros empleados para su fabricación es el PLGA, a pesar de que su uso es más popular a nivel intraocular. En modelos animales el uso de microesferas de rapamicina ha mostrado una disminución de la sequedad, un aumento la secreción lagrimal y una mejora en las lesiones endoteliales [92].

4.3.4 Hidrogeles

Los hidrogeles están formados por una estructura tridimensional en forma de redes poliméricas. Una de sus principales características es su capacidad de hincharse y retener agua en su estructura. Son biocompatibles y en general bien tolerados por el ojo. Una de las ventajas de la aplicación de hidrogeles en la superficie ocular es su capacidad de adhesión a la película lagrimal, consiguiendo de esta forma aumentar el tiempo de residencia de fármacos en la superficie ocular, disminuyendo así la necesidad de administraciones repetidas. Dentro de los hidrogeles podemos encontrar los sistemas de gelificación *in situ*, los cuales, aplicados en la superficie de forma líquida, van a transformarse en un gel viscoelástico al entrar en contacto con la superficie ocular. Este cambio de sol a gel puede estar mediado por los cambios de pH o temperatura [93]. Dentro de los geles de formación *in situ* destaca el uso de goma gellano, un polisacárido natural capaz de interactuar con diferentes cationes produciendo gelificación [94,95]. Las desventajas que presentan los hidrogeles consisten en molestias tras su aplicación como disconfort y visión borrosa cuando las concentraciones de polímeros son elevadas, así como su limitación en cuanto a su capacidad de incorporación de fármacos ya que deben ser hidrosolubles. Dentro de los hidrogeles utilizados para el tratamiento de ojo seco destacan aquellos constituido por ácido hialurónico, que han mostrado reducir los síntomas de la enfermedad de ojo seco [96,97].

4.3.5 Dendrímeros

Los dendrímeros son macromoléculas sintéticas tridimensionales bien definidas con gran potencial para la administración de fármacos debido a su capacidad para aumentar la permeabilidad a través de la córnea. Su arquitectura consta de ramificaciones dispuestas en capas a partir de una unidad central hidrofóbica con gran cantidad de grupos

terminales. Se ha estudiado su uso para vehiculización de fármacos por atrapamiento en la estructura o por conjugación en los grupos terminales. Uno de los tipos de dendrímeros más estudiados es el dendrímero de poliamidoamina (PAMAM), que se han utilizado para vehiculizar principios activos como la dexametasona [98]. Sin embargo, por el momento faltan estudios *in vivo*. Su aplicación para el tratamiento del ojo seco se ha estudiado especialmente en forma de inyección conjuntival [99].

4.3.6 Nanosistemas lipídicos

Los nanosistemas de composición lipídica presentan la ventaja de poder aumentar la estabilidad de la capa lipídica de la película lagrimal. Además, su composición lipídica permite la vehiculización de principios activos de carácter oleoso. Algunos de estos sistemas presentan un compartimento acuoso en su interior, permitiendo la encapsulación de principios activos tanto acuosos como oleosos.

- **Nanopartículas lipídicas sólidas (NSL)**: Las NLS son sistemas matriciales con un tamaño comprendido entre los 10 y 1.000 nm compuestos por un núcleo lipídico en estado sólido estabilizado por surfactantes. Se han encapsulado varios principios activos en NSL, entre los que destaca la ciclosporina A, que encapsulada en NLS catiónicas mostró una liberación controlada y prolongada en el humor acuoso [100]. Dentro de las NLS se encuentran los portadores lipídicos nanoestructurados (NLC), sistemas mixtos que incorporan lípidos sólidos y lípidos en estado líquido. Los NLCs se han estudiado como lágrimas artificiales mostrando interacción con la capa lipídica. En un modelo de ojo seco evaporativo en conejos a los que se administró NLCs formadas por cetil palmitato mostraron potencial para aumentar la estabilidad de la película lagrimal y disminuir el daño de las células epiteliales producido por la desecación [101]. También se han realizados estudios con NLCs mucoadhesivos cargados de dexametasona como potencial tratamiento para la EOS [102].

- **Exosomas**: Los exosomas son vesículas extracelulares de origen biológico liberadas por varios tipos de células que actúan como mediadores biológicos para la comunicación entre células. Su tamaño ronda los 30-

150 nm y contienen lípidos, proteínas y ARN y ADN. En los últimos años se han estudiado para el tratamiento de patologías inmunitarias y para el tratamiento de patologías oculares como el Síndrome de Sjögren y el rechazo tras el trasplante de córnea [103,104]. Además, recientemente se ha estudiado el uso de exosomas derivados de células madre adiposas en un modelo de ojo inducido por BAK en ratones, mostrando una disminución de citoquinas inflamatorias, y por tanto disminuyendo la inflamación producida [105].

- **Emulsiones**: Las emulsiones son sistemas formados por una fase acuosa, una fase oleosa, surfactantes y co-surfactantes. Las emulsiones empleadas para el tratamiento tópico suelen presentar la fase externa acuosa y la interna oleosa. Sus características incluyen una baja viscosidad y tensión superficial, proporcionando una adecuada extensibilidad en la película lagrimal. Debido a la presencia de fase acuosa y fase oleosa con capaces de vehiculizar principios activos de diferente naturaleza y favorecer la captación celular de moléculas lipofílicas [57]. Las emulsiones pueden ser aniónicas o catiónicas dependiendo de los componentes. En función de su tamaño y estabilidad termodinámica las emulsiones pueden dividirse en macroemulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones. Las **macroemulsiones** tienen un tamaño superior a 1 µm y son termodinámicamente inestables. Hay numerosas macroemulsiones utilizadas para administración tópica para el tratamiento del ojo seco, sin embargo, presentan más efectos adversos como molestias y visión borrosa debido a su mayor tamaño, así como un mayor aclaramiento en la superficie ocular. Las **nanoemulsiones** presentan un tamaño comprendido entre los 20 y los 500 nm, a pesar de ser más estables que las macroemulsiones, todavía son termodinámicamente inestables y requieren energía para su formación. Son sistemas muy estudiados para el tratamiento de la EOS y son capaces de suplementar la capa lipídica de la película lagrimal. Actualmente hay varias nanoemulsiones comercializadas para el tratamiento del ojo seco entre las que se encuentra Systane® COMPLETE o Cationorm®, una nanoemulsión catiónica capaz de interaccionar con la carga negativa de la superficie ocular, favoreciendo

su retención [2]. Otra nanoemulsión catiónica comercializada, en este caso encapsulando el principio activo ciclosporina es Ikervis® cuya composición se sustenta en Cationorm® [79]. Por otro lado, las **microemulsiones** presentan un tamaño comprendido entre 5 y 100 nm, y a diferencia de las dos anteriores son termodinámicamente estables, lo que significa que no requieren el empleo de energía para su fabricación, además de ser muy estables y permanecer con las características fisicoquímicas inalteradas durante largos periodos de tiempo. Actualmente las microemulsiones están siendo investigadas para el tratamiento de la EOS vehiculizando sustancias osmoprotectoras [106].

- **Liposomas**: Los liposomas son vesículas lipídicas esféricas dispersas en una fase de dispersión acuosa, formadas por un núcleo acuoso central rodeado por una bicapa lipídica. Gracias a su estructura van a ser capaces de encapsular sustancias oleosas en las bicapas lipídicas, y sustancias hidrófilas en el núcleo acuoso y en la fase de dispersión. Son biodegradables y biocompatibles, por lo que presentan buena tolerancia en la superficie ocular. Las bicapas lipídicas suelen estar formadas por fosfolípidos, que adoptarán una disposición característica, de forma que los extremos polares se encontrarán dirigidos al núcleo acuoso y a la fase de dispersión, y sus cadenas apolares en el centro de la bicapa. Dentro de los fosfolípidos empleados, el más común es la fosfatidilcolina, un fosfolípido presente de forma natural en la lágrima y en las membranas celulares, y rico en ácidos grasos. La bicapa lipídica también suele incorporar colesterol, capaz de estabilizar las fuerzas intermoleculares entre los fosfolípidos aumentando la estabilidad de los liposomas.

  Según el número de bicapas lipídicas los liposomas pueden clasificarse en vesículas multilamelares (MLV) compuestas por varias bicapas superpuestas y vesículas unilamelares (ULV), que según el tamaño de vesícula se dividirán en pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con tamaños de 20-100 nm, vesículas unilamelares grandes (LUV), con tamaños comprendidos entre 100 nm - 1 µm y vesículas unilamelares gigantes (GUV) con tamaños de 1-50 µm (Figura 7). Para el empleo de liposomas para la administración tópica ocular el tamaño deseado ronda

los 200 nm, ya que tamaños de vesículas inferiores a los 200 nm permiten la evasión de la fagocitosis [107]. Una de las ventajas de los liposomas en la encapsulación de fármacos es su capacidad para entrar en contacto con las células de la superficie ocular, favoreciendo su penetración. Los liposomas son capaces de interactuar con las células por varios mecanismos liberando el principio activo en su interior. Entre estos mecanismos se encuentra la endocitosis, la absorción en la superficie celular, la fusión de la bicapa lipídica con las membranas celulares y el intercambio de lípidos mediado por la proteína de transferencia [2].

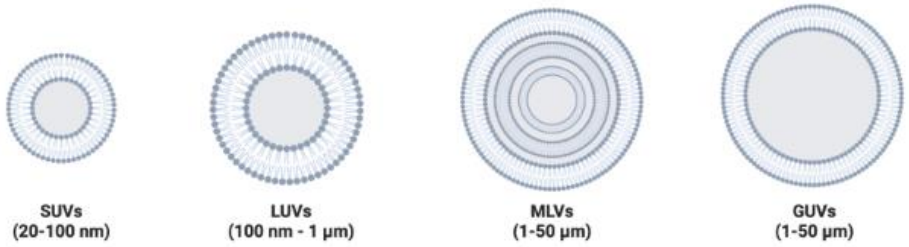

Figura 7. Estructura y clasificación en función del número de bicapas y el tamaño de los liposomas. Imagen adaptada de "López-cano JJ, González-cela-Casamayor MA, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT" et al. Liposomes as vehicles for topical ophthalmic drug delivery and ocular surface protection. Expert Opin Drug Deliv 2021; 18: 819–47. doi:10.1080/17425247.2021.1872542.".

Si nos centramos en los métodos de fabricación de los liposomas, podemos encontrar varias alternativas. El método de fabricación más empleado es el método de hidratación de la película lipídica o método de Bangham (Figura 8), un método sencillo en el que se disuelven los componentes oleosos en un disolvente orgánico para su posterior evaporación en un rotavapor, y finalmente se añade una dispersión acuosa para la formación de los liposomas [108]. Sin embargo, la elaboración de liposomas de acuerdo con este procedimiento requiere procesos de sonicación y extrusión para reducir el tamaño de las vesículas. Otra alternativa es el método de evaporación en fase reversa, un método similar que consiste en

la adición de un volumen pequeño de fase acuosa en una disolución orgánica de fosfolípidos para su posterior evaporación [109]. También se emplea el método por inyección de éter o etanol, que consiste en la disolución de lípidos en estos disolventes para su adicción a una fase acuosa y posterior eliminación por evaporación [110].

El empleo de microfluídica es otra alternativa que actualmente permite preparar una elevada cantidad de liposomas con un tamaño uniforme [111]. También se utilizan estrategias como la rehidratación-deshidratación, que gracias a una rehidratación controlada permite controlar los tamaños de vesícula o la congelación-descongelación para aumentar la encapsulación de principios activos hidrosolubles en el núcleo acuoso [2].

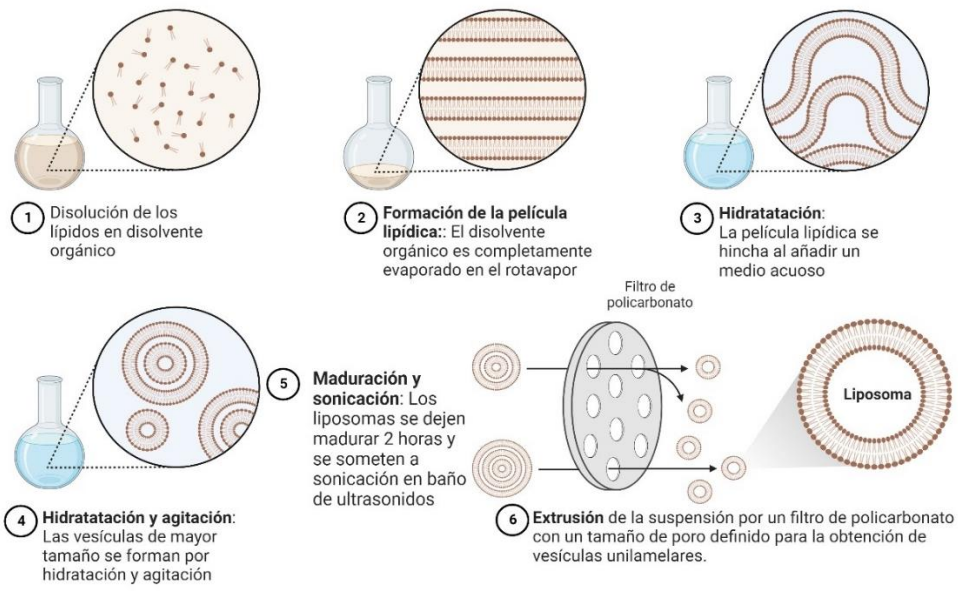

Figura 8: Método de hidratación de la película lipídica para la fabricación de liposomas. Imagen creada con Biorender (biorender.com).

Los liposomas van a ser capaces por tanto de suplementar la capa lipídica de la película lagrimal, gracias a su contenido en fosfolípidos con variedad de ácidos grasos, pudiendo incluir en su composición otras moléculas con este fin [57]. Además, serán sistemas adecuados para vehiculizar fármacos, pudiéndose acudir al empleo de estrategias adicionales para

aumentar su tiempo de residencia en la superficie ocular, como por ejemplo la utilización de fosfolípidos o polímeros catiónicos para aumentar el contacto con la superficie ocular cargada negativamente, o el empleo de polímeros mucoadhesivos como el AH o la HPMC [112].

Por todo ello, los liposomas han sido ampliamente estudiados para el tratamiento del ojo seco. Por ejemplo, con el objetivo de aumentar su biodisponibilidad se han utilizado liposomas para encapsular vitamina A, capaz de regular la diferenciación y proliferación de las células epiteliales de la córnea [2], además de para encapsular otros fármacos útiles para el tratamiento de la EOS como la ciclosporina A [113]. Además de utilizarse para la vehiculización de fármacos, las lágrimas artificiales liposomales también han obtenido gran interés para el tratamiento de la EOS, debido fundamentalmente al aporte de lípidos y agua en la misma formulación. Actualmente varias de ellas están comercializadas, como son Aquoral Lipo® de Esteve (Pisa, Italia) o Lacrisek® Ofta (Bioos Italia, Italia) que han mostrado superioridad en el tratamiento del ojo seco frente a las lágrimas artificiales convencionales [57,114].

Si nos enfocamos en los inconvenientes de los liposomas, nos encontramos factores como su escalabilidad a nivel industrial, que se dificulta ante la necesidad de fabricar grandes cantidades en poco tiempo. Ante este inconveniente han surgido alternativas como la fabricación de liposomas por microfluídica [115]. Otro de los aspectos críticos es su esterilización, que se complica por la susceptibilidad de los fosfolípidos a altas temperaturas, teniendo que recurrir a filtración esterilizante cuando los liposomas tienen tamaños menores de 200 nm [116].

Cabe destacar que en la actualidad también se está estudiando en empleo de liposomas formados por fosfolípidos sintéticos incluyendo sustancias osmoprotectoras para el tratamiento del ojo seco, mostrando buena tolerancia *in vitro* e *in vivo* y capacidad osmoprotectora en un modelo de osmoprotección en células epiteliales de córnea [46,53].

5 Patologías que afectan al nervio óptico y la retina.

El funcionamiento de las neuronas de la retina es uno de los factores condicionantes de una visión normal. De hecho, las enfermedades neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo tienen especial importancia debido a que todas ellas originan la pérdida de visión. Reciben el nombre de enfermedades neurodegenerativas debido a que todas ellas cursan con un daño en las células del sistema nervioso, en este caso, en la retina neural y el nervio óptico como prolongación del sistema nervioso central.

Dentro de las patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo destacan: La degeneración macular (DMAE), la retinopatía diabética (RD), la retinosis pigmentaria (RP) y el glaucoma. Todas ellas cursan con neurodegeneración en el segmento posterior, sin embargo, sus etiologías son diferentes. Por ejemplo, la DMAE está producida por un daño en el EPR mayormente relacionado con la disfunción mitocondrial asociada a la edad, lo que producirá daño en la mácula, la zona central de la retina, que ocasionará una pérdida de visión central que acabará en ceguera. Sin embargo en la RD las alteraciones en la retina son producidas por un aumento de glucosa debido a la enfermedad Diabetes Mellitus, provocando una complicación microvascular, y la RP se producirá debido a factores genéticos [117–121]. El glaucoma a su vez se considera como un grupo de enfermedades del nervio óptico y de la retina.

5.1 La enfermedad del Glaucoma

El glaucoma es la causa principal de ceguera irreversible en el mundo y está asociada a la pérdida de las células ganglionares de retina (CGR) [117]. Es un grupo de neuropatías de carácter heterogéneo, crónico y multifactorial que en 2020 afectaba a unos 79,6 millones de personas [122]. En el glaucoma se va a producir una disminución de las células ganglionares de retina (CGR), así como una degeneración y atrofia de los axones que forman el nervio óptico, interfiriendo en la visión. El daño producido en la enfermedad se caracteriza por avanzar de forma progresiva desde regiones periféricas hasta la zona central, produciendo ceguera en última instancia. Se trata de una patología multifactorial, y su etiología aún no se conoce del todo.

Actualmente, el único factor de riesgo modificable y el principal de la enfermedad del glaucoma es el aumento de la PIO. También hay otros factores de riesgo que están relacionados con el desarrollo del glaucoma como las alteraciones en el flujo sanguíneo ocular o una baja presión intracraneal.

El aumento de la PIO está producido por una acumulación de humor acuoso como resultado de un desequilibrio entre la producción de humor acuoso y su drenaje. Este aumento de presión va a extenderse hasta el segmento posterior del ojo y va a dañar el nervio óptico y las estructuras adyacentes, como la lámina cribosa. Además, la elevación de la PIO va a producir una disminución de flujo sanguíneo en la retina dañando las CGR y disminuyendo el transporte axoplásmico de factores neurotróficos, lo que inicia la apoptosis de las CGR debido a la falta de señales neurotróficas.

En la mayoría de tipos de glaucoma el aumento de la presión intraocular (PIO) va a actuar como factor de riesgo dañando las neuronas de forma irreversible y atrofiando el nervio óptico [118,123]. Esto hace que la terapia enfocada a la reducción de la PIO sea la primera línea en el tratamiento del glaucoma que cursa con una elevación de esta. Además del daño axonal y la muerte de neuronas dañadas, se va a producir un fenómeno de degeneración secundaria, por el cual las neuronas que no han sido dañadas van a estar expuestas a agentes citotóxicos producidos por las neuronas con daño primario, muriendo también [124].

Sin embargo, el hecho de que haya pacientes con la PIO controlada que sigan sufriendo de pérdida de visión, así como otros con valores normales de la PIO que padecen glaucoma en lo que se conoce como glaucoma normotensivo pone en evidencia la existencia de otros mecanismos asociados a la neurodegeneración en la enfermedad. De esta forma, la pérdida de neuronas en el glaucoma está relacionada con mecanismos presentes en otras enfermedades neurodegenerativas, como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la acumulación de proteínas como la tau y la beta-amiloide, la excitotoxicidad producida por el aumento de glutamato, y la inflamación producida por citoquinas como el TNF-α [122,123].

El estrés oxidativo parece estar altamente implicado en la etiopatogenia del glaucoma. Por un lado, parece estar implicado no solo en la retina sino también en el daño a la

malla trabecular, disminuyendo la resistencia de la misma al drenaje del humor acuoso, produciéndose una elevación de la PIO [125]. El daño en la malla trabecular producido por el estrés oxidativo es consecuencia de varios mecanismos, como el daño en las células endoteliales y en su capacidad de adhesión y contracción y por la inflamación producida por la activación de la vía del NF-κB [119]. Por otro lado, el aumento de la PIO y la hipoxia van a estimular la producción de EOR, que van a dañar las CGR y el nervio óptico. Las EOR van a producir apoptosis de las CGR, ya sea por la activación de caspasas o por otras vías, como la señalización molecular intracelular. También pueden producir daño en las CGR mediante la desregulación de la autofagia, incrementando la misma. El daño también se va a producir por otras vías, como el aumento productos finales de glicación avanzada, la activación de MMPs o el aumento de TNF-α. Es importante destacar también que el estrés oxidativo va a producir daño en las células gliales, de forma que va a contribuir a propagar el daño neuronal [126].

El aumento del estrés oxidativo también produce una alteración en la hemodinamia ocular, de forma que el aumento de las EOR va a eliminar el óxido nítrico, un importante vasodilatador, produciéndose vasoconstricción y disminución de flujo sanguíneo y originándose daño por isquemia en la retina tras un periodo prolongado [119].

Existen varios tipos de glaucoma, cada uno con características particulares. El glaucoma más común es el **glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA)** caracterizado por un aumento de la PIO y una pérdida lenta y progresiva de las CGR y de sus axones que forman el nervio óptico. Se denomina de ángulo abierto debido a que presenta un ángulo amplio y abierto entre la córnea y el iris. Cuando afecta a niños y jóvenes se denomina glaucoma juvenil [127]. Otro tipo de glaucoma es el **glaucoma de ángulo cerrado (GAC)**, un glaucoma menos frecuente donde se produce un aumento rápido e intenso de la PIO debido al bloqueo repentino en los canales de drenaje [128]. El **glaucoma neovascular** es un tipo de glaucoma en el que la PIO aumenta por un bloqueo de los canales de drenaje producido por el crecimiento de vasos sanguíneos [129]. El **glaucoma congénito** se produce por un mal desarrollo de los canales de drenaje en el periodo prenatal, ocasionando glaucoma en recién nacidos. El glaucoma también puede deberse a otra condición médica, recibiendo el nombre de **glaucoma secundario** y puede ser tanto de ángulo abierto como cerrado.

Sin embargo, hay otros tipos de glaucoma que no cursan con elevación de la PIO a pesar de haber daño en el nervio óptico como el **glaucoma normotensivo** [124].

5.2 Hipotensión y neuroprotección como dianas terapéuticas para el tratamiento del glaucoma

Como se ha mencionado anteriormente, el glaucoma generalmente cursa con un aumento de la PIO que acaba dañando las CGR y el nervio óptico, produciendo neurodegeneración y la consiguiente pérdida de visión. Es por ello que el tratamiento de primera línea para el glaucoma consiste en la administración de principios activos capaces de reducir la presión intraocular por vía tópica. Sin embargo, al producirse una neurodegeneración en la retina incluso en pacientes en los que la PIO no está elevada, también es necesaria la implementación de una terapia neuroprotectora capaz de frenar esta degeneración. Además, al tratarse de una enfermedad multifactorial conviene combinar diferentes tipos de tratamiento. Los antiinflamatorios son principios activos con gran potencial para el tratamiento del glaucoma, debido a que esta patología cursa con inflamación que acelera el daño producido a la retina. Se han empleado varios antiinflamatorios en el tratamiento de patologías neurodegenerativas. Un ejemplo de estos agentes son los glucocorticoides como la dexametasona que se han utilizado de forma intravítrea para el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior. Sin embargo, estos principios activos tienen una vida media corta, por lo que su uso requiere de numerosas inyecciones, con los efectos adversos que ello conlleva. El uso del ketorolaco, un antiinflamatorio no esteroideo, ha mostrado contribuir a la mejora en la disminución de la PIO en combinación con análogos de prostaglandinas por vía tópica en el tratamiento del glaucoma [130]. Además, el uso del ketorolaco también parece disminuir la muerte en las células ganglionares de retina en esta patología [131].

5.2.1 Reducción de la presión intraocular en el tratamiento del glaucoma

El tratamiento con agentes hipotensores es el de elección cuando el glaucoma cursa con un aumento de la PIO, como es el caso del glaucoma de ángulo abierto y de ángulo cerrado. Este tratamiento se administra tradicionalmente por vía tópica, ya que el objetivo es el segmento anterior del ojo.

La reducción de la PIO puede llevarse a cabo por varios mecanismos: disminuyendo la producción de humor acuoso o aumentando su drenaje. El drenaje del humor acuoso puede producirse disminuyendo la resistencia al flujo a través de la red trabecular, aumentando el drenaje por la vía uveoescleral o por una combinación de ambos mecanismos. Dentro de los principios activos con actividad hipotensora ocular podemos encontrar varios grupos de fármacos, cada uno con su particular mecanismo de acción.

- **Análogos de prostaglandinas**: Los análogos de prostaglandinas son los principios activos más efectivos y utilizados para el tratamiento de la elevación de la PIO asociada al glaucoma gracias a su mecanismo de acción, que consiste en el aumento del drenaje del humor acuoso por la ruta uveoescleral. Se sabe que las prostaglandinas se encuentran presentes en estructuras oculares como la malla trabecular, el músculo ciliar y la esclerótica, lo que lleva a pensar que tienen una función endógena en el drenaje del humor acuoso [132]. Actualmente hay aprobados cuatro análogos PGF2α con actividad frente al glaucoma: el latanoprost, el travoprost, el bimatoprost y el tafluprost. Todos ellos actúan de forma similar. El latanoprost es el primer análogo PGF2α que se utilizó en el mercado, y actualmente sigue siendo el más prescrito. Es un profármaco que atraviesa bien la córnea y alcanza concentraciones efectivas en el humor acuoso a las 2 horas tras su administración tópica, en forma de ácido de latanoprost. Es el mejor tolerado de su grupo, y tiene una elevada efectividad. Sin embargo, puede causar efectos adversos oculares como hiperemia conjuntival, irritación en la superficie ocular o pigmentación del iris. Cabe destacar que actualmente se ha comercializado un nuevo colirio de latanoprost que no incluye conservantes, reduciendo estos efectos oculares. Esta formulación de latanoprost está comercializada como Monoprost® [133]. El travoprost es también un profármaco efectivo para la reducción de la PIO, especialmente en población Afroamericana, siendo en este caso mucho más efectivo que el latanoprost y el timolol. El travopost se encuentra comercializado como Travatan® [134]. El tafluprost se encuentra comercializado con el nombre de Taflotan®, colirio de tafluprost que tampoco contiene conservantes [133]. Cabe destacar que el bimatoprost, además de encontrarse comercializado como colirio (Lumigan®) se encuentra actualmente aprobado por la FDA en forma de implante biodegradable

intracameral, consiguiendo una liberación de la prostaglandina de forma prolongada. Este implante se encuentra comercializado con el nombre de Durysta® para el tratamiento del glaucoma de ángulo abierto [135,136].

- **Bloqueantes β-adrenérgicos**: Los bloqueantes β-adrenérgicos son tratamientos de primera línea junto a los análogos de prostaglandinas, aunque estos últimos han mostrado ser más efectivos en la reducción de la PIO en diversos estudios. El mecanismo de acción de los bloqueantes β-adrenérgicos consiste en la disminución de la producción del humor acuoso mediante el bloqueo de la estimulación sináptica en el epitelio del cuerpo ciliar. Además de presentar algunos efectos adversos en la superficie ocular, se han descrito efectos adversos de estos agentes activos a nivel respiratorio y cardíaco, estos últimos debido a su mecanismo de acción [137]. Uno de los más utilizados en el maleato de timolol, un bloqueante no selectivo que se ha utilizado en combinación con latanoprost, potenciando el efecto [135]. Además, otros Bloqueantes β-adrenérgicos están comercializados, como es el caso del levobunolol, metipranolol, carteolol y betaxolol [135].

- **Agonistas α-2 adrenérgicos**: Los Agonistas del receptor α-2 van a actuar disminuyendo la producción de humor acuoso, gracias a la inhibición de la síntesis de adenosin monofosfato cíclico en el cuerpo ciliar. Algunos estudios han mostrado también un papel neuroprotector en las CGR, aunque todavía no hay ensayos clínicos [138]. Dentro de los agonistas selectivos α-2 destacan la apraclonidina y la brimonidina, comercializados en colirio con el nombre de Iopidine® y Alphagan® respectivamente [135,139]. Estos principios activos son administrados como segunda línea del tratamiento. El mecanismo de acción de estas sustancias hace que se puedan producir efectos adversos como la midriasis o la vasoconstricción ciliar relacionados con el efecto simpático por la activación de los receptores α, siendo estos efectos menos frecuentes con el empleo de brimonidina frente a la apraclonidina debido la mayor selectividad de la brimonidina a los receptores α-2 [135].

- **Inhibidores de la anhidrasa carbónica**: Los inhibidores de la anhidrasa carbónica van a disminuir la PIO mediante la reducción de la producción de humor acuoso, gracias a la inhibición de la isoenzima II de la anhidrasa carbónica en el cuerpo ciliar. La inhibición va a evitar que se forme bicarbonato y que pase a la cámara posterior, reduciendo así el transporte de sodio. La acetazolamida se ha utilizado de forma sistémica para reducir la PIO, sin embargo, produce gran cantidad de efectos adversos. Se han realizado estudios con acetazolamida vehiculizada en nanosistemas para administración tópica mostrando buenos resultados [140], sin embargo actualmente son más utilizados la dorzolamida (Truzopt®) y la brinzolamida (Azopt®) en colirio, inhibidores de la anhidrasa carbónica de segunda generación con menos efectos adversos [135].

- **Agonistas de los receptores de adenosina**: Los agonistas de los receptores de adenosina disminuyen la PIO gracias a la modulación de la proteína G acoplada a receptores. Los receptores de adenosina A1, A2 y A3 tienen importantes funciones en el drenaje del humor acuoso y el buen estado de la retina. La activación del receptor A1 tiene la capacidad de facilitar la salida de flujo del humor acuoso. Por otro lado, los receptores A3 activan canales de cloro en el epitelio ciliar aumentando la PIO, por lo que sus antagonistas ayudarán a reducirla. Un ejemplo de agonista de adenosina que aumenta el drenaje del humor acuoso es el Agonista A1 Trabodenoson, que se encuentra actualmente en estudio, mostrando resultados significativos de reducción de la PIO en un ensayo clínico de fase II (NCT01917383) [141,142]. Los agonistas de los receptores de adenosina también tienen efecto neuroprotector. Cabe destacar que la activación de los receptores A1 y A2a van a aumentar el flujo sanguíneo a la retina y el nervio óptico, mejorando su función tras la isquemia. [143].

- **Inhibidores de la rho-quinasa**: Los inhibidores de la rho-quinasa van a actuar relajando la malla trabecular gracias a su actuación en el citoesqueleto, de forma que van a disminuir la resistencia a la salida del humor acuoso, facilitando su drenaje. Actualmente el ripasudil y el netarsudil están aprobados y son utilizados en terapia de combinación con latanoprost en glaucoma de ángulo abierto [144]. Además, van a tener un efecto antifibrótico y van a favorecer el flujo sanguíneo, teniendo efectos neuroprotectores en la retina [145].

Cabe destacar que uno de los problemas del tratamiento tópico antiglaucomatoso es el desarrollo de problemas como la EOS o el empeoramiento de los síntomas si el paciente padece la enfermedad. Esto es debido a la necesidad de administrar el fármaco de forma frecuente al tratarse de una patología crónica. Los principios activos antiglaucomatosos pueden producir daño en la superficie ocular, como por ejemplo las prostaglandinas. Otra causa de daño en la superficie ocular es el uso de conservantes en las formulaciones, como el cloruro de benzalconio, que ha mostrado toxicidad en células de córnea y conjuntiva [60,61].

5.2.2 Neuroprotección como diana terapéutica para el tratamiento del glaucoma.

Dada la etiopatogenia del glaucoma, que cursa con neurodegeneración en la retina y en el nervio óptico, ha surgido la necesidad de buscar nuevos tratamientos con efecto neuroprotector capaces de aumentar la supervivencia de las CGR y evitar la degeneración y por tanto la pérdida de visión. Para conseguir un efecto neuroprotector se puede recurrir a varios objetivos terapéuticos, como los receptores de glutamato, elementos autoinmunes, factores neurotróficos, la síntesis de óxido nítrico, estrés oxidativo, canales de sodio y calcio, proteínas de choque térmico y vías apoptóticas [146].

- **Receptores de glutamato**: El neurotransmisor glutamato se ve incrementado en la enfermedad del glaucoma, lo que ha mostrado producir una excitotoxicidad por la activación de receptores de glutamato dañando las CGR. Los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) son receptores de glutamato ionotrópicos que se activan por el glutamato produciendo excitotoxicidad. Es por ello que los antagonistas de los receptores NDMA se postulan como buenos neuroprotectores para el tratamiento del glaucoma. Los antagonistas de receptores NMDA han mostrado una reducción de la excitotoxicidad en modelos de hipertensión ocular. Entre ellos, la memantina, un antagonista no competitivo de receptores NMDA, ha sido muy estudiada para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y ha mostrado efecto neuroprotector en modelos animales de daño en CGR cuando se administra en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad. A pesar de ello, los ensayos realizados de fase III con memantina no mostraron

eficacia significativa, lo que puede deberse a una inadecuada duración del tratamiento [147].

- **Elementos autoinmunes**: Varios estudios han mostrado que la estimulación de las células T inmunitarias, lejos de lo que se podría pensar, favorecen la preservación de las CGR. Para estimular el sistema inmune se pueden utilizar antígenos como el acetato de Glatirámero, un oligopéptido sintético que interactúan con varias células T autoinmunes. Este mecanismo de acción consiste en la acumulación de células T en los lugares de la lesión. El uso del acetato de glatirámero ha mostrado aumentar la supervivencia de las CGR cuando el daño era producido por excitotoxicidad mediada por glutamato o por un aumento brusco de la PIO [146].

- **Factores neurotróficos**: La hipótesis de que en el glaucoma el daño a los axones del nervio óptico bloquea la liberación de factores neurotróficos esenciales para la supervivencia de las CGR ha impulsado la investigación del efecto neuroprotector de los factores neurotróficos. Entre estos factores se encuentra el **factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF),** perteneciente a la familia de las neurotrofinas, que se presenta en niveles reducidos en varios modelos de glaucoma que cursan con aumento de la PIO. La administración de BDNF en inyecciones intravítreas ha demostrado en varios estudios aumentar la supervivencia de CGR tras el daño de varios tipos al nervio óptico, entre ellos en modelos de elevación de la PIO. Sin embargo, uno de los problemas del BDNF es la formación de radicales de oxígeno que pueden tener efectos negativos [146,148]. Otro ejemplo es el **factor neurotrófico ciliar (CNTF),** que administrado en inyección intravítrea en un modelo animal de hipertensión crónica ha conseguido aumentar la supervivencia de las CGR durante 4 semanas. Otro factor neurotrófico con gran potencial en el tratamiento del glaucoma es el **factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF)**, un factor neurotrófico secretado por las células gliales. Además, los receptores de GDNF se expresan en las CGR y en las células de Müller, donde su activación induce la secreción de otros factores de crecimiento. El GDNF también ha sido administrado de forma intravítrea en modelos animales con elevación de la PIO, mostrando un incremento en la

supervivencia de las CGR y de los axones del nervio óptico durante un tiempo prolongado [149].

- **Síntesis de óxido nítrico**: Se ha observado que niveles elevados de óxido nítrico puede dañar los axones del nervio óptico. Por ello inhibidores de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS-2) como la aminoguanidina han demostrado aumentar la supervivencia de CGR en modelos de hipertensión [146]. Sin embargo, niveles bajos de NO pueden producir vasoconstricción, reduciendo el flujo de oxígeno a la retina, y aumentando la PIO, por lo que el papel de los inhibidores de la NOS todavía no está bien esclarecido.

- **Estrés oxidativo**: El estrés oxidativo es un elemento común presente en varias patologías neurodegenerativas del segmento posterior del ojo. Como se ha mencionado previamente el estrés oxidativo va a actuar activando numerosas vías produciendo daño en las CGR, el nervio óptico y la malla trabecular. De hecho, en varios modelos de glaucoma con daño en el nervio óptico y aumento de la presión intraocular se ha observado un aumento de radicales libres de oxígeno y una alteración en enzimas antioxidantes. En la retina, los radicales libres van a dañar las CGR mediante vías como la del glutamato, mientras que en el nervio óptico el daño producido por los radicales libres actúan atrofiando la lámina cribosa y produciendo una remodelación de la matriz extracelular. Por todo ello, los activos antioxidantes son un potencial tratamiento para la neurodegeneración producida en el glaucoma, especialmente cuando su uso se realiza en los comienzos de la enfermedad. Por ejemplo, el **α-Tocopherol** o vitamina E es un antioxidante liposoluble presente en el EPR. A pesar de no haber sido probado en modelos de hipertensión ocular, ha presentado efecto neuroprotector en modelos que cursan con isquemia de retina. En ensayos clínicos utilizando el α-Tocopherol como suplemento se han encontrado beneficios en la visión de pacientes con glaucoma y una disminución de la peroxidación lipídica [146]. Otras vitaminas, como la vitamina B o la vitamina A han mostrado efectos positivos en las CGR. La vitamina B por ejemplo mostró *in vivo* una mejora en la función y cantidad de CGR. La **coenzima Q10** es otro antioxidante que ha mostrado beneficios en modelos animales de glaucoma y en estudios con células ganglionares de retina, reduciendo los

niveles de glutamato y la muerte de las CGR. Ensayos clínicos realizados con suplementación de coenzima Q10 y vitamina E también han reportado mejoras en la visión [150]. El antioxidante **resveratrol** también redujo el daño y muerte de CGR tras isquemia de retina, así como una reducción de radicales libres de oxígeno en ratas Sprague-Dawley [151]. En otro estudio con un modelo animal con PIO elevada también se encontró protección en las CGR [152]. Otros antioxidantes como el Ginkgo Biloba o los ácidos grasos esenciales omega 3 y 6 han mostrado utilidad en la neurodegeneración del glaucoma en ensayos clínicos [150]. También hay otras moléculas en estudio por su capacidad antioxidante, como es el caso de la **melatonina**. En diferentes estudios la melatonina ha presentado efecto antioxidante tanto por su capacidad de neutralizar los radicales de oxígeno como por su efecto en las enzimas antioxidantes. Esta molécula además es capaz de inhibir la apoptosis, por lo que se trata de una alternativa prometedora para el tratamiento de la neurodegeneración producida en el glaucoma [153,154].

- **Canales de sodio y calcio**: Los canales de sodio y calcio dependientes de voltaje también son un objetivo en tratamiento en la enfermedad del glaucoma. El calcio está implicado en la excitotoxicidad y la isquemia, provocando muerte de las CGR. Los **antagonistas de los receptores de calcio**, que bloquean la entrada de calcio a las células, van a disminuir la muerte de CGR por isquemia y excitotoxicidad. En el nervio óptico la inhibición de estos canales también parece tener resultados cuando el daño es producido por un aumento de glutamato. Sin embargo, aún hay mucho que investigar.

  Los canales de socio también tienen un papel en la neuroprotección en el glaucoma, ya que hay evidencia de que la entrada de sodio producida por estrés físico o fisiológico aumenta la degeneración del nervio óptico. Esto se debe a que el nervio óptico tiene elevada cantidad de canales de sodio dependientes de voltaje. Los antagonistas de los canales de sodio han mostrado una protección a la degeneración del nervio óptico en modelos *in vivo* de inflamación y de aumento de la PIO. Un ejemplo es el anticonvulsivo **fenitoína**, que a concentraciones más bajas de las administradas para la epilepsia es capaz de reducir la muerte de las CGR tras haber sufrido daño en el nervio óptico. En estudios en ratas se ha encontrado una protección del

nervio óptico en condiciones de anoxia. También en ensayos clínicos ha demostrado un efecto beneficioso en la visión [146].

- **Proteínas de choque térmico:** Actualmente se encuentra en estudio el papel de las proteínas de choque térmico en la protección de las CGR, cuya sobrexpresión parece protegerlas. En concreto la HSP27, que se encuentra reducida en pacientes con glaucoma, aumentó la supervivencia de las CGR tras la sección del nervio óptico. Un aumento de la HSP70 también manifestó efectos beneficiosos, protegiendo frente al daño en las CGR en un modelo en ratas con elevación prologada de la PIO. Por tanto, el empleo de fármacos capaces de modificar la expresión de las proteínas de choque térmico es un punto interesante para la neuroprotección en el glaucoma [146,155].

- **Vías apoptóticas**: La apoptosis de las CGR producida en la enfermedad del glaucoma se da como consecuencia de la activación de diferentes vías apoptóticas. Es por ello que la inhibición de estas vías puede resultar en un efecto positivo. Sin embargo, muchas de las vías son aún desconocidas, lo que supone una limitación. Entre los aptiapoptíticos podemos destacar los ácidos biliares el ácido ursodesoxicólico (UDCA) y el ácido ursodesoxicólico conjugado con taurina (TUDCA), cuya eficacia neuroprotectora en varias enfermedades neurodegenerativas ha sido demostrada en numerosos estudios. El TUDCA por ejemplo ha mostrado tener un efecto neuroprotector en un modelo de daño de CGR producido por aplastamiento del nervio óptico en ratas Sprague Dawley, siendo el efecto más marcado en combinación con otros neuroprotectores [156]. Además, ambos han mostrado inhibir la apoptosis en varios modelos de degeneración de retina [157].

Cabe destacar que hay fármacos reductores de la PIO que muestran también un efecto neuroprotector. Este es el caso de la brimonidina, que ha sido capaz de proteger a las CGR en modelos animales con daño en el nervio óptico. El mecanismo neuroprotector de la brimonidina es independiente de su efecto en la PIO y se produce gracias al bloqueo del efecto del estrés oxidativo y el aumento de factores antiapoptóticos. En su mecanismo parece estar implicada la modulación de la excitotoxicidad producida por glutamato [138,158].

Otro ejemplo son los análogos de prostaglandinas como el travoprost o latanoprost, que también han sido descritos como posibles agentes neuroprotectores [146].

5.3 Nanotecnología y nuevos sistemas de liberación controlada para el tratamiento del Glaucoma.

Como se ha expuesto anteriormente, la administración de fármacos por vía ocular para el tratamiento del glaucoma tiene varias limitaciones, tanto para la vía tópica como para la vía intraocular. La administración tópica se asocia a una biodisponibilidad muy baja y las formulaciones permanecen muy poco tiempo en el ojo. Esto produce una necesidad de administración repetida, lo que disminuye el cumplimiento terapéutico por parte de los pacientes y aumenta los efectos adversos como el desarrollo de EOS. Por otro lado, la administración intraocular conlleva la administración de numerosas inyecciones, ya que se trata de una patología crónica que requiere mantener concentraciones de fármaco en el interior del ojo durante largos periodos de tiempo. Esto produce numerosos efectos adversos debido a que es una vía más invasiva. Por todo ello, tanto la administración tópica como la administración intraocular se van a beneficiar del uso de sistemas de liberación controlada. En la vía tópica, estos sistemas van a permitir aumentar el tiempo de residencia del fármaco en la superficie ocular, además de favorecer procesos como la internalización. Respecto a la vía intraocular, el uso de sistemas de liberación controlada de fármacos va a permitir mantener concentraciones terapéuticas de principio activo en el lugar de acción durante largos periodos de tiempo, por lo que se reduce el número de inyecciones intraoculares.

5.3.1 Liposomas.

Los liposomas, debido a su estructura, son capaces de encapsular principios activos tanto acuosos como oleosos y aumentar su biodisponibilidad. Los principios activos acuosos quedarían distribuidos en el interior del núcleo acuoso y en la fase acuosa de dispersión, sin embrago, los principios activos oleosos se encontrarían en el interior de las bicapas lipídicas, lo que supone una gran ventaja para los principios activos de esta naturaleza, ya que son difíciles de vehiculizar (Figura 9).

Los liposomas tienen la capacidad de entrar en contacto con las células de la superficie ocular, facilitando la entrada de fármacos por varios mecanismos [2]. Para el tratamiento de la enfermedad del glaucoma se han estudiado diversas formulaciones liposomales. Varios principios activos antiglaucomatosos han mostrado beneficiarse de su inclusión en liposomas. Por ejemplo, la brinzolamida mostró un aumento de la permeabilidad de 6 veces al formularse en liposomas y se obtuvo una mayor reducción de la presión intraocular tras su administración tópica [159]. La acetazolamida, otro principio activo difícil de vehiculizar por su baja hidrosolubilidad y que tradicionalmente se administraba por vía oral, también resultó ser efectiva en la reducción de la PIO por vía tópica encapsulada en una formulación liposomal y administrada en conejos albinos [140]. Otro ejemplo son los liposomas de dorzolamida, que fueron probados en pacientes y mostraron un efecto superior al de la formulación comercial [160]. Estudios en conejos normotensos utilizando metazolamida también mostraron una superioridad en la reducción de la PIO respecto a la suspensión, especialmente combinando el uso de liposomas con hidrogeles capaces de aumentar el tiempo de residencia en la superficie ocular [161]. Otros principios activos de naturaleza acuosa también han sido encapsulados en liposomas de forma satisfactoria. Este es el caso del maleato de timolol encapsulado en liposomas, que consiguió una cesión *in vitro* más sostenida en comparación con la formulación comercial y una reducción de la PIO más duradera *in vivo* en un modelo de conejos albinos con glaucoma inducido por betametasona [162].

Los liposomas para el tratamiento del glaucoma no se han investigado únicamente para vía tópica. Por ejemplo, una formulación liposomal con latanoprost fue investigada en inyección subconjuntival en conejos, manteniendo el efecto hipotensor hasta 90 días y con un mayor efecto en la reducción de la PIO que la instilación de gotas de latanoprost [163].

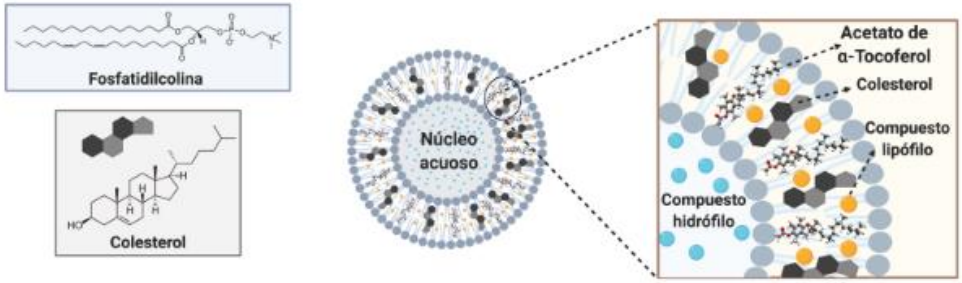

Figura 9: Estructura, distribución de los principios activos y principales componentes de los liposomas. Imagen adaptada de "López-cano JJ, González-cela-Casamayor MA, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT" et al. Liposomes as vehicles for topical ophthalmic drug delivery and ocular surface protection. Expert Opin Drug Deliv 2021; 18: 819–47. doi:10.1080/17425247.2021.1872542.".

5.3.2 Emulsiones/Microemulsiones.

Las emulsiones son sistemas bifásicos, compuestos por una fase acuosa y otra oleosa. Por lo general, cuando se trata de administración ocular, se prefieren las emulsiones de fase externa acuosa. Las emulsiones son ampliamente utilizadas en el tratamiento del glaucoma cuando el principio activo de interés es de naturaleza oleosa. Muchos fármacos comercializados son emulsiones, como por ejemplo el Monoprost® o el Travatan® [135,164]. Además, el empleo de emulsiones catiónicas también está siendo estudiado para la vehiculización del antiglaucomatoso latanoprost para el tratamiento del glaucoma de ángulo abierto [165].

Como ya se ha señalado anteriormente, dentro de las emulsiones las microemulsiones tienen un tamaño de gotícula muy reducido y son termodinámicamente estables, siendo esta una de sus principales diferencias con las nanoemulsiones. Este tamaño tan reducido va a facilitar la permeabilidad de los principios activos a través de los tejidos, lo que va a aumentar la eficacia de los principios activos administrados por vía tópica pudiendo llegar incluso hasta al segmento posterior [166]. Recientemente se han empezado a estudiar las microemulsiones para el tratamiento del glaucoma por vía tópica, tanto para

reducir la presión intraocular como para frenar el daño en las estructuras oculares. Por ejemplo, la brimonidina formulada en microemulsión logró un mejor efecto en la reducción de la PIO *in vivo* en un modelo de glaucoma en conejos. Además, demostró un aumento en la permeabilidad de la brimonidina a través de la córnea en un modelo de permeación *ex vivo* empleando córeas de cabra [167]. También se ha conseguido alcanzar los tejidos del segmento posterior en estudios farmacocinéticos *in vivo* utilizando ratas Sprague Dawley aplicando una microemulsión pegilada de dexametasona de forma tópica [168].

5.3.3 Dendrímeros.

Los dendrímeros son capaces de unirse a numerosos principios activos por enlaces covalentes, puentes de hidrógeno, interacciones iónicas o interacciones hidrófobas. Si nos enfocamos en la administración tópica, los dendrímeros se han estudiado para vehiculizar principios activos antiglaucomatosos. Un ejemplo son los dendrímeros cargados con brimonidina, estudiados en administración repetida en ratas, los cuales fueron más efectivos que la solución de brimonidina [169]. Lo mismo se ha demostrado en conejos con la acetazolamida utilizando dendrímeros derivados del carbosilano [170]. Los dendrímeros también se han utilizado en inyecciones intravítreas para el tratamiento de patologías del segmento posterior. Por ejemplo, se han empleado dendrímeros de PAMAN con acetónido de triamcinolona para el tratamiento de neurodegeneración de la retina en modelos animales, siendo bien tolerados, y logrando evitar la angiogénesis y la inflamación [171].

5.3.4 Hidrogeles.

Los hidrogeles son sistemas matriciales altamente biocompatibles capaces de retener agua en su interior. Los hidrogeles se han utilizado para la vehiculización de fármacos para el tratamiento del glaucoma tanto por vía tópica como por vía intraocular gracias a sus interesantes propiedades, siendo los más utilizados los hidrogeles naturales como el quitosano, los derivados de la celulosa, el ácido hialurónico y la gelatina. Por una parte, los hidrogeles son interesantes para la administración por vía tópica debido a su alta viscosidad y sus propiedades mucoadhesivas, que permiten aumentar el tiempo de residencia del fármaco en la

superficie ocular, consiguiendo por tanto un efecto más prolongado. Se han utilizado formulaciones con hidrogeles solos y combinados con otros sistemas como liposomas o nanopartículas para vehiculizar principios activos antiglaucomatosos, consiguiendo efectos mayores y más duraderos utilizando varios principios activos conocidos [172]. Por ejemplo, la inclusión de liposomas de acetazolamida en liposomas dispersos en HPMC logró mejores resultados en la reducción de la PIO que la formulación liposomal sin el hidrogel [140]. La dificultad de administración de hidrogeles debida a su elevada viscosidad ha promovido el uso de hidrogeles sensibles al pH o la temperatura, capaces de gelificar *in situ* cuando son aplicados. Por ejemplo, se han estudiado hidrogeles termosensibles de quitosano para vehiculizar latanoprost, mostrando en conejos una reducción de la PIO de 7 días de duración [173].

Por otro lado, además de la administración tópica, los hidrogeles biodegradables son interesantes para la administración intraocular, ya que son capaces de liberar los principios activos de forma sostenida y controlada, permitiendo un efecto duradero y evitando así el uso de inyecciones repetidas. Al ser biodegradables desaparecerán de la zona de administración y además son fáciles de disolver para incluir los principios activos en su matriz [174]. Un ejemplo de hidrogel prometedor es el PLGA-PEG-PLGA, un polímero sensible a la temperatura capaz de gelificar en el lugar de acción, el cual se ha estudiado para liberar de forma sostenida principios activos antioxidantes y antiinflamatorios para el tratamiento de patologías oculares neurodegenerativas del segmento posterior [175].

5.3.5 Insertos e implantes intraoculares.

Los insertos e implantes son sistemas de un tamaño superior a 1 mm capaces de liberar fármacos, en la mayoría de los casos poco solubles, durante periodos prolongados de tiempo. Pueden ser biodegradables o no biodegradables, en cuyo caso se deben retirar pasado el tiempo de acción de fármaco, lo cual en ocasiones requiere procedimientos quirúrgicos. El primer inserto comercializado para el glaucoma fue el Ocusert®, formado por un copolímero de etileno-acetato que contenía pilocarpina en su interior [176]. Sin embargo, fue retirado por sus efectos adversos [177].

Dentro de los insertos no biodegradables se ha desarrollado uno de silicona en forma de anillo que libera bimatoprost (Allergan), diseñado para ser colocado en la superficie conjuntival. Este dispositivo resultó útil en la reducción prolongada de la PIO, aunque tuvo algunos efectos adversos en ensayos de fase II.

En cuanto a los implantes no biodegradables, cabe destacar el implante iDose ®, un implante de titanio para el tratamiento del glaucoma en estudios de Fase II. Este implante, que lleva incluido el análogo de prostaglandina travoprost en su interior, se coloca en la malla trabecular mediante una incisión en la córnea, siendo capaz de liberar el agente activo durante meses [178].

Dentro de los biodegradables se encuentra el implante para administración intracameral Durysta™ (Allergan) aprobado por la FDA para el tratamiento de glaucoma de ángulo abierto e hipertensión ocular. Este implante está formado por una matriz de PLGA y contiene 10 µg de bimatoprost [136]. Destaca también otro implante de PLGA cargado con el agente hipotensor brimonidina de acuerdo con la tecnología NOVADUR y estudiado para administrarse de forma intravítrea para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, que podría adaptarse al tratamiento del glaucoma aprovechando sus propiedades neuroprotectoras e hipotensoras [179].

5.3.6 Micropartículas y nanopartículas.

Las **nanopartículas poliméricas** se han empleado para encapsular principios activos con el objetivo de tratar el glaucoma debido a su capacidad de internalizarse en el interior celular por endocitosis. Las nanopartículas se han utilizado para administración tópica de antiglaucomatosos, como es el caso de betaxolol cargado en nanopartículas de polycaprolactona, aumentando así su eficacia por vía tópica [180]. Además de su aplicación en gotas oculares, las nanopartículas compuestas de polímeros biodegradables se han investigado para la administración en el segmento posterior del ojo, con el objetivo de lograr una liberación controlada. Por ejemplo, se han utilizado nanopartículas de PLGA cargadas con dexametasona y melatonina para el tratamiento del glaucoma mediante inyección intravítrea, consiguiendo una liberación controlada de ambos agentes así como un aumento de la penetración en retina y una reducción en la

PIO en un modelo animal en conejos [181]. Un inconveniente de las nanopartículas para la liberación controlada es su elevada superficie específica, debido a su pequeño tamaño.

Las **micropartículas** surgieron debido a la necesidad de liberar principios activos de forma controlada en el lugar de acción. Pueden ser de dos tipos según su estructura: Cuando el principio activo se encuentra rodeado de un recubrimiento polimérico formando una especie de reservorio se denominan **microcápsulas**. Por otro lado, las **microesferas** están formadas por una matriz polimérica en la que se pueden incluir principios activos. Las microesferas son capaces de encapsular varios principios activos de diferente naturaleza y liberarlos de forma sostenida durante largos periodos de tiempo [26]. Dentro de los polímeros utilizados para su elaboración, como la gelatina, las poliamidas o la albúmina, destaca el ácido poli(láctico-co-glicólico) conocido por sus siglas PLGA. El PLGA es un polímero biodegradable, que además cuenta con la aprobación de la FDA y la EMA para su uso en implantes oculares [182]. Se pueden administrar por vía intraocular, por ejemplo, mediante inyección intravítrea. Para su administración no es necesario realizar una cirugía, pueden utilizarse agujas de 25G-32G de calibre. Tras su administración intravítrea son capaces de agregarse, comportándose así como un implante [183]. El empleo de microesferas en inyección intravítrea para el tratamiento del glaucoma es muy prometedor. Se han realizado numerosos estudios para encapsular principios activos neuroprotectores, como el GDNF, logrando una cesión controlada durante tiempo prolongado, tanto solo como en combinación con otras sustancias neuroprotectoras como el TUDCA o la melatonina [184–186]. La combinación de GDNF y melatonina en microesferas de inyección intravítrea, por ejemplo, consiguió preservar la función de los fotorreceptores en un modelo animal de ratones “knockout” para el gen de la rodopsina. Además, las microesferas se han utilizado para la encapsulación de varias sustancias con diferentes mecanismos de forma simultánea. Por ejemplo, se ha desarrollado un sistema capaz de liberar durante tiempo prolongado tres principios activos con propiedades neuroprotectoras, un antiinflamatorio (dexametasona) y dos antioxidantes (melatonina y coenzima Q-10), lo cual es prometedor en el tratamiento del glaucoma debido a su etiopatogenia multifactorial [187]. Además de neuroprotectores, también se han incluido

principios activos capaces de reducir la PIO en microesferas de PLGA, como es el caso del fasudil, un inhibidor de la Rho-quinasa que se libera de forma controlada y sostenida durante 45 días cuando es incorporado en microesferas de PLGA [188]. Todo ello convierte a las microesferas de PLGA en un recurso prometedor para el tratamiento del glaucoma, pudiendo servir, incluso, para la vehiculización conjunta de fármacos con diferentes mecanismos, actuando sobre varias rutas implicadas en el desarrollo del glaucoma, por ejemplo, la co-encapsulación de sustancias neuroprotectoras, antiinflamatorias e hipotensoras como las desarrolladas en esta tesis doctoral.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

El tratamiento del Glaucoma, como se ha expuesto anteriormente, cuenta con numerosas dificultades, tanto cuando el tratamiento se realiza de forma tópica como intravítrea.

Cuando se realiza la administración de fármacos antiglaucomatosos por vía tópica la biodisponibilidad no es muy elevada, siendo necesario aumentar la frecuencia de las aplicaciones y dificultando el cumplimiento terapéutico. Además, la administración repetida durante largos periodos de tiempo puede ocasionar efectos adversos como la enfermedad del ojo seco. Por otro lado, cuando el objetivo terapéutico se encuentra en el segmento posterior la administración tópica no logra alcanzar los tejidos diana, siendo necesario el uso de inyecciones intravítreas. Esta vía es más invasiva, y cuando son necesarias inyecciones repetidas supondrá mayores efectos adversos.

Por todo ello, el **objetivo global** de esta tesis doctoral es el desarrollo de nuevos nano y microsistemas para el tratamiento del glaucoma capaces de mejorar la eficacia y evitar el desarrollo de efectos adversos como la EOS en tratamientos tópicos e incluir agentes neuroprotectores e hipotensores en sistemas de cesión controlada de administración intraocular. Para ello, se pretenden desarrollar nanosistemas lipídicos (liposomas) capaces de aumentar la biodisponibilidad de principios activos tanto acuosos como oleosos, y a su vez capaces de suplementar la película lagrimal y vehiculizar sustancias osmoprotectoras y por tanto prevenir la aparición de la enfermedad del ojo seco. Además, se pretende desarrollar un sistema de liberación controlada a base de microesferas para inyección intravítrea, capaz de liberar principios activos antioxidantes, antiinflamatorios y antiglaucomatosos durante un tiempo prolongado.

Para lograr el objetivo global de la tesis doctoral se han planteado objetivos específicos, que se exponen a continuación:

Primer objetivo: Desarrollo de una formulación liposomal para administración tópica a base de fosfolípidos sintéticos capaz de suplementar la película lagrimal y vehiculizar sustancias osmoprotectoras.

Para el cumplimento de este objetivo se realizaron las siguientes actividades:

- Elaboración de liposomas a partir de los fosfolípidos sintéticos DOPC y DMPC, capaces de vehiculizar y aumentar la biodisponibilidad de sustancias tanto acuosas como oleosas utilizando el método de hidratación de la película lipídica inicialmente propuesto por Bangham.
- Inclusión de agentes osmoprotectores en la formulación liposomal, así como de un polímero capaz de aumentar el tiempo de retención en la superficie ocular.
- Evaluación de las características fisicoquímicas de las formulaciones liposomales para comprobar su compatibilidad con la administración en la superficie ocular.
- Estudio de la tolerancia *in vitro* en células de la superficie ocular (células epiteliales de córnea y conjuntiva) a tiempo de exposición de 1 y 4 horas para evaluar la tolerancia aguda y tolerancia crónica respectivamente.
- Evaluación de la capacidad osmoprotectora de las formulaciones liposomales en un modelo de estrés hiperosmolar previamente desarrollado en células epiteliales de córnea.
- Estudio de la tolerancia aguda de las formulaciones liposomales *in vivo* en conejos albinos neozelandeses.

<u>Segundo objetivo</u>: Inclusión de principios activos antiglaucomatosos de diferente naturaleza en la formulación liposomal osmoprotectora previamente desarrollada para el tratamiento combinado del glaucoma y la enfermedad del ojo seco.

Para el cumplimento de este objetivo se realizaron las siguientes actividades:

- Elaboración de liposomas de los fosfolípidos sintéticos DOPC y DMPC con agentes osmoprotectores y cargadas de un principio activo antiglaucomatosos acuoso (brimonidina) u oleoso (travoprost) utilizando el método de hidratación de la película lipídica inicialmente propuesto por Bangham.
- Inclusión de sustancias osmoprotectoras y un polímero en las formulaciones liposomales antiglaucomatosas.
- Evaluación de las características fisicoquímicas de las formulaciones liposomales para comprobar su compatibilidad con la administración en la superficie ocular.

- Determinación del rendimiento y la eficacia de encapsulación de los principios activos antiglaucomatosos brimonidina y travoprost.
- Estudio de la tolerancia *in vitro* en células de la superficie ocular (córnea y conjuntiva) a dos tiempos de exposición (1 y 4 horas) para la evaluación de la tolerancia aguda y tolerancia crónica respectivamente y comparación de la tolerancia *in vitro* con la formulación comercial.
- Evaluación de la capacidad osmoprotectora de las formulaciones liposomales cargadas con principios activos antiglaucomatosos y agentes osmoprotectores en un modelo previamente desarrollado de estrés hiperosmolar en células epiteliales de córnea.
- Evaluación de la reducción de la presión intraocular *in vivo* en conejos albinos neozelandeses normotensos de las formulaciones liposomales con brimonidina y con travoprost, con y sin polímero, y comparación de estas con las formulaciones comerciales de referencia.

Tercer objetivo: Elaboración de microesferas biodegradables de PLGA para inyección intravítrea cargadas con principios activos con actividad neuroprotectora, antiinflamatoria e hipotensora, capaces de liberar estos principios activos de forma controlada y prolongada para el tratamiento del glaucoma.

Para el cumplimento de este objetivo se realizaron las siguientes actividades:

- Elaboración de microesferas utilizando diferentes tipos de polímero biodegradable PLGA (diferentes ratios de ácido láctico y ácido glicólico) cargadas de los principios activos melatonina y ketorolaco.
- Caracterización de las microesferas en cuanto a morfología, tamaño y eficacia de encapsulación.
- Estudios de cesión *in vitro* de las diferentes microesferas cargadas con los principios activos melatonina y ketorolaco.
- Selección de la formulación de microesferas óptima en función de la eficacia de encapsulación y los estudios de liberación *in vitro*.
- Incorporación de vitamina E y latanoprost a diferentes concentraciones en las microesferas de ketorolaco y melatonina seleccionadas.
- Caracterización y estudios de cesión *in vitro* de las formulaciones cargadas con ketorolaco, melatonina y latanoprost.

- Evaluación de la tolerancia *in vitro* de las microesferas en células humanas de retina.

Como resumen de los objetivos enumerados se puede establecer la siguiente **hipótesis de trabajo:** "Los nanosistemas lipídicos y las microesferas de liberación sostenida desarrollados en este trabajo de tesis pueden ser empleados por vía tópica e intravítrea respectivamente para el tratamiento eficaz de la enfermedad del Glaucoma"

CAPÍTULO I - CHAPTER I. A novel osmoprotective liposomal formulation from synthetic phospholipids to reduce *in vitro* hyperosmolar stress in dry eye treatments

Miriam Ana González Cela Casamayor, José Javier López Cano, Vanessa Andrés Guerrero, Rocío Herrero Vanrell, José Manuel Benítez del Castillo and Irene Teresa Molina Martínez.

Publicado en la revista Journal of Liposome Research.

CAPÍTULO I – CHAPTER I

CAPÍTULO I – CHAPTER I

RESUMEN

La enfermedad del ojo seco (EOS) es una enfermedad multifactorial de ámbito mundial causada principalmente por un déficit en la producción de lágrimas o un aumento de la evaporación de las mismas con un incremento de la osmolaridad de las lágrimas y de la inflamación. Esto provoca molestias y existe la necesidad terapéutica de restaurar la homeostasis de la superficie ocular. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una formulación liposomal biodegradable y biocompatible a partir de los fosfolípidos sintéticos 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y 1,2-dimyristoyl-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) que es capaz de reducir los efectos del estrés hipertónico ayudando a restaurar la capa lipídica de la película lagrimal. Se elaboraron liposomas mediante el método de hidratación de la película lipídica con fosfolípidos sintéticos (10 mg/mL) con y sin 0,2% de HPMC. Se caracterizaron en términos de tamaño, osmolaridad, pH, tensión superficial y viscosidad. Además, se determinó la toxicidad *in vitro* de la formulación a 1 y 4 h en células epiteliales corneales humanas (hTERT-HCECs) y células conjuntivales humanas (IM-HConEpiC). Además, se comprobó la actividad osmoprotectora en un modelo corneal de estrés hiperosmolar. También se realizaron pruebas de tolerancia aguda *in vivo* en conejos albinos neozelandeses mediante la aplicación tópica de las formulaciones oftálmicas cada 30 minutos durante 6 h. Todas las formulaciones ensayadas mostraron características fisicoquímicas adecuadas para su administración en la superficie ocular. Las formulaciones liposomales fueron bien toleradas en cultivos celulares y mostraron actividad osmoprotectora en un modelo hiperosmolar. No se registraron alteraciones ni molestias cuando se administraron tópicamente en conejos. Según los resultados, las formulaciones liposomales osmoprotectoras desarrolladas en este trabajo son candidatos prometedores para el tratamiento de la DED.

CAPÍTULO I – CHAPTER I

ABSTRACT

Dry eye disease (DED) is a worldwide, multifactorial disease mainly caused by a deficit in tear production or increased tear evaporation with an increase in tear osmolarity and inflammation. This causes discomfort and there is a therapeutic need to restore the homeostasis of the ocular surface. The aim of the present work was to develop a biodegradable and biocompatible liposomal formulation from the synthetic phospholipids 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) that is able to reduce the effects of hypertonic stress by helping to restore the lipid layer of the tear film. Liposomes were made using the lipid film hydration method with synthetic phospholipids (10 mg/mL) with and without 0.2% HPMC. They were characterized in terms of size, osmolarity, pH, surface tension, and viscosity. Additionally, the *in vitro* toxicity of the formulation at 1 and 4 h in human corneal epithelial cells (hTERT-HCECs) and human conjunctival cells (IM-HConEpiC) was determined. Furthermore, osmoprotective activity was tested in a corneal model of hyperosmolar stress. *In vivo* acute tolerance testing was also carried out in albino New Zealand rabbits by topical application of the ophthalmic formulations every 30 min for 6 h. All the assayed formulations showed suitable physicochemical characteristics for ocular surface administration. The liposomal formulations were well-tolerated in cell cultures and showed osmoprotective activity in a hyperosmolar model. No alterations or discomfort were reported when they were topically administered in rabbits. According to the results, the osmoprotective liposomal formulations developed in this work are promising candidates for the treatment of DED.

CAPÍTULO I – CHAPTER I

1 Introduction

Dry eye disease (DED) is a worldwide, multifactorial disease that is mainly caused by a deficit in tear production or increased tear evaporation (Willcox et al. 2017). DED causes significant eye discomfort that greatly affects sufferers' quality of life. The prevalence of DED is high in elderly patients, and particularly among elderly women (Stapleton et al. 2017). DED is linked to a loss of tear film homeostasis, with an increase in inflammation and osmolarity, which cause damage to the ocular surface and produce tear film instability (Bron et al. 2017). The two main types of dry eye are aqueous-deficient dry eye (ADDE) and evaporative dry eye (EDE). ADDE is caused by a decrease in tear secretion, which may be associated with numerous diseases or advanced age. EDE can be caused by an increase in tear evaporation, which is usually related to alterations in the meibomian glands or alterations to the ocular surface due to several causes, such as allergies (Bron et al. 2017). In addition, as reported by Anthony J. Bron et al. DED may present as a hybrid form between these two types (Bron et al. 2009). Additionally, the presence of DED is closely related to the chronic use of topical ocular hypotensive drugs in glaucoma therapy, which can significantly worsen the quality of life of patients (Wong et al. 2018, Tirpack et al. 2019). In the above mentioned case, the alteration of the ocular surface may be due to both the active antiglaucomatous ingredients and the presence of preservatives frequently used in eye drops, such as benzalkonium chloride, whose deleterious effects on eye tissues have been widely reported elsewhere (Chandrinos and Tzamouranis 2020). It is important to highlight that the deficit of tear production or the increase in tear evaporation produced in DED (Willcox et al. 2017) typically leads to tear hyperosmolarity, triggering inflammatory mechanisms and damaging the epithelial cells on the ocular surface (Bron et al. 2017). An increase in TNF-a production due to hyperosmolar stress has also been reported. Additionally, high levels of osmolarity are related to metalloproteinase production and MAP kinase (MAPK) pathway activation, leading to apoptosis (Luo et al. 2004). In addition, a hyperosmolar environment damages the conjunctival goblet (Blalock et al. 2008) and corneal (Luo et al. 2007) cells, which contributes to damaging the ocular surface. The tear film is composed of an aqueous–mucous layer and a lipid layer whose function is to protect and avoid water evaporation from the ocular surface (Willcox et al. 2017). The aqueous layer contains different important proteins, such as immunoglobulins IgA, IgM, and IgG (Davidson and Kuonen 2004), which play an important role in eye protection. Other important proteins present

in the aqueous layer include lactoferrin and lysozyme, which are related to the stability of the tear film (Dilly 1994). In addition, glucose and different salts are also present in the aqueous part of the tear film, among other components with important nutritional functions (Tiffany 2008). The lipid layer also comprises a wide variety of lipids, including non-polar lipids (such as triglycerides and cholesterol esters) and amphiphilic lipids (phospholipids) (Schuett and Millar 2012). Lipids are secreted by the meibomian glands and play important functions, such as preventing evaporation or promoting tear extensibility (Butovich et al. 2008). When the lipid layer is disrupted, its ability to prevent water loss is hampered, leading to tear evaporation (Links 2012). This evaporation results in an increase in the concentration of solutes in the aqueous layer, which produces a hyperosmolar environment on the ocular surface (Willcox et al. 2017). Although possible treatments for DED include surgery or dietary and supplemental treatments, the main therapy is the use of artificial tears, which stimulate the repair mechanisms of the tear film and reduce symptoms of discomfort (Jones et al. 2017). These ophthalmic formulations may include different supplements, such as polymers, osmoprotectants, or lipids (Jones et al. 2017). Among them, the use of lipid-based components in artificial tears for DED entails important benefits for precorneal tear film restoration due to their ability to supplement the tear film lipid layer (Garrigue et al. 2017). In fact, the addition of exogenous lipids has been observed to increase the lipid layer thickness. A good example of lipid supplementation in artificial tears includes the use of liposomes composed of phospholipids, such as derived-phosphatidylcholines normally present in the precorneal tear film (Garrigue et al. 2017, Lopez-Cano et al. 2021a). Liposomes are lipid-based nanovesicles that contain a lipid bilayer, which can entrap lipophilic substances, and cholesterol as the main membrane stabilizer (Herrero-Vanrell et al. 2013). The aqueous phase, as well as the core of the liposome, surrounds this lipid film and allows for the incorporation of hydrophilic active substances (Abal 2016). The main advantage of liposomes is their biodegradable and biocompatible nature and their good tolerability when they are topically applied on the ocular surface (Vicario-de-la-Torre et al. 2018). Moreover, liposomes have been widely used in ocular drug delivery due to their ability to entrap hydrophilic and lipophilic substances, as well as their ability to facilitate drug permeation through the cornea and conjunctiva, thus increasing its absorption (Gomez-Ballesteros et al. 2019). On the other hand, liposomes have been explored as vehicles to be included in artificial tears for the treatment of DED (Acar et al. 2018). Liposomes are commonly used for drug development, with egg and soy

phosphatidylcholine being well-tolerated (Lopez-Cano et al. 2021a). However, despite the advantages of soy-derived or lecithin products, their standardization is difficult. This disadvantage is overcome with the use of synthetic phospholipids, the main advantage of which is that they can be acquainted with their exact composition. Synthetic phospholipids have been used previously by several authors. One example is 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3- phosphocholine (DPPC), which was developed for the delivery of antibiotics and antiviral drugs for ocular surface pathologies (Fresta et al. 1999, Gonzalez Gomez et al. 2019). In addition, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) has also been included in ocular liposomal formulations and causes increased bioavailability of the drug compared with commercial formulations (Taha et al. 2014). Furthermore, DMPC has been used to develop emulsions for the treatment of dry eye with the aim of restoring the tear film and proved to be well-tolerated *in vitro* (Chavez-Hurtado et al. 2022). The synthetic phospholipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) has also been formulated in liposomes in order to provide an ocular anesthetic effect, showing good compatibility with corneal cells (Zhan et al. 2018). On the other hand, the inclusion of components, such as vitamin E and ubiquinol, with antioxidant properties, provide additional value to these types of preparations (Afri et al. 2004, Lopez- Cano et al. 2021a). All these facts reinforce the interest in developing liposomes, including synthetic phospholipids, with the aim of treating DED. Biocompatible polymers, such as hyaluronic acid (HA) and the cellulose derivatives hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and carboxymethylcellulose (CMC) (Jos e et al. 2018), have been widely used in topical ocular formulations to prolong residence time in the eye due to their ability to increase viscosity and gelling and the fact that they allow for interactions with the mucins of the tear film (mucoadhesive properties) (Partenhauser and Bernkop-schnu 2016). In addition, they are able to form a viscous layer that protects the ocular surface due to an increase in water retention, and in this way, they can avoid potentially harmful hypertonic environments (Lopez-Cano et al. 2021a). The use of cellulose derivatives has been reported to be beneficial in the treatment of DED by hindering tear evaporation and increasing tear film thickness (Jones et al. 2017). HMPC has been widely studied for its ability to increase retention time on the ocular surface and boost drug effectiveness when included in liposomal formulations (Gomez-Ballesteros et al. 2019). As mentioned above, hyperosmolarity has been found to play an important role in DED and tear hyperosmolarity has been associated with an increase in tear film instability (Liu et al. 2009, Essmer et al. 2013). Alan Tomlinson et al. reported that the

tear film osmolarity of patients with DED is 321.0 mOsm/L compared to values of 304.8 mOsm/L for healthy individuals (Tomlinson et al. 2006). Special attention has been given to the use of 'osmoprotectants' as a possible therapeutic strategy for restoring the homeostasis of the ocular surface. Examples of osmoprotective substances are erythritol, L-carnitine, and taurine (Corrales et al. 2008, Gomez-Ballesteros et al. 2019). L-carnitine and erythritol have been shown to inhibit *in vitro* production of MAP kinases and metalloproteases after the exposure of corneal cell cultures to hyperosmolar conditions (Corrales et al. 2008, Deng et al. 2014). Taurine is an amino acid found naturally in ocular tissues, such as the cornea, and tears that has been shown to have antioxidant and osmoprotective properties in DED models (Bucolo et al. 2018). Other osmoprotective substances are sugars or polyols, such as trehalose and ribitol, thanks to their ability to interact with water and prevent the formation of crystals (Tran et al. 2020, Lopez-Cano et al. 2021b). The aim of this work was to develop liposomal formulations from the synthetic phospholipids dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and dimyristoylphospha-tidylcholine (DMPC) that include osmoprotective active substances capable of improving DED symptoms and protecting the ocular surface. For this purpose, the formulations were evaluated for *in vitro* and *in vivo* tolerance in human corneal and conjunctival epithelial cells and in albino rabbits, respectively. In addition, an *in vitro* osmoprotection study was carried out using a previously developed hyperosmolar model, which has the advantage of detecting the osmoprotective activity of different substances via pre-treatment in corneal cells before subjecting them to hyperosmolar damage (Lopez- Cano et al. 2021b).

2 Materials and methods

2.1 Materials

DOPC and DMPC were supplied by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Cholesterol (99%), a-Tocopherol acetate (96%), ribitol (Adonitol, 99%), taurine (99%), ubiquinol (USP reference standard), boric acid (H3BO3, 99.5%), sodium tetraborate (Na2B4O7, 99.5%), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], trypan blue, dimethyl sulfoxide (DMSO), trypsin-EDTA 0.05%, gelatine 2% solution, sodium chloride (NaCl), and sodium chloride solution 5 M were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain).

EpiLifeVR, EDGSVR, and defined trypsin inhibitor were supplied by Life Technologies (Madrid, Spain). Foetal bovine serum was supplied by Thermo Fisher (Madrid, Spain).

2.2 Liposome preparation

To prepare the liposomal formulations, the lipid film hydration method described by Bangham et al. with some modifications was employed (Vicario-de-la-Torre et al. 2018). DOPC and DMPC were included in the lipid mixture for liposome formation (Table 1). Additionally, a-Tocopherol acetate (vitamin E) (VE), cholesterol (Ch), and ubiquinol (Ubiq) were included in the lipid layer. The weight ratio of DOPC:Ch:VE:Ubiq in formulations F1 and F2 was 8:1:0.08:0.02, whereas for F3 and F4 the weight ratio of DOPC:DMPC:Ch:ViE:Ubiq was 6:2:1:0.08:0.02. The lipid components were dissolved in 25 ml of chloroform and taken to the rotary evaporator (Buchi R-205, Masso Analytica S.A., Espana) under reduced pressure for 1 h at 33 ~ ºC (100 and 50 mPa during 30 min each). After that, nitrogen was used to remove the remaining chloroform. Subsequently, the lipid film was dispersed in the aqueous phase and a maturation time of 2 h was allowed at room temperature. Moreover, the liposomal dispersion was sonicated in an ultrasound bath (BandelinVR Sonorex Digiplus, DL 510 H, Berlin, Germany) for 15 min, and the sizes were homogenized by extrusion at room temperature (25 ºC) using 0.8 and 0.2 mm filters (10 extrusion cycles for each size). Finally, the developed liposomal formulations contained 10 mg/mL of phospholipid concentration. The composition of the aqueous dispersion included H3BO3 0.838%, Na2B4O7 0.755%, ribitol 0.5%, and taurine 0.5%. The final formulations were obtained by 1:1 dilution with the previously mentioned solution with or without hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). In the case of formulations F1 and F3, the dilution was performed with the same aqueous phase. For formulations F2 and F4, the dilution was performed with a 0.4% HMPC solution included in the same aqueous buffer, giving a final HPMC concentration of 0.2%. Optimal concentrations of all the substances were selected according to the mechanical characteristics (ability of the liposomes to pass through the extruder filter membranes), desired osmolarity of the aqueous phase (lower than isotonicity), and *in vitro* tolerability.

Table 1. Composition of the different liposomal formulations prepared (F1–F4). All formulations contained the following active compounds: 0.5% ribitol, 0.5% taurine, and 0.0025% ubiquinol. The DOPC:DMPC weight ratio is 3:1 in the F3 and F4 formulations and the HPMC concentration is 0.2% in the F2 and F4 formulations.

Formulation	Phospholipid	Polymer
F1	DOPC	-
F2	DOPC	HPMC
F3	DOPC: DMPC	-
F4	DOPC: DMPC	HPMC

2.3 Characterization

Prior to the selection of final formulations, the liposomes dispersed in borates buffer were visualized by cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM) (Figure 1). Cryo-TEM was used to check their formation as well as examine their structures and morphologies. In addition, Fiji ImageJ software was used to assess the size (n = 25) and thickness of the lipid bilayer (n = 35). Size measurement and size distribution of all final formulations was performed by dynamic light scattering with MicrotracVR S3500 Series (Montgomeryville, PA, USA).

The pH was measured with a pH-meter (model GLP-2, CRISON) calibrated with pH 4 and pH 7 standards. Osmolarity measurements were analyzed by a vapor osmometer (Knauer, model k-7000) after overnight stabilization. The formulations' surface tension values were acquired using a digital tensiometer K-11 (Kruss GmbH, Hamburg, Germany) based on the Wilhelmy plate method. Firstly, the equipment was calibrated using distilled water (68–72 mN/m) at 32 ºC (ocular surface temperature). The viscosity studies were performed using a Discovery HR-1 hybrid rheometer (New Castle, DE, USA) with a 60 mm parallel plate. Shear rates increasing from 0 to 1000 s^{-1} in 20 steps were used for viscosity measurement.

2.4 *In vitro* studies

2.4.1 Cell cultures

The immortalized human corneal epithelial cell line (hTERT-HCECs) (Evercyte GmbH, Vienna, Austria) was used for cell toxicity determination and osmoprotection assessment. The medium used for cell maintenance was EpiLife® supplemented with penicillin–streptomycin 1% and EDGS ®, which was changed every 2 days. Human epithelial conjunctival cells IM-HConEpiC (Innoprot, Bizkaia, Spain) were also employed to complement the cell toxicity determination. For conjunctival cells, an IM Ocular Epithelial Cell Medium Kit (Innoprot, Bizkaia, Spain) was used to maintain the cultures and was changed every 2 days. Cell cultures were maintained in a saturated humidified atmosphere at 37 ºC and 5% CO2. Subcultures were performed in T-75 flasks (Sarstedt, Madrid, Spain) when the cells reached 80–85% confluence. The flasks were coated with gelatine 2% solution when using hTERT-HCECs and with collagen for IM-HConEpiC using the Collagen I Coating Kit (1 mg/ ml) (Innoprot, Bizkaia, Spain). Then, cells were washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline and 0.005% trypsin-EDTA for 5 min to detach the cells. The trypsin was neutralized with trypsin inhibitor and the cells were centrifuged at 850 x g (5430 R Centrifuge, Eppendorf, Madrid, Spain) in a 15 ml tube made of polystyrene (Sarstedt, Madrid, Spain). The cell pellet was resuspended in culture medium and added to the flasks. Cell assays were carried out using passages between 5 and 15.

2.4.2 *In vitro* tolerance determination in human epithelial corneal and conjunctival cells

The cytotoxicity of all the formulations (F1-F4) was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Vicario-de-la-Torre et al. 2014). In these experiments, cell cultures were allowed to grow to 80–85% confluency and then cultured at 20,000 cells/well for corneal cells and 25,000 for conjunctival cells in 96-well plates. The selected exposure for the developed liposomal formulations was 1 h for short-time administration and 4 h to simulate a chronic topical treatment. hTERT-HCECs and IM-HConEpiC cells were incubated overnight and then exposed to different formulations (100 ml/well of the formulations plus 100 ml/well of culture medium). After exposure, the supernatants were discarded and 100 ml/well of

0.33 mg/mL MTT solution in culture medium was added and incubated for 1 or 4 h. Finally, the supernatant was removed and 100 mL/well of DMSO added to dissolve the formazan crystals formed by the MTT oxidation. The absorbances were measured on a spectrophotometer using a wavelength of 550 nm after gentle agitation for at least 5 min. As negative control, 0.9% sodium chloride was used, which was taken as 100% cell viability. On the other hand, 0.005% BAK, which has been employed as a preservative in topical ophthalmic formulations, showing poor tolerance and cell death, was used as a positive control. BAK has been reported by other authors to cause an increase in inflammatory markers in corneal and conjunctival cells (Epstein et al. 2009). In addition, it has been linked to the development of DED-related alterations in the cornea and conjunctiva (R. Zhang et al. 2019).

2.4.3 Osmoprotective studies by hyperosmolar stress simulation

Osmoprotection was performed in a previously developed hypertonic stress model in hTERT-HCECs (Lopez-Cano et al. 2021b). The mentioned model allows for the screening of topical ophthalmic formulations for the treatment of ocular surface diseases, especially DED. The osmoprotection capacity was assessed by exposure (with the formulations to be tested and a positive control) prior to a hyperosmolar scenario (16 h). A negative control (100% cell viability) was included in the model, which involved the absence of hyperosmolar stress (isotonic situation 290 mOsm/L). Briefly, 20 000 cells/well were seeded and incubated overnight in 96-well plates. Subsequently, the supernatants were aspirated, and the cells exposed to different developed formulations for 4 h (100 mL of medium + 100 mL of formulation in each well) to simulate a preventive treatment to tackle DED onset. After that, supernatants were removed, and previously treated cells and positive control were exposed to hyperosmolar conditions (470 mOsm/L for 16 h). The negative control was not subjected to hyperosmolar stress conditions; instead, it was exposed to isotonic conditions (NaCl 0.9%). Finally, the supernatants were discarded and 100 mL/well of 0.33 mg/mL MTT solution was added to determine cell viability as described in the previous section.

2.5 *In vivo* acute tolerance studies

In vivo studies were performed in New Zealand albino rabbits with an average weight of 3.5 kg (San Bernardo Farm, Navarra, Spain). The animals were kept at room temperature (22–25 ºC) in a relatively humid controlled atmosphere (50%) with a 12-h light cycle. All the procedures followed the European Union regulations for the use of research animals, the Statement for the Use of Animals in Ophthalmic Vision Research in ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) (The Association for Research in Vision and Ophthalmology n.d.), the European Communities Council Directive (86/609/EEC), and the Spanish Regulation of Experimental Studies with Animals (RD 53/2013 1 February modified by the RD 118/ 2021 23 February). The protocol code was PROEX 091.5/21 (24/02/2021). The acute tolerance assay assumes a high danger situation and has been used by several authors (Contreras-Ruiz et al. 2010, Zhang et al. 2021). Briefly, 25 ml of each formulation was instilled into the left eye of six male New Zealand albino rabbits. The right eye was established as the negative control (NaCl 0.9% solution). Topical administration was carried out every 30 min for 6 h. Signs of discomfort, secretions, swelling and alterations in the cornea and conjunctiva were evaluated at the beginning of the study and at 3, 6, and 24 h after the first administration. To determine the ocular tolerance, a macroscopic observation was performed. The evaluation was carried out following the grades described in the OECD Guidelines (OECD 2021) and the protocol described by Enrı et al. (2006) with some modifications (Table 2) (Gomez- Ballesteros et al. 2019).

Table 2. Macroscopic evaluation criteria for ocular tolerability studies.

Grade	Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
0	No reaction	Unaltered	Unaltered	No discharge	No swelling
1	Flicker	Opacity moderate	Hyperemia moderate Edema moderate	Secretion mild without hair moistened	Inflammation moderate
2	Flicker increased Tearing intense Vocalization	Opacity intense	Hyperemia intense Edema intense Hemorrhage	Secretion intense with hair moistened	Inflammation intense

2.6 Data analysis

Statistical treatment was performed using GraphPad software Inc. Prism Version 8.0.2, US with an ordinary one-way ANOVA test with Sidak's multiple comparisons test to specify the statistical significance ($\alpha \leq 0.05$). All results used to perform statistical significance were performed at least in triplicate and are displayed as mean ± SD.

3 Results

3.1 Morphological studies and physicochemical characterization

Once liposomes were formed, their structure and morphology were verified, and the final formulations were prepared and characterized (Table 4).

Liposomes dispersed in borates buffer visualized by cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM) (Figure 1) showed a lipid vesicle size (n=25) smaller than 200 nm for the formulations containing dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and DOPC combined with dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) (166.99 ± 25.15 and 184.40 ± 10.04 nm, respectively). In the case of lipid film thickness (n=35), no significant differences were found between formulations (6.58 ± 1.03 and 6.53 ± 0.71, respectively, $p>0.05$ in all cases) (Table 3).

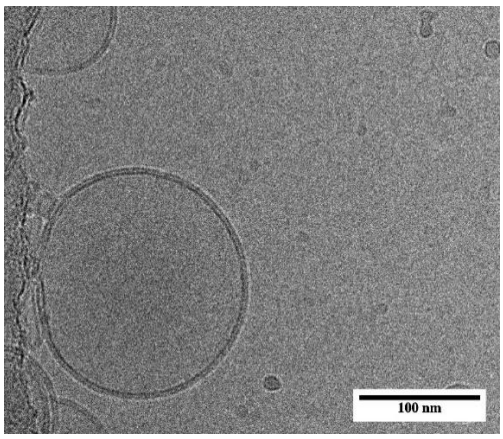

Figure 1. Representative image of a liposome composed of DOPC, DMPC, cholesterol, vitamin E, and ubiquinol dispersed in a borates buffer and visualized by Cryo-TEM.

Table 3. Liposome size and lipid bilayer thickness expressed as mean ± standard deviation. Liposomes also contain cholesterol, vitamin E, and ubiquinol.

Liposome composition	Size (nm)	Bilayer thickness (nm)
DOPC[1]	166.99 ± 25.15	6.58 ± 1.03
DOPC+DMPC[1]	184.40 ± 10.04	6.53 ± 0.71

The particle size distribution was unimodal in all formulations (Figure 2), with a slight increase in size observed in the formulations containing HPMC, probably due to the vesicles being coated with polymer (Figure 2) (Refai et al., 2017). The final formulations containing only DOPC resulted in sizes of 153.80 ± 55.63 without polymer and 196.10 ±

59.53 with HPMC, while those belonging to the formulations containing a mixture of DOPC and DMPC were 178.30 ± 47.78 and 209.37 ± 84.20 when HPMC was added (Table 4). Liposomes containing only DOPC exhibited smaller sizes, which means, according to the literature, greater curvature than those containing DOPC and DMPC (Yamauchi et al., 2007).

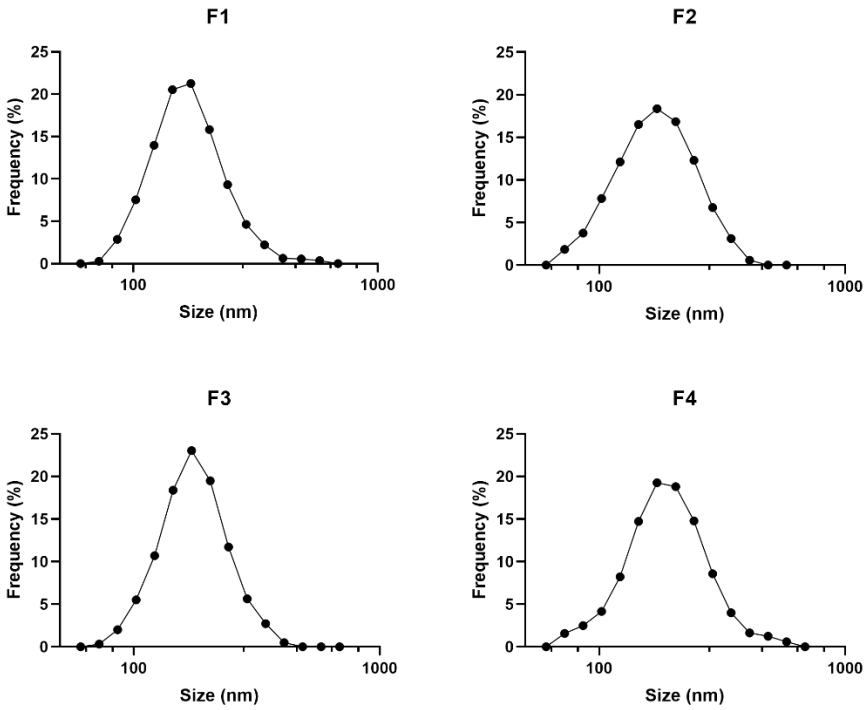

Figure 2. Size distribution of liposomal formulations (F1-F4) represented on a semi-logarithmic scale.

All formulations showed neutral pH values (≈7) and hypotonic values of osmolarity, which are potentially favorable for the treatment of hypertonicity produced in DED (Table 4). Regarding surface tension, all values obtained were lower than those presented on the ocular surface (43.6 ± 2.7 mN/m in healthy individuals and 49.6 ± 2.2 mN/m in DED patients) (Willcox et al., 2017).

The viscosity values of the liposomal formulations were within the range of tear viscosity values (1-8.3 mPa·s) (López-Cano, González-Cela-Casamayor, Andrés-Guerrero, Herrero-Vanrell, & Molina-Martínez, 2021). Formulations without polymer addition

were similar to water (≈1 mPa·s). As expected, those containing HPMC had higher viscosity values (≈3.4 mPa·s) (Table 4).

Table 4. Physicochemical characterization of the different liposomal formulations (F1-F4). Data are represented as mean ± standard deviation (n=3). F1: DOPC (10 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%; F2: DOPC (10 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%, HPMC 0.2%¸ F3: DOPC (7.5 mg/mL), DMPC (2.5 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%; F4: DOPC (7.5 mg/mL), DMPC (2.5 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%, HPMC 0.2%.

	F1	F2	F3	F4
Size (nm)	153.80 ± 55.63	196.10 ± 59.53	178.30 ± 47.78	209.37 ± 84.20
pH	7.02 ± 0.01	6.92 ± 0.01	7.05 ± 0.01	6.93 ± 0.02
Osmolarity (mOsm/L)	220.67± 0.58	229.00 ± 1.00	223.00 ± 1.00	220.67 ± 0.58
Surface tension (mN/m)	26.83 ± 1.10	42.50 ± 6.05	27.67 ± 1.36	41.87 ± 0.90
Viscosity (mPa·s)	1.07 ± 0.025	3.39 ± 0.025	1.07 ± 0.001	3.49 ± 0.023

3.2 *In vitro* tolerance studies

3.2.1 Preliminary studies for the selection of components

Prior to the selection of the potential therapeutic substances to be included in the liposomal vesicles, the *in vitro* toxicity of each compound included in the liposomes was

separately tested by the MTT method in human corneal epithelial cells (hTERT-HCECs) (Figure 3).

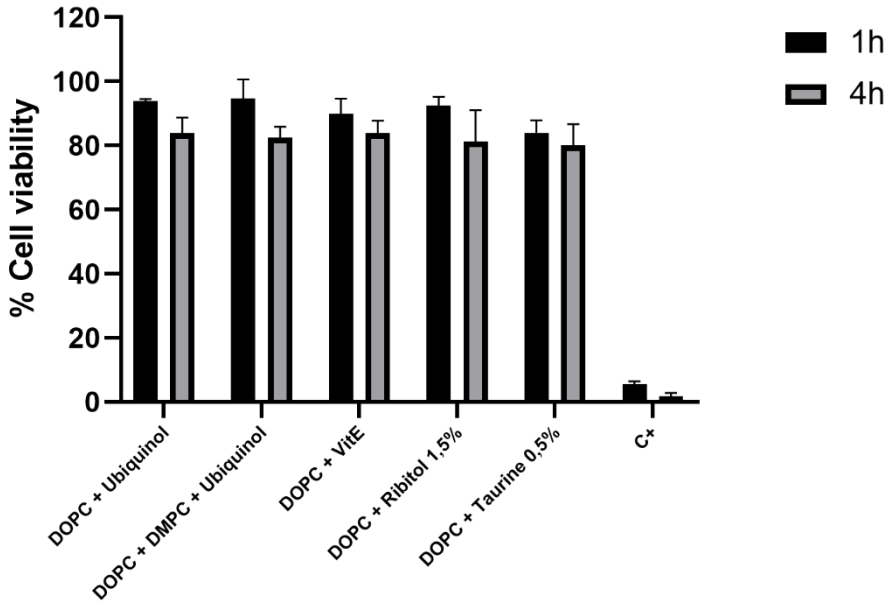

Figure 3. *In vitro* toxicity evaluation at 1 and 4 hours in hTERT-HCECs cells of liposomal components. In all cases, the DOPC concentration was 10 mg/mL. Ubiquinol was tested at 0.05 mg/mL, and vitamin E at 0.15 mg/mL. C+: 0.005% BAK.

Ubiquinol (0.05 mg/mL) did not provide any toxicity in liposomes made with DOPC. Similar results of cell viability were obtained when ubiquinol was included in liposomes made with a mixture of DOPC and DMPC. As the DOPC and the mixture DOPC/DMPC liposomes behaved similarly in terms of cytotoxicity, the rest of the components were tested in DOPC liposomes. The antioxidant vitamin E (0.15 mg/mL) and osmoprotective compounds (ribitol 1.5 % and taurine 0.5 %) in the vesicles made with DOPC did not cause cytotoxicity after 1 and 4 hours of exposure (>80% in cell viability in all cases). As ubiquinol, vitamin E, ribitol, and taurine at the concentrations assayed were well tolerated, these substances were chosen as essential components to be included in the liposomal formulations.

The concentration of each essential component in the liposomal formulations (vitamin E 0.1 mg/mL, ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5% and ribitol 0.5%) was selected

according to the mechanistic characteristics and the desired osmolarity, as described in the Section 2.2. Technological aspects were considered where necessary.

Taurine is an amino acid that has been shown in studies on corneal cells to possess osmoprotective activity at 0.5% (Corrales et al., 2008), so it was decided to use it at this concentration. Ribitol at 0.5% was employed to adjust the osmolarity of the aqueous phase as this sugar has also been shown to exhibit osmoprotectant activity (Singh et al., 2015; Tran et al., 2020). The antioxidants vitamin E and ubiquinol were included at concentrations of 0.1 and 0.025 mg/mL, respectively, as higher concentrations hinder the formation of liposomes with the method used in this work.

3.2.2 *In vitro* tolerance evaluation in hTERT-HCECs and IM-HConEpiC cells

Prior to acute *in vivo* tolerance studies, *in vitro* tolerance tests in hTERT-HCECs human corneal cells (Figure 4) and IM-HConEpiC human conjunctival cells (Figure 5) was performed.

Regarding to the *in vitro* tolerance (Figure 4), after one hour of exposure in hTERT-HCECs cells, all liposomal formulations showed cell viability values above 80% (F1: 86.70%, F2: 88.60%, F3: 80.02% and F4: 91.52%) and greater than 70% after 4 hours of exposure (F1: 73.20%, F2: 86.70%, F3: 79.44% and F4: 88.36%) using 0.9% NaCl as a negative control (established as 100% cell viability). As shown, cell viability was improved with the addition of HPMC polymer (F2 and F4), reaching cell viability values above 88% and 86% after 1 and 4 hours of exposure, respectively (Figure 4). Some tendency can also be observed between F1 and F3 at 4 hours, suggesting better tolerance when phospholipids are combined, despite the fact that it is not statistically significant.

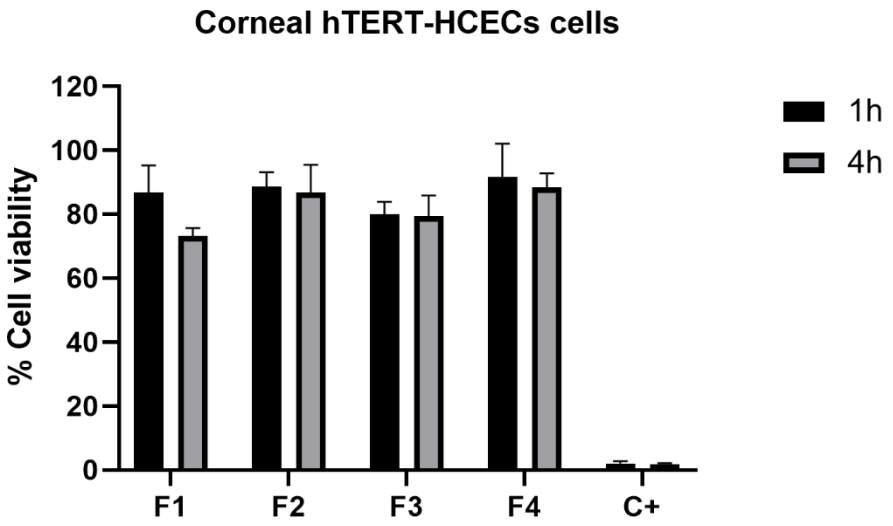

Figure 4. *In vitro* toxicity evaluation in hTERT-HCECs cells of liposomal formulations (F1-F4) after 1 and 4 hours of exposure. F1: DOPC (10 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%; F2: DOPC (10 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%, HPMC 0.2%¸ F3: DOPC (7.5 mg/mL), DMPC (2.5 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%; F4: DOPC (7.5 mg/mL), DMPC (2.5 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%, HPMC 0.2%; C+: 0.005% BAK.

Experiments in human conjunctival cells (IM-HConEpiC) were performed similarly to the ones performed with corneal cells; 0.9% NaCl was established as 100% cell viability (negative control) and 0.005% BAK was employed as a positive control. IM-HConEpiC cells after one hour of exposure to all liposomal formulations showed cell viability values above 90% after 1 (F1: 91.87 ± 2.96%, F2: 95.46 ± 4.78%, F3: 92.08 ± 1.43% and F4: 94.72 ± 4.27%) and 4 hours (F1: 92.20 ± 1.45%, F2: 93.94 ± 1.94%, F3: 90.83 ± 0.99% and F4: 91.01 ± 1.11%) of exposure (Figure 5), while 0.005% BAK showed cell viability values below 25% after 1 hour of exposure and below 5% after 4 hours of exposure. No differences were observed between formulations.

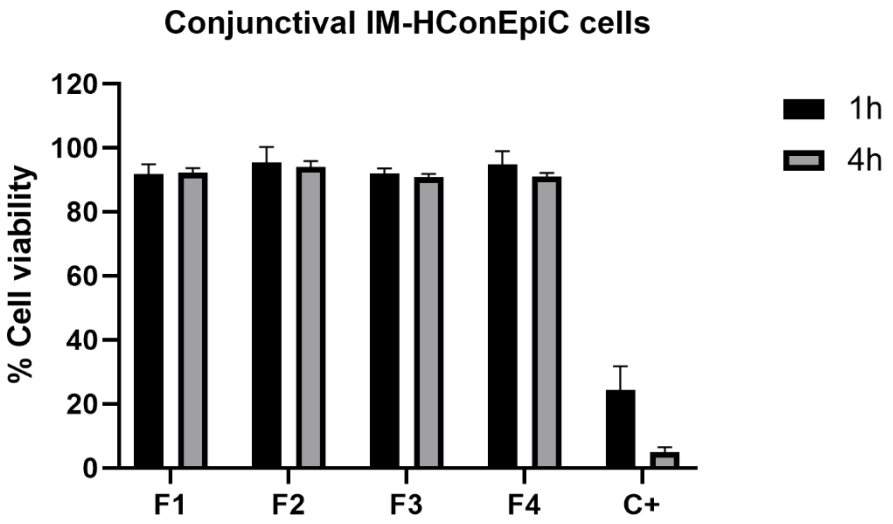

Figure 5. *In vitro* toxicity evaluation in IM-HConEpiC cells of all liposomal formulations (F1-F4) after 1 and 4 hours of exposure. F1: DOPC (10 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%; F2: DOPC (10 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%, HPMC 0.2%¸ F3: DOPC (7.5 mg/mL), DMPC (2.5 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%; F4: DOPC (7.5 mg/mL), DMPC (2.5 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%, HPMC 0.2%; C+: 0.005% BAK.

3.2.3 Osmoprotective studies

The osmoprotective studies were performed in a stressed human corneal epithelial cell hyperosmolarity model previously described (López-Cano, González-Cela-Casamayor, Andrés-Guerrero, Herrero-Vanrell, Benítez-Del-Castillo, et al., 2021). In this model, the exposure of hTERT-HCECs cells to a 470 mOsm/L solution for 16 hours was found to reduce cell viability to values lower than 35%, correlating with flow cytometry results showing an increase in early and late cell apoptosis. The use of such a hyperosmolar concentration is sensitive to small changes, so osmoprotective effects can be evaluated (López-Cano, González-Cela-Casamayor, Andrés-Guerrero, Herrero-Vanrell, Benítez-Del-Castillo, et al., 2021).

From this model, it was obtained a relevant increase in cell viability when the cells were pre-exposed (for only 4 hours) to the formulations before being subjected to the stressful

condition of hyperosmolarity (470 mOsm/L). The results obtained with all the formulations tested (F1-F4) show a highly significant ($p<0.0001$) increase in cell viability (Figure 6) when compared to the positive control (pre-exposed to 0.9% NaCl), proving the osmoprotective effect caused by the prevention of cell death.

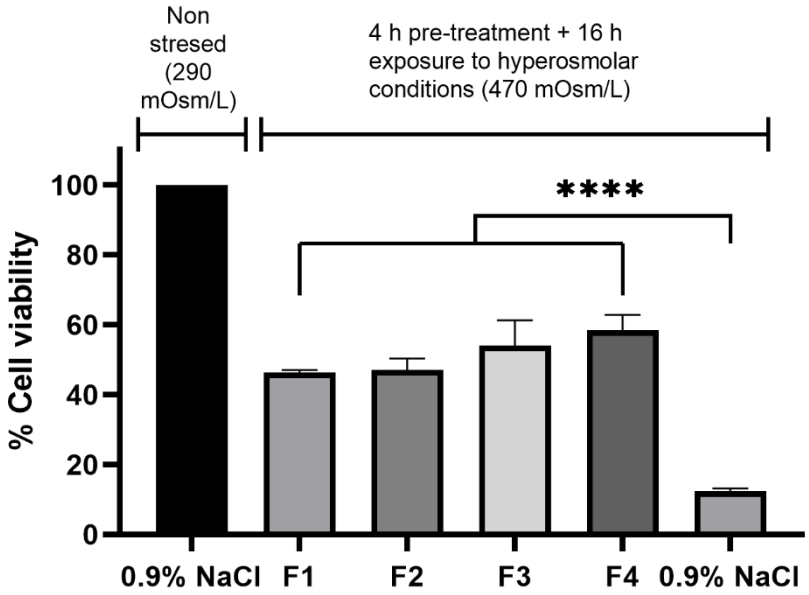

Figure 6. Osmoprotective effect of liposomal formulations after liposome pre-incubation (4 hours) and chronic exposure to 470 mOsm/L in hTERT-HCECs cells for 16 hours (****$p<0.0001$). F1: DOPC (10 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%; F2: DOPC (10 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%, HPMC 0.2%¸ F3: DOPC (7.5 mg/mL), DMPC (2.5 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%; F4: DOPC (7.5 mg/mL), DMPC (2.5 mg/mL), vitamin E 0.1 mg/mL ubiquinol 0.025 mg/mL, taurine 0.5%, ribitol 0.5%, HPMC 0.2%.

The viability data after 470 mOsm/L exposure for each formulation were as follows: F1 (46.32 % ± 0.73), F2 (47.04% ± 3.32), F3 (54.02% ± 7.26), F4 (58.42% ± 4.38), and 0.9% NaCl (12.38% ± 0.86) compared to the 100% cell viability of the non-hyperosmolar stressed condition (Negative control). From these results, it can be established that treatment with F1–F4 increases cell survival by 33.94% (F1), 34.66% (F2), 41.64% (F3), and 46.04% (F4) compared to control (pre-exposure with 0.9% NaCl).

Liposomal formulation F4 (including DOPC and DPMC) showed significantly higher ($p<0.01$) osmoprotective activity than formulations F1 and F2 (prepared from DOPC). Additionally, no statistical differences were found between F3 and F4 ($p > 0.05$), indicating the benefit of the combination of DOPC and DMPC. There was also a slight difference between the polymer-free formulations (F1 and F3). With regard to these findings, F3 slightly outperformed F1, although the differences between them were not significant ($p > 0.05$).

3.3 *In vivo* acute tolerance studies

The macroscopic examination of all the rabbit eyes (n=6) prior to the instillation of developed formulations (t=0) showed no pathological changes, transparent corneas, and normal coloration of the conjunctiva. In addition, discharge, eyelid swelling, and discomfort were not reported.

Formulations F1 to F4 were topically administered on the left eye of six rabbits every 30 minutes for 6 hours (12 instillations). The results showed that the cornea and conjunctiva remained unaltered during the time of the assay (Figure 7) and the subsequent days. It was also observed no discomfort, inflammation, or discharge during the experiment; thus, all the parameters were assessed as grade 0 for all the formulations after 24 hours (Table 5) according to the reference used for the evaluation described in Section 2.5.

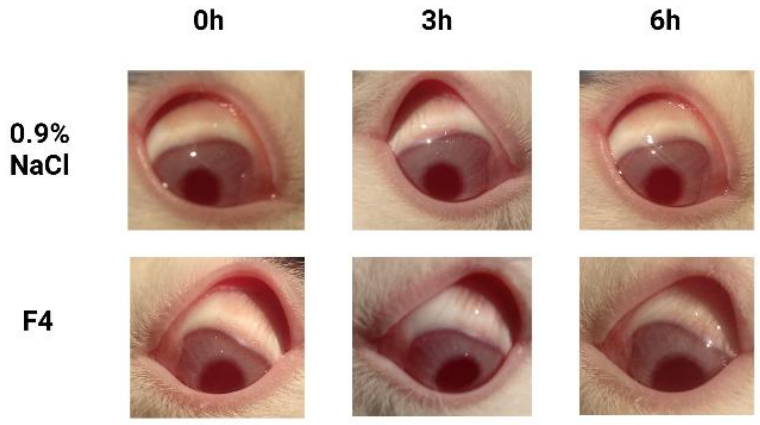

Figure 7. *In vivo* acute tolerance example of the liposomal formulation F4 during the instillation time.

Table 5. Macroscopic evaluation (grade 0–2) of *in vivo* tolerance in normotensive albino New Zealand rabbits 24 hours after first instillation.

Formulation	Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
F1	0	0	0	0	0
F2	0	0	0	0	0
F3	0	0	0	0	0
F4	0	0	0	0	0

In addition, there was no difference between the topical administration of the formulations and the negative control (0.9% NaCl). The results obtained show good *in vivo* acute tolerance of the osmoprotective liposomal formulations on the ocular surface in rabbits. These data could be extrapolated to humans, as good concordance has been demonstrated when the study is performed with small volumes of instillation on the ocular surface (Freeberg et al., 1986).

4 Discussion

Over the last few years, the use of liposomes in artificial tears has been studied as an interesting potential DED treatment (Jones et al., 2017). Liposomes have shown the ability to supplement the lipid layer of the precorneal tear film, preventing tear evaporation (Garrigue et al., 2017; López-Cano, González-Cela-Casamayor, Andrés-Guerrero, Herrero-Vanrell, & Molina-Martínez, 2021). Currently, there are some marketed artificial tears containing liposomes, such as Aquoral Lipo® (Esteve, Farmigea, Pisa, Italy) or Lacrisek® Ofta (Bioos Italia, Italy), which have widely demonstrated their effectiveness in the treatment of DED compared to non-liposomal formulations (Garrigue et al., 2017; Meng et al., 2019). Liposomes are usually prepared with egg and soy phosphatidylcholine (Garrigue et al., 2017; López-Cano, González-Cela-Casamayor, Andrés-Guerrero, Herrero-Vanrell, & Molina-Martínez, 2021). Phosphatidylcholine is one of the components of the preocular tear film and is well tolerated (Acar et al., 2018; Vicario-de-la-Torre et al., 2018). Despite their advantages, their standardization results

in complications due to the variety of fatty acids and phospholipids of the soy-derived or lecithin products. This does not occur with synthetic phospholipids that can be acquainted with their exact composition. In this sense, phosphatidylcholine extracted from natural sources presents variability in the mixture of fatty acids in each batch and may present slight differences in their properties. However, synthetic phospholipids are manufactured in order to adjust the composition of the chains, thus avoiding this inconvenient (Eibl & Kaufmann-Kolle, 1995) (Anderson & Omri, 2004). A large number of synthetic phospholipids have been used, such as the negative one DOPG (Wendy B. Bollag, Lawrence O. Olala, Ding Xie, Xiaowen Lu, Haixia Qin, Vivek Choudhary, Rachana Patel, David Bogorad, Amy Estes, 2020), and other neutral synthetic phospholipids, such as DOPC and DMPC (Stoll et al., 2012)(Gulsen et al., 2005).

In the present work, DOPC and DMPC were selected due to their well-defined phospholipid characterization. As previously mentioned, DOPC and DMPC have already been tested for ocular surface application formulations. DOPC has a transition temperature (approximately −16.5 °C) similar to soy phosphatidylcholine (Attwood et al., 2013), while DMPC has a transition temperature of approximately 22.5 °C (Chen et al., 2018). It is well known that phospholipids become rigid in what is called a “gel” state when they are below their transition temperature. However, when the transition temperature is raised above these temperatures, they become fluid, achieving a “sol” state with increased permeability (Chen et al., 2018). Therefore, it was hypothesized that DMPC addition would increase the transition temperature of any phospholipid mixture, which would bring it closer to the “gel” state. That is the reason why it was thought that the stability of DOPC+DMPC liposomes would be enhanced. Interestingly, in this work is also demonstrated that the use of synthetic phospholipids rather than phosphatidylcholine derived from natural sources did not alter liposome formation and that the presence of liposomal vesicles was confirmed as is shown in Figure 1. In addition, the *in vitro* tolerance studies confirmed their biocompatibility, just like those prepared with other types of phosphatidylcholine (Vicario-de-la-Torre et al., 2014). Moreover, the desired sizes and physicochemical characteristics were maintained (Table 4).

Vitamin E was added to the formulations, since it has been widely studied due to its antioxidant properties and ability to protect the phospholipids present in the formulation (Gómez-Ballesteros et al., 2019). Ubiquinol was selected for its antioxidant ability to

counteract the effect of oxidative stress in corneal cells, as other researchers have reported (Naguib et al., 2021; Schniertshauer et al., 2020).

The aqueous vehicle used was carefully selected. Firstly, to make the formulation suitable for ocular topical administration, a borate buffer was employed, which is able to keep the pH at physiological conditions (≈7-7.4). Moreover, this buffer has previously been employed for its preservative and antimicrobial activity (Houlsby et al., 1986).

Ribitol and taurine, previously studied for their osmoprotective activity, were included in the developed liposomal formulations as osmoprotective substances, with the expectation that they would contribute to reducing the damage caused by the hypertonic conditions (Acar et al., 2018; Vicario-de-la-Torre et al., 2018). As mentioned above, hyperosmolarity plays an important role in DED, so the addition of osmoprotective compounds would be an advantage for its treatment. Hyperosmolar conditions in DED caused by deficient tear production or tear evaporation (Loss, 2009) can lead to an increase in matrix metalloproteinases and inflammatory cytokine expression (Li et al., 2006). The presence of hyperosmolarity will also cause an increase in apoptosis in corneal and conjunctival cells on the ocular surface. Cell damage and inflammatory processes result in damage to the corneal epithelium (Essmer et al., 2013) (Luo et al., 2007). Taurine has been shown in other studies to significantly decrease the production of metalloproteases, in particular metalloprotease 9 produced by hyperosmolar stress in corneal epithelial cells, as well as providing antioxidant activity, resulting in a promising active compound (Bucolo et al., 2017). Ribitol has also been described as having a cryoprotective effect (Hájek et al., 2009). Furthermore, to increase the viscosity and improve the residence time on the ocular surface, the mucoadhesive polymer HPMC was added. Previous studies have shown that the addition of HPMC in liposomal formulations generates an increment in the bioavailability of active substances in comparison with liposomes without mucoadhesive substances (Gómez-Ballesteros et al., 2019). In addition, in other studies conducted the osmoprotective and anti-inflammatory activity of HPMC has also been reported (López-Cano, González-Cela-Casamayor, Andrés-Guerrero, Herrero-Vanrell, Benítez-Del-Castillo, et al., 2021). Despite this, with regard to the findings when HPMC was added to the liposomal formulations a significant increase in the osmoprotective activity was not observed. This may be explained due to the high osmoprotective activity provided by taurine and ribitol, which were also included in the formulations. It should be noted that in studies carried out by our group with this

liposome manufacturing method, the determination of phosphatidylcholine by colorimetric titration has been carried out, showing a maintenance of the concentration of the phospholipid fraction of the liposomal formulation (Vicario-de-la-Torre et al., 2014). In addition, our group has carried out studies on the recovery of the lipid fraction after liposome preparation by the determination of vitamin E by HPLC (María Ángela Caballo González, 2020). These studies confirm that our preparation method allows maintenance of the phospholipid concentration added in the final liposomal formulation.

According to the physicochemical properties evaluated in this work (osmolarity, pH, surface tension and viscosity), the formulations were within the scope for ocular topical administration and had suitable properties (viscosity and surface tension) for desirable spreading on the ocular surface (Table 4). Sizes close to 200 nm allow for the evasion of phagocytosis and greater uptake by the ocular surface cells, improving drug delivery and decreasing immunogenicity (Gómez-Ballesteros et al., 2019). In addition, the pH of the formulations was neutral and the osmolarity was within hypotonicity, helping reduce the damage caused by the hypertonic environment of the DED. Moreover, liposomal formulations maintained their physicochemical characteristics unaltered for at least 8 weeks when kept refrigerated (4ºC) as shown by stability studies previously carried out by our group (Vicario-de-la-Torre et al., 2018). In another study carried out during 12 months, refrigerated formulations demonstrated to maintain adequate characteristics throughout the study (María Ángela Caballo González, 2020).

In the present work, the three R principle, formulated by Rex Burch and William Russell, was followed. This principle calls for replacement, reduction, and refinement in the conduct of animal studies (Hubrecht & Carter, 2019). Therefore, prior to *in vivo* tolerance all the formulations were tested *in vitro* using human ocular surface cells, such as human corneal and conjunctival cells. This allowed us to select candidate formulations for *in vivo* testing. These tests allowed to discard formulations that did not meet the criteria and to select the formulations presented in the article for *in vivo* studies. This protocol allowed for a significant reduction in the number of animals used for experiments.

In terms of *in vitro* tolerance, after 1 hour of exposure of corneal epithelial cells to formulations, cell viability values were above 80% in all cases, suggesting good *in vitro* ocular surface tolerance. These findings suggested acceptable *in vitro* tolerability according to OECD guidelines for the *in vitro* testing of chemicals (OECD Guidelines for

the Testing of Chemicals, n.d.). According to some authors, formulations applied topically to the ocular surface have a rapid elimination time, setting the turnover rate for 16% of tear film in only one minute (Davies, 2000; Grassiri et al., 2021). In the present studies, experiments were carried out within 4 hours of exposure in order to simulate ocular topical chronic exposure. This methodology was previously used in studies with other topical ophthalmic formulations (Vicario-de-la-Torre et al., 2014). Selected formulations exhibited cell viability values above 70% after 4 hours exposure in all cases. The results obtained suggested no toxicity when the formulations are instilled.

Interestingly, cell viability in corneal cells increased with the use of the mucoadhesive polymer HPMC in both F1 (DOPC) and F3 (DOPC+DMPC) formulations, from 73.20% to 86.70% and 79.44% to 88.36%, respectively. These results are consistent with other authors' findings regarding the protective activity of HPMC in corneal (Shahraki et al., 2016) and conjunctival cells (Ye et al., 2012). This property, together with the ability of HPMC to increase retention time on the ocular surface (Gómez-Ballesteros et al., 2019), make the F2 and F4 formulations potentially promising as artificial tears for the treatment of DED. Cell viability results in human conjunctival cells (IM-HConEpiC) also showed good *in vitro* tolerance, with viability values above 90% after 1 hour and 4 hours of exposure. Good cell viability results in corneal and conjunctival cells offer numerous advantages, as cornea and conjunctiva are important constituents of the ocular surface (Cher, 2014). In addition, as explained above, the hyperosmolarity and inflammation produced in dry eye damages both cell types (Essmer et al., 2013).

The osmoprotection studies in human corneal cells were carried out in an *in vitro* chronic hyperosmolar model previously developed by our group (López-Cano, González-Cela-Casamayor, Andrés-Guerrero, Herrero-Vanrell, Benítez-Del-Castillo, et al., 2021), As previously discussed in Section 3.2.3 above, this model is capable of estimating the protective activity of a formulation against a situation of hypertonic stress (470 mOsm/L) by evaluating the increase in cell viability compared to a non-osmoprotective solution used as a positive control (NaCl isotonic solution). The use of such an aggressive hyperosmolar concentration is sensitive to small changes in cell viability, thus allowing for the assessment of osmoprotective effects. The formulations developed in the present work produced an increase between 33% and 47% in cell survival with respect to the positive control (0.9% NaCl), which already implies a significant cell protection that, in chronic treatments, as in the case of artificial tears, would be even more effective.

In this sense, all the developed formulations demonstrated osmoprotective activity against a hyperosmolar environment, with those formulations combining the synthetic phospholipids (F3 and F4) exhibiting high effectiveness, the one containing the polymer (F4) in particular, which showed an increase in cell viability after hyperosmolar stress of 46.06% with only 4 hours of pre-treatment, compared to 0.9% NaCl (58.42% ± 4.38 cell viability for F4 vs. 12.38% ± 0.86 for 0.9% NaCl).

These promising results suggest that the formulations are suitable candidates for ameliorating DED symptoms and counteracting hypertonic stress. Moreover, although all formulations were highly effective in protecting against hypertonic stress-induced cell death, F4 could entail a novel strategy to treat DED symptoms due to its high effectiveness and mucoadhesive properties thanks to the inclusion of HPMC. As it can be seen in the results, the F4 liposomal formulation is the one that conferred the highest protection against the damage produced by hyperosmolarity, although the increase is not statistically significant compared to the other formulations (Figure 6). This may be due to the combined addition of the osmoprotectants ribitol and taurine and the polymer HPMC, which, as explained above, has protective activity on the ocular surface. Moreover, as an additional advantage the combination of two different phospholipids could contribute to increase precorneal tear film stability by enriching lipid tear film with different lipid profiles (myristic- and oleic-based phosphatidylcholines).

In vivo acute tolerance experiments in rabbits demonstrated no discomfort or damage to the cornea or conjunctiva. These results are encouraging since no signs of toxicity are shown and this is consistent with previous studies of different liposomal formulations (Vicario-de-la-Torre et al., 2018), where another author demonstrated an absence of ocular disturbances and discomfort following the application of formulations made with soy phosphatidylcholine (Gómez-Ballesteros et al., 2019). These results could be extrapolated to humans due to the concordance when the study is performed with small volumes of instillation on the ocular surface (Freeberg et al., 1986).

5 Conclusions

To conclude, the liposomal formulations developed containing the synthetic phospholipids 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) have suitable physicochemical properties for topical ophthalmic administration, as well as good extensibility and retention time. These findings suggest good tolerability *in vitro* and *in vivo* of the formulations and high effectiveness against *in vitro* hyperosmolar conditions in DED patients caused by the presence of osmoprotective substances. Finally, regarding formulation F4, it seems to provide appreciable advantages over the other formulations tested and would be a potential alternative for the treatment of DED and other ocular surface diseases that lead to hyperosmolarity.

Funding

This work was supported by the European funding Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER-CICYT), under Grant FIS-PI17/00079 and PI17/00466, Research Group UCM 920415 'Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development in Ophthalmology (InnOftal),' and the ISCII FEDER RETICS (OFTARED) under Grant RD16/0008/0004 and RD16/ 0008/0009.

Acknowledgments

M.A.G.-C. thanks the Spanish MECD (FPU18/03445) for a PhD fellowship. We acknowledge Rocio Arranz and Francisco Javier Chichon for their support within the access to the cryoEM CNB-CSIC facility in the context of the CRIOMECORR project (ESFRI-2019–01-CSIC-16).

Figure 7 was created with BioRender (www.biorender.com).

6 Supplementary Materials

Table S1. *In vivo* ocular tolerance evaluation (Grade 0-2) in albino New Zealand albino rabbits for F1 formulation

Animal #	Eye	Formulation	Before instillation				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	R	NaCl 0.9%	0	0	0	1	0
	L	F1	0	0	0	1	0
#2	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0
#3	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0
#4	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0
#5	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0
#6	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	3 hours after first instillation (6 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0
#2	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0
#3	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0
#4	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0
#5	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	1	0
#6	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F1	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	6 hours after first instillation (12 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F1**	0	0	0	1	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	24 hours after first instillation (12 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F1**	0	0	0	1	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F1**	0	0	0	0	0

Table S2. *In vivo* ocular tolerance evaluation (Grade 0-2) in albino New Zealand albino rabbits for F2 formulation

Animal #	Eye	Formulation	Before instillation				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	1	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	3 hours after first instillation (6 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	1	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	6 hours after first instillation (12 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	24 hours after first instillation (12 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F2**	0	0	0	1	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F2**	0	0	0	0	0

Table S3. *In vivo* ocular tolerance evaluation (Grade 0-2) in albino New Zealand albino rabbits for F3 formulation

Animal #	**Eye**	**Formulation**	**Before instillation**				
			Discomfort	**Cornea**	**Conjunctiva**	**Secretion**	**Eyelids**
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F3**	0	0	0	1	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F3**	0	0	0	1	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	3 hours after first instillation (6 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	1	0	0	1	0
	L	**F3**	0	0	0	1	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	6 hours after first instillation (12 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F3**	0	0	0	1	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	24 hours after first instillation (12 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F3**	0	0	0	1	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F3**	0	0	0	0	0

Table S4. *In vivo* ocular tolerance evaluation (Grade 0-2) in albino New Zealand albino rabbits for F4 formulation

Animal #	Eye	Formulation	Before instillation				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	3 hours after first instillation (6 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	R	NaCl 0.9%	1	0	0	1	0
	L	F4	0	0	0	0	0
#2	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F4	0	0	0	0	0
#3	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F4	0	0	0	0	0
#4	R	NaCl 0.9%	0	0	0	1	0
	L	F4	0	0	0	0	0
#5	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F4	0	0	0	0	0
#6	R	NaCl 0.9%	0	0	0	0	0
	L	F4	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	6 hours after first instillation (12 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0

Animal #	Eye	Formulation	24 hours after first instillation (12 instillations)				
			Discomfort	Cornea	Conjunctiva	Secretion	Eyelids
#1	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#2	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#3	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#4	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	1	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#5	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0
#6	**R**	**NaCl 0.9%**	0	0	0	0	0
	L	**F4**	0	0	0	0	0

7 References

Abal, P. P. (2016). Pharmaceutical microscale and nanoscale approaches for efficient treatment of ocular diseases. Drug Delivery and Translational Research. https://doi.org/10.1007/s13346-016-0336-5

Acar, D., Molina-Martínez, I. T., Gómez-Ballesteros, M., Guzmán-Navarro, M., Benítez-del-Castillo, J. M., & Herrero-Vanrell, R. (2018). Novel liposome-based and in situ gelling artificial tear formulation for dry eye disease treatment. Contact Lens and Anterior Eye, 41(1), 93–96. https://doi.org/10.1016/j.clae.2017.11.004

Afri, M., Ehrenberg, B., Talmon, Y., Schmidt, J., Cohen, Y., & Frimer, A. A. (2004). Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer: Part III: Locating Vitamin E, ubiquinol and ubiquinone and their derivatives in the lipid bilayer. Chemistry and Physics of Lipids, 131(1), 107–121. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.04.007

Anderson, M., & Omri, A. (2004). The Effect of Different Lipid Components on the in Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents, 11(1), 33–39. https://doi.org/10.1080/10717540490265243

Attwood, S. J., Choi, Y., & Leonenko, Z. (2013). Preparation of DOPC and DPPC supported planar lipid bilayers for atomic force microscopy and atomic force spectroscopy. International Journal of Molecular Sciences, 14(2), 3514–3539. https://doi.org/10.3390/ijms14023514

Blalock, T. D., Spurr-Michaud, S. J., Tisdale, A. S., & Gipson, I. K. (2008). Release of membrane-associated mucins from ocular surface epithelia. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 49(5), 1864–1871. https://doi.org/10.1167/iovs.07-1081

Bron, A. J., de Paiva, C. S., Chauhan, S. K., Bonini, S., Gabison, E. E., Jain, S., Knop, E., Markoulli, M., Ogawa, Y., Perez, V., Uchino, Y., Yokoi, N., Zoukhri, D., & Sullivan, D. A. (2017). TFOS DEWS II pathophysiology report. Ocular Surface, 15(3), 438–510. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.011

Bron, A. J., Yokoi, N., Gaffney, E., & Tiffany, J. M. (2009). Predicted phenotypes of dry eye: Proposed consequences of its natural history. Ocular Surface, 7(2), 78–92. https://doi.org/10.1016/S1542-0124(12)70299-9

Bucolo, C., Fidilio, A., Bianca, C., Platania, M., Geraci, F., Lazzara, F., & Drago, F. (2017). Antioxidant and Osmoprotecting Activity of Taurine in Dry Eye Models. JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 00(00), 1–7. https://doi.org/10.1089/jop.2017.0008

Butovich, I. A., Millar, T. J., & Ham, B. M. (2008). Understanding and Analyzing Meibomian Lipids — A Review. 405–420. https://doi.org/10.1080/02713680802018419

Chandrinos, A., & Tzamouranis, D.-D. (2020). Dry eye, Contact lenses and Preservatives in Glaucoma Medication. The Clinical Ophthalmologist Journal, 1(1), 1003. https://doi.org/10.29011/2689-7407.100040

Chávez-Hurtado, P., Pesqueda-Pinedo, L., Ceballos-Delgadillo, H. A., Liñán-Segura, A., Figueroa-Ponce, H., & Quintana-Hau, J. D. (2021). Physicochemical characterization of a DMPC-based nanoemulsion for dry eye and compatibility test with soft contact lenses in vitro. Contact Lens and Anterior Eye, November 2020. https://doi.org/10.1016/j.clae.2021.02.014

Chen, W., Duša, F., Witos, J., Ruokonen, S. K., & Wiedmer, S. K. (2018). Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. Scientific Reports, 8(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33107-5

Cher, I. (2014). Ocular surface concepts: Development and citation. Ocular Surface, 12(1), 10–13. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2013.10.004

Contreras-Ruiz, L., de la Fuente, M., García-Vázquez, C., Seijo, B., Sáez, V., Alonso, M. J., Calonge, M., & Diebold, Y. (2010). Ocular Tolerance to a Topical Formulation of Hyaluronic. Cornea, 29(5), 550–558.

Corrales, R. M., Luo, L., Chang, E. Y., & Pflugfelder, S. C. (2008). Effects of Osmoprotectants on Hyperosmolar Stress in Cultured Human Corneal Epithelial Cells. Cornea, 27(5), 574–579.

Davidson, H. J., & Kuonen, V. J. (2004). The tear film and ocular mucins. Veterinary Ophthalmology, 7(2), 71–77.

Davies, N. M. (2000). Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 27(7), 558–562.

Deng, R., Su, Z., Hua, X., Zhang, Z., Li, D. Q., & Pfugfelder, S. C. (2014). Osmoprotectants suppress the production and activity of matrix metalloproteinases induced by hyperosmolarity in primary human corneal epithelial cells. Molecular Vision, 20, 1243–1252.

Dilly, P. N. (1994). Structure and function of the tear film. Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes, 239–247.

Eibl, H., & Kaufmann-Kolle, P. (1995). Medical application of synthetic phospholipids as liposomes and drugs. Journal of Liposome Research, 5(1), 131–148. https://doi.org/10.3109/08982109509039914

Enrı, A., Salamanca, D., Diebold, Y., Calonge, M., Callejo, S., Vila, A., & Jose, M. (2006). Chitosan Nanoparticles as a Potential Drug Delivery System for the Ocular Surface : Toxicity , Uptake Mechanism and In Vivo Tolerance. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 47(4), 1416–1425. https://doi.org/10.1167/iovs.05-0495

Epstein, S. P., Chen, D., & Asbell, P. A. (2009). Evaluation of Biomarkers of Inflammation in Response to Benzalkonium Chloride on Corneal and Conjunctival Epithelial Cells. JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 25(5). https://doi.org/10.1089/jop.2008.0140

Essmer, E. L. M. M., Omlinson, A. L. A. N. T., Ds, C., Ptom, F. C. O., Alonge, M. A. C., Oboridis, K. O. G. B., Kova, Y. O. A. A., Eerling, G. E. R. D. G., Abetoulle, M. A. R. C. L., & Olando, M. A. R. (2013). Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease : Proceedings of the OCEAN Group Meeting. The Ocular Surface, 11(4), 246–258. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2013.07.003

Freeberg, F. E., Nixon, G. A., Reer, P. J., Weaver, J. E., Bruce, R. D., Griffith, J. F., & Sanders, L. W. (1986). Human and rabbit eye responses to chemical insult. Toxicological Sciences, 7(4), 626–634. https://doi.org/10.1093/toxsci/7.4.626

Fresta, M., Panico, A. M., Bucolo, C., Giannavola, C., & Puglisi, G. (1999). Characterization and In-vivo Ocular Absorption of Liposome-encapsulated Acyclovir. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51(5), 565–576. https://doi.org/10.1211/0022357991772664

Garrigue, J. S., Amrane, M., Faure, M. O., Holopainen, J. M., & Tong, L. (2017). Relevance of Lipid-Based Products in the Management of Dry Eye Disease. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 33(9), 647–661. https://doi.org/10.1089/jop.2017.0052

Gómez-Ballesteros, M., López-Cano, J. J., Bravo-Osuna, I., Herrero-Vanrell, R., & Molina-Martínez, I. T. (2019). Osmoprotectants in hybrid liposome/HPMC systems as potential glaucoma treatment. Polymers, 11(6). https://doi.org/10.3390/polym11060929

Gonzalez Gomez, A., Syed, S., Marshall, K., & Hosseinidoust, Z. (2019). Liposomal Nanovesicles for Efficient Encapsulation of Staphylococcal Antibiotics. ACS Omega, 4(6), 10866–10876. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00825

Grassiri, B., Zambito, Y., & Bernkop-Schnürch, A. (2021). Strategies to prolong the residence time of drug delivery systems on ocular surface. Advances in Colloid and Interface Science, 288. https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102342

Gulsen, D., Li, C. C., & Chauhan, A. (2005). Dispersion of DMPC liposomes in contact lenses for ophthalmic drug delivery. Current Eye Research, 30(12), 1071–1080. https://doi.org/10.1080/02713680500346633

Hájek, J., Váczi, P., Barták, M., Smejkal, L., & Lipavská, H. (2009). Cryoproective role of ribitol in Xanthoparmelia somloensis. Biologia Plantarum, 53(4), 677–684. https://doi.org/10.1007/s10535-009-0122-z

Herrero-Vanrell, R., De La Torre, M. V., Andrés-Guerrero, V., Barbosa-Alfaro, D., Molina-Martínez, I. T., & Bravo-Osuna, I. (2013). Nano and microtechnologies for

ophthalmic administration , an overview. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 23(2), 75–102. https://doi.org/10.1016/S1773-2247(13)50016-5

Houlsby, R. D., Ghajar, M., & Chavez, G. (1986). Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 89(5), 803–806.

Hubrecht, R. C., & Carter, E. (2019). The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. Animals, 9(10), 754.

Jones, L., Downie, L. E., Korb, D., Benitez-del-Castillo, J. M., Dana, R., Deng, S. X., Dong, P. N., Geerling, G., Hida, R. Y., Liu, Y., Seo, K. Y., Tauber, J., Wakamatsu, T. H., Xu, J., Wolffsohn, J. S., & Craig, J. P. (2017). TFOS DEWS II Management and Therapy Report. Ocular Surface, 15(3), 575–628. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.006

José, A., Orobia, M., Saa, J., Lorenzo, A. O., & Herreras, J. M. (2018). Combination of hyaluronic acid , carmellose , and osmoprotectants for the treatment of dry eye disease. Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ), 12, 453–461.

Li, D., Luo, L., Chen, Z., Kim, H., Jun, X., & Pflugfelder, S. C. (2006). JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1 b , TNF- a and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells *. Experimental Eye Research, 82(4), 588–596. https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.08.019

Links, D. A. (2012). The impact of lipid composition on the stability of the tear fluid lipid layer. Soft Matter, 8(21), 5826–5834. https://doi.org/10.1039/c2sm25210d

Liu, H., Begley, C., Chen, M., Bradley, A., Bonanno, J., Mcnamara, N. A., Nelson, J. D., & Simpson, T. (2009). A Link between Tear Instability and Hyperosmolarity in. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 50(8), 3671. https://doi.org/10.1167/iovs.08-2689

López-Cano, J. J., González-Cela-Casamayor, M. A., Andrés-Guerrero, V., Herrero-Vanrell, R., Benítez-Del-Castillo, J. M., & Molina-Martínez, I. T. (2021). Combined hyperosmolarity and inflammatory conditions in stressed human corneal epithelial cells and macrophages to evaluate osmoprotective agents as potential DED treatments. Experimental Eye Research, 211, 108723. https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108723

López-Cano, J. J., González-Cela-Casamayor, M. A., Andrés-Guerrero, V., Herrero-Vanrell, R., & Molina-Martínez, I. T. (2021). Liposomes as vehicles for topical ophthalmic drug delivery and ocular surface protection. Expert Opinion on Drug Delivery, 18(7), 819–848. https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1872542

Loss, E. (2009). Inputs and Outputs of the Lacrimal System : Review of Production and Evaporative Loss ABSTRACT Meta-analyses were carried out of studies of. The Ocular Surface, 7(4), 186–198. https://doi.org/10.1016/S1542-0124(12)70186-6

Luo, L., Li, D. Q., Doshi, A., Farley, W., Corrales, R. M., & Pflugfelder, S. C. (2004). Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 45(12), 4293–4301. https://doi.org/10.1167/iovs.03-1145

Luo, L., Li, D. Q., & Pflugfelder, S. C. (2007). Hyperosmolarity-induced apoptosis in human corneal epithelial cells is mediated by cytochrome c and MAPK pathways. Cornea, 26(4), 452–460. https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318030d259

María Ángela Caballo González. (2020). Estudio de formulaciones liposomales oftálmicas. Aplicación en la enfermedad de ojo seco.

Meng, T., Kulkarni, V., Simmers, R., Brar, V., & Xu, Q. (2019). Therapeutic implications of nanomedicine for ocular drug delivery. Drug Discovery Today, 24(8), 1524–1538. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.006

Naguib, Y. W., Saha, S., Skeie, J. M., Acri, T., Ebeid, K., Abdel-rahman, S., Kesh, S., Schmidt, G. A., Nishimura, D. Y., Banas, J. A., Zhu, M., Greiner, M. A., & Salem, A. K. (2021). Biomaterials Solubilized ubiquinol for preserving corneal function. Biomaterials, 275, 120842. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120842

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. (n.d.). https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264242432-en

Partenhauser, A., & Bernkop-schnu, A. (2016). Mucoadhesive polymers in the treatment of dry X syndrome. Drug Discovery Today, 21(7), 1051–1062. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.013

Refai, H., Hassan, D., Abdelmonem, R., Refai, H., Hassan, D., & Abdelmonem, R. (2017). Development and characterization of polymer- coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. Drug Delivery, 7544. https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1247925

Schniertshauer, D., Gebhard, D., Beek, H. Van, Nöth, V., & Schon, J. (2020). The activity of the DNA repair enzyme hOGG1 can be directly modulated by ubiquinol. DNA Repair, 87(September 2019), 102784. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102784

Schuett, B. S., & Millar, T. J. (2012). Lipid Component Contributions to the Surface Activity of Meibomian Lipids. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 53(11), 7208–7219. https://doi.org/10.1167/iovs.12-10471

Shahraki, K., Hosseini, S.-R., Amini Fard, A., Shademan, H., Shahraki, K., Salari, A. M., & Amini Fard, M.-N. (2016). Effects of Topical 1% Sodium Hyaluronate and Hydroxypropyl Methylcellulose in Treatment of Corneal Epithelial Defects. Medical Hypothesis, Discovery & Innovation Ophthalmology Journal, 5(4), 136–144. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28293662%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5346304

Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 14(3), 407–426. https://doi.org/10.1007/s11157-015-9372-8

Stapleton, F., Alves, M., Bunya, V. Y., Jalbert, I., Lekhanont, K., Malet, F., Na, K. S., Schaumberg, D., Uchino, M., Vehof, J., Viso, E., Vitale, S., & Jones, L. (2017). TFOS DEWS II Epidemiology Report. Ocular Surface, 15(3), 334–365. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.003

Stoll, C., Holovati, J. L., Acker, J. P., & Wolkers, W. F. (2012). Synergistic effects of liposomes, trehalose, and hydroxyethyl starch for cryopreservation of human erythrocytes. Biotechnology Progress, 28(2), 364–371. https://doi.org/10.1002/btpr.1519

Taha, E. I., El-Anazi, M. H., El-Bagory, I. M., & Bayomi, M. A. (2014). Design of liposomal colloidal systems for ocular delivery of ciprofloxacin. Saudi Pharmaceutical Journal, 22(3), 231–239. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.003

Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. (2021). OECD. https://doi.org/10.1787/9789264185333-en

The Association for Research in Vision and Ophthalmology- Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. (n.d.). Retrieved June 23, 2021, from https://www.arvo.org/About/policies/statement-for-the-use-of-animals-in-ophthalmic-and-vision-research/

Tiffany, J. M. (2008). The Normal Tear Film. Surgery for the Dry Eye, 41, 1–20.

Tirpack, A. R., Vanner, E., Parrish, J. M., Galor, A., Hua, H., & Wellik, S. R. (2019). Dry Eye Symptoms and Ocular Pain in Veterans with Glaucoma. Journal of Clinical Medicine, 8.

Tomlinson, A., Khanal, S., Ramaesh, K., Diaper, C., & Mcfadyen, A. (2006). Tear Film Osmolarity : Determination of a Referent for. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 47(10), 1–7. https://doi.org/10.1167/iovs.05-1504

Tran, K. N., Pham, N., Jang, S. H., & Lee, C. W. (2020). Purification and characterization of a novel medium-chain ribitol dehydrogenase from a lichen-associated bacterium Sphingomonas sp. PLoS ONE, 15(7 July), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235718

Vicario-de-la-Torre, M., Benítez-del-Castillo, J. M., Vico, E., Guzmán, M., de-las-Heras, B., Herrero-Vanrell, R., & Molina-Martínez, I. T. (2014). Design and characterization of an ocular topical liposomal preparation to replenish the lipids of the tear film. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 55(12), 7839–7847. https://doi.org/10.1167/iovs.14-14700

Vicario-de-la-Torre, M., Caballo-González, M., Vico, E., Morales-Fernández, L., Arriola-Villalobos, P., Heras, B. de las, Benítez-del-Castillo, J. M., Guzmán, M., Millar, T., Herrero-Vanrell, R., & Molina-Martínez, I. T. (2018). Novel Nano-liposome

formulation for dry eyes with components similar to the preocular tear film. Polymers, 10(4), 1–13. https://doi.org/10.3390/polym10040425

Wendy B. Bollag, Lawrence O. Olala, Ding Xie, Xiaowen Lu, Haixia Qin, Vivek Choudhary, Rachana Patel, David Bogorad, Amy Estes, and M. W. (2020). Dioleoylphosphatidylglycerol Accelerates Corneal Epithelial. 3(29), 1–4.

Willcox, M. D. P., Argüeso, P., Georgiev, G. A., Holopainen, J. M., Laurie, G. W., Millar, T. J., Papas, E. B., Rolland, J. P., Schmidt, T. A., Stahl, U., Suarez, T., Subbaraman, L. N., Uçakhan, O., & Jones, L. (2017). TFOS DEWS II Tear Film Report. Ocular Surface, 15(3), 366–403. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.03.006

Wong, A. B. C., Wang, M. T. M., Liu, K., Prime, Z. J., Danesh-Meyer, H. V., & Craig, J. P. (2018). Exploring topical anti-glaucoma medication effects on the ocular surface in the context of the current understanding of dry eye. Ocular Surface, 16(3), 289–293. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2018.03.002

Yamauchi, M., Tsutsumi, K., Abe, M., Uosaki, Y., Nakakura, M., & Aoki, N. (2007). Release of drugs from liposomes varies with particle size. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30(5), 963–966. https://doi.org/10.1248/bpb.30.963

Ye, J., Zhang, H., Wu, H., Wang, C., Shi, X., Xie, J., He, J., & Yang, J. (2012). Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 250(10), 1459–1466. https://doi.org/10.1007/s00417-012-2087-4

Zhan, C., Santamaria, C. M., Wang, W., McAlvin, J. B., & Kohane, D. S. (2018). Long-acting liposomal corneal anesthetics. Biomaterials, 181(April), 372–377. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.054

Zhang, F., Chen, H., Lan, J., Song, K., & Wu, X. (2021). Preparation and in vitro / in vivo evaluations of novel ocular micelle formulations of hesperetin with glycyrrhizin as a nanocarrier. Experimental Eye Research, 202(October 2020), 108313. https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108313

Zhang, R., Park, M., Richardson, A., Tedla, N., Paiva, C. S. De, Watson, S., Wakefield, D., & Girolamo, N. Di. (2019). Dose-dependent benzalkonium chloride toxicity imparts ocular surface epithelial changes with features of dry eye disease. Ocular Surface. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2019.11.006

CAPÍTULO II - CHAPTER II. Novel Osmoprotective DOPC-DMPC Liposomes Loaded with Antihypertensive Drugs as Potential Strategy for Glaucoma Treatment

Miriam Ana González Cela Casamayor, José Javier López Cano, Irene Bravo Osuna, Vanessa Andrés Guerrero, Marta Vicario de la Torre, Manuel Guzmán Navarro, José Manuel Benítez del Castillo, Rocío Herrero Vanrell, and Irene Teresa Molina Martínez.

Publicado en la revista Pharmaceutics.

CAPÍTULO II – CHAPTER II

CAPÍTULO II – CHAPTER II

RESUMEN

El glaucoma es un grupo de neuropatías crónicas irreversibles que afectan a la retina y al nervio óptico. óptico. Se considera una de las principales causas de ceguera en el mundo. Aunque puede deberse a diversas causas, el factor de riesgo modificable más importante es la presión intraocular (PIO) elevada.

En este caso, el tratamiento de elección consiste en la instilación de formulaciones antihipertensivas en la superficie ocular. La cronicidad de la patología, unida a la baja biodisponibilidad de los fármacos que se aplican sobre la superficie ocular, hacen necesaria la instilación de las formulaciones con mucha frecuencia, lo que se asocia en muchos casos a la aparición de la enfermedad del ojo seco (EOS). El objetivo de este trabajo es el diseño de formulaciones tópicas oculares capaces de tratar el glaucoma y, al mismo tiempo, prevenir la EOS. Para ello, se desarrollaron dos formulaciones liposomales, cargadas con brimonidina o con travoprost, utilizando fosfolípidos sintéticos y enriquecidas mediante la adición de compuestos con actividad osmoprotectora. Las formulaciones propuestas no sólo presentaron unas características fisicoquímicas (tamaño, pH, osmolaridad, tensión superficial y viscosidad) y unos valores de eficacia de encapsulación (EE% del 24,78% y ≥99,01% para brimonidina y travoprost, respectivamente) adecuados para su administración en la superficie ocular, sino que también mostraron una buena tolerancia en cultivos de células corneales y conjuntivales humanas, así como una actividad osmoprotectora *in vitro*. El efecto hipotensor de ambas formulaciones liposomales se evaluó en conejos albinos normotensos de Nueva Zelanda, mostrando una reducción más rápida y duradera de la presión intraocular en comparación con los correspondientes productos comercializados utilizados como control.

Según estos resultados, las formulaciones liposomales hipotensoras combinadas con agentes osmoprotectores una plataforma muy prometedora para el tratamiento del glaucoma y la protección simultánea de la superficie ocular.

CAPÍTULO II – CHAPTER II

CAPÍTULO II – CHAPTER II

ABSTRACT

Glaucoma is a group of chronic irreversible neuropathies that affect the retina and the optic nerve. It is considered one of the leading causes of blindness in the world. Although it can be due to various causes, the most important modifiable risk factor is the elevated intraocular pressure (IOP).

In this case, the treatment of choice consists of instilling antihypertensive formulations on the ocular surface. The chronicity of the pathology, together with the low bioavailability of the drugs that are applied on the ocular surface, make it necessary to instill the formulations very frequently, which is associated, in many cases, with the appearance of dry eye disease (DED). The objective of this work is the design of topical ocular formulations capable of treating glaucoma and, at the same time, preventing DED. For this, two liposome formulations, loaded with brimonidine or with travoprost, were developed using synthetic phospholipids and enriched by the addition of compounds with osmoprotective activity. The proposed formulations not only presented physicochemical characteristics (size, pH, osmolarity, surface tension, and viscosity) and encapsulation efficiency values (EE% of 24.78% and ≥99.01% for brimonidine and travoprost, respectively) suitable for ocular surface administration, but also showed good tolerance in human corneal and conjunctival cell cultures, as well as an *in vitro* osmoprotective activity. The hypotensive effect of both liposomal formulations was evaluated in normotensive albino New Zealand rabbits, showing a faster and longer lasting reduction of intraocular pressure in comparison to the corresponding commercialized products used as control.

According to these results, the hypotensive liposomal formulations combined with osmoprotective agents would result in a very promising platform for the treatment of glaucoma and the simultaneous protection of the ocular surface.

CAPÍTULO II – CHAPTER II

1 Introduction

Although there are several types of glaucoma, all of them are characterized by the progressive death of the retinal ganglion cells (RGC) whose axons form the optic nerve. Due to the special arrangement of these axons in the optic nerve head, the patient begins to lose peripheral vision, gradually turning into tube-shaped vision and finally leading to total blindness. Glaucoma is one of the main causes of blindness in the world and it is estimated that in 2040 there will be more than 111.8 million affected [1,2]. One of the main modifiable risk factors in glaucoma is the increase in intraocular pressure (IOP), the use of topical antihypertensive drugs being the first line of treatment in those cases [3]. High intraocular pressure compromises blood flow and produces a damage of the optic nerve and retina [4]. As reported by Philip C Maier in a meta-analysis, reducing IOP in glaucoma patients decreased long-term vision loss [5]. In therapeutics, there are many ocular antihypertensive drugs available in chronic topical treatments, such as the α2-adrenergic receptor agonist brimonidine [6] and prostaglandin PGF2 α analogue travoprost [7]. Ocular topical administration is the most employed route to control IOP in glaucoma. Unfortunately, there are several problems that limit the effectiveness of treatments and follow-up by patients: (I) low ocular bioavailability [8] and (II) development of dry eye disease (DED) [6]. Several technological strategies have been proposed to extend the ocular residence time of drugs, and hence to increase their ocular bioavailability [9]. In this sense, the use of nanotechnology allows bioavailability to increase and also protects the drug from degradation [10]. Furthermore, due to their small size, they can establish intimate interactions with biological tissues. Among the different nanosystems currently available for this purpose, liposomes, composed by an aqueous core surrounded by one or several lipid bilayers [10], were the first to appear, and one of the most promising. They offer high biocompatibility and biodegradability [11] and are very versatile, so they can entrap hydrophilic drugs in the aqueous core and can also incorporate lipophilic drugs in the lipid bilayers [4]. In the case of ocular topical administration, previous studies on corneal cells have shown that liposomes are able to penetrate into the cells of the ocular surface [12]. Furthermore, the lipid bilayer of liposomes is mainly composed of phospholipids, widely presented in the tear film composition. Consequently, liposomes are able to supplement the lipid layer of the tear

film and prevent tear evaporation, improving the symptoms of DED [9,13]. In recent years, the use of synthetic phospholipids has increased because of their advantages in terms of standardization, characterization, and potential scaling of liposome production [14,15]. The addition of mucoadhesive polymers in eye-drops have been also proposed as a tool to increase the residence time of ocular topical formulation. In addition, the viscosity generally provided by these polymers in solution allows the formation of a layer that covers the ocular surface [16,17]. Studies carried out with liposomal formulations containing HPMC (hydroxypropyl methylcellulose) have shown an improvement on the loaded drug efficacy after ocular instillation [4]. In addition, previous studies carried out in our research group showed that the inclusion of HPMC in the eye-drops has a beneficial effect on their tolerance on the ocular surface [18]. The precorneal film is composed of an external lipid layer (phospholipids, cholesterol fatty acids, etc.) in contact with the air. Behind this lipid layer there is an aqueous layer where there are electrolytes, mucin, proteins, among others, that are in close contact with the conjunctival and corneal epithelium [19]. Dry eye disease (DED) is caused by a disruption of the homeostasis of this tear film produced by an increase in tear evaporation (evaporative dry eye) or a deficient tear production (aqueous deficient dry eye). This promotes the permanent contact of conjunctiva and cornea cells with a hyperosmolar aqueous media [20] which subsequently produces damage and inflammation (increased matrix metalloproteinases and activation of proinflammatory cytokine cascades) on these tissues [20–22]. All these events generate apoptosis of ocular surface cells, which, in turn, destabilizes the tear film even more, creating a vicious cycle [21]. This is the reason why the use of osmoprotectants such as ribitol [23] and taurine [24] has emerged as a therapeutic strategy to protect the ocular surface [25]. Furthermore, authors have linked oxidative stress to the production of damage and inflammation in the conjunctiva of these patients [26].

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Synthetic phospholipids 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) were purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). The other lipid components of liposomes, Cholesterol (≥99%), α-Tocopherol acetate (≥96%), and Ubiquinol (USP reference standard), were

supplied by Sigma Aldrich, as well as the aqueous compounds Ribitol (Adonitol, ≥99%), Taurine (≥99%), Sodium tetraborate (Na2B4O7, ≥99.5%), and Boric Acid (H3BO3, ≥99.5%). Brimonidine was obtained in Fagron Iberica (Terrassa, Spain) and travoprost in MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA). Defined Trypsin Inhibitor was supplied by Life Technologies (Madrid, Spain). Fetal Bovine Serum was supplied by Thermo Fisher (Madrid, Spain). Trypan-Blue, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], Dimethyl sulfoxide (DMSO), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), Trypsin-EDTA 0.05%, Sodium Chloride (NaCl), Sodium Chloride 5M, and 2% Gelatin solution were provided by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). T-75 flasks and polystyrene 15 mL tubes were from Sarstedt (Madrid, Spain).

2.2 Liposome Preparation

Two liposomal formulations containing Brimonidine (FL-B) or Travoprost (FL-T) (Table 1) were prepared using the lipid film hydration method described by Bangham, including modifications [32]. The phospholipid composition of the lipid bilayer was a mixture of 7.5 mg/mL DOPC and 2.5 mg/mL DMPC, obtained a final 10 mg/mL concentration of phospholipids. In addition, cholesterol, and the antioxidants vitamin E and ubiquinol were included. The weight ratio of the lipid bilayer (DOPC:DMPC:Ch:ViE:Ubiq) was 6:2:1:0.08:0.02. As previously highlighted, phosphatidylcholine derivatives supplement the tear film.

Table 1. Composition of the different liposomal formulations prepared.

Formulation	Lipid Bilayer	Aqueous Dispersion
FL-B	DOPC: DMPC 10 mg/mL Cholesterol 1.25 mg/mL Vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL	H_3BO_3 0.838% $Na_2B_4O_7$ 0.755% Ribitol 0.5% Taurine 0.5% Brimonidine 2 mg/mL
FLP-B	DOPC: DMPC 10 mg/mL Cholesterol 1.25 mg/mL Vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL	H_3BO_3 0.838% $Na_2B_4O_7$ 0.755% Ribitol 0.5% Taurine 0.5%, HPMC 0.2%, Brimonidine 2 mg/mL
FL-T	DOPC: DMPC 10 mg/mL Cholesterol 1.25 mg/mL Vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL 40 µg/mL Travoprost	H_3BO_3 0.838% $Na_2B_4O_7$ 0.755% Ribitol 0.5% Taurine 0.5%

Formulation	Lipid Bilayer	Aqueous Dispersion
	DOPC: DMPC 10 mg/mL	H_3BO_3 0.838%
	Cholesterol 1.25 mg/mL	$Na_2B_4O_7$ 0.755%
FLP-T	Vitamin E 0.1 mg/mL	Ribitol 0.5%
	Ubiquinol 0.025 mg/mL	Taurine 0.5%
	40 µg/mL Travoprost	HPMC 0.2%

2.3 Determination of the Physicochemical Properties of the Liposomal Formulations

The technique used to measure the size and the size distribution profile of the liposomal formulation was the dynamic light scattering. The equipment used was the Microtrac® S3500 Series (Montgomeryville, PA, USA). The polydispersion index (PDI) was also calculated. For the evaluation of the zeta potential of the formulations, the Autosizer 4700 (Malvern, UK) was used.

Osmolarity measurements were acquired by a vapor osmometer (Fiske Micro-Osmometer, model 210). The calibration was performed with the 50, 290, and 850 mOsm/L standards.

The pH measurement was determined using the pH-meter (model GLP-2, CRISON). The calibration was performed with pH 4 and pH 7 standards.

The surface tension was analyzed with the Wilhelmy plate method and calibrated with water (68–72 mN/m) using the tensiometer K-11 (Kruss GmbH, Hamburg, Germany). The temperature of the samples was the one corresponding to ocular surface temperature (32 °C).

The Discovery HR-1 hybrid Rheometer (New Castle, DE, USA) with a parallel plate (69 mm) was employed to perform viscosity. The study was conducted in 20 steps, with a shear rate increasing from 0 to 1000 s^{-1}.

2.4 HPLC Quantification and Encapsulation Efficiency of the Active Ingredients

The quantification of active substances (brimonidine and travoprost) was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) using the isocratic method. The equipment used to carry out the experiments is the RP-HPLC Acquity Arc Bio® (Waters, Madrid, Spain). The RP-HPLC was equipped with a photodiode array detector (2998 PDA Detector), a bioSample Manager FTN-R, and a bioQuaternary Solvent manager-R.

The quantification of brimonidine was performed using a previously described method with some modifications [33]. Tracer excell 120 ODSA 5 µm 15 × 0.4 TR- 015694 column was employed (Teknocroma). The column was kept at a temperature of 30 °C, the flow rate was 1 mL/min, the injection volume was 10 µL, and a detection wavelength of 246.1 nm was used. The calibration curve was performed using a 500 µg/mL brimonidine standard. The different curve concentrations (40, 20, 15, 10, 5, and 1.5 µg/mL) were prepared in methanol. The solution used as the mobile phase was composed by phosphate buffer (KH_2PO_4 10mM acidified with phosphoric acid to obtain a 3.5 pH) with TEA 0.5% in water and Methanol (85:15). The liposomes were freeze-dried after preparation. Subsequently they were dissolved in methanol, centrifuged and filtered, and the yield was calculated (1). The percentage of drug lost during the manufacturing process was calculated as the difference between the yield obtained and 100%.

$$\text{Yield\%} = \frac{Real\ amount\ of\ Brimonidine\ in\ the\ formulation}{Theoretical\ amount\ of\ brimonidine\ in\ the\ formulation} \times 100 \qquad (1)$$

To quantify the encapsulation efficiency (EE) of brimonidine, the FL-B liposomal formulation was subjected to ultrafiltration to separate the liposomes from the aqueous dispersion, and then the free fraction of brimonidine in the supernatant was determined by HPLC analysis. To determine the free concentration of brimonidine present in the formulation, liposomes were subjected to ultrafiltration using 0.5 mL tubes with centrifugal filters of 50 kD (Ultracel®). The liposomes were diluted 1:10, and 0.25 mL of

the solution was added to the ultrafiltration tubes. Subsequently, they were centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. Finally, they were diluted with methanol (1:10) and quantified by HPLC.

The concentration of brimonidine encapsulated in the liposomes was indirectly calculated from the amount of total brimonidine in the liposomal formulation and the fraction of free brimonidine in the aqueous phase (2).

$$EE\% = \frac{(Total\ amount\ of\ Brimonidine - Free\ amount\ of\ Brimonidine)}{Total\ amount\ of\ Brimonidine} \times 100 \qquad (2)$$

The quantitative analysis of travoprost was based on the method described in the United States Pharmacopeia (USP-NF 2021) with some modifications [34]. Ascentis C18 5 µm 25 × 0.46 cm column was used. The column was kept at 30 °C, and a flow rate of 1 mL/min and an injection volume of 10 µL were used. The maximal absorption quantification was fixed 222.5 nm wavelength. Different curve points in ethanol absolute (50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, and 0.25 µg/mL) were prepared from a calibration curve using a 1 mg/mL travoprost standard. The solution used as mobile phase consisted of water acidified with 0.1% TFA and acetonitrile HPLC grade (40:60). The liposomes were freeze-dried, dissolved in absolute ethanol, centrifuged, and filtered.

The EE was calculated as previously explained for brimonidine, with the peculiarity that the limit of detection and limit of quantification had to be calculated to estimate the minimum EE (%). The free concentration was also determined using the centrifugal filters of 50 kDa (14,000 rpm for 5 min), using a volume of 0.5 mL. As travoprost was not detected in the aqueous dispersion, it was necessary to determine the Y-intercept, slope, and the limit of quantification to determine the minimum encapsulation efficiency [35,36].

2.5 *In Vitro* Studies in Human Cell Lines

2.5.1 Cell Cultures

The cytotoxicity and osmoprotection assays were conducted with immortalized human corneal epithelial cell line (hTERT-HCECs) (Evercyte GmbH, Vienna, Austria). Corneal cells were maintained with EpiLife® medium supplemented with EDGS® and 1%

penicillin-streptomycin. The medium was changed every 2–3 days and the experiments were carried out with 5–15 passages. T-75 culture flasks were selected for the subcultures (80–85% confluence), previously coated with 2% gelatin solution. Cells were washed with DPBS, and subsequently 0.005% trypsin-EDTA was used to detach the cells from the flask. The trypsinisation time was 5 min, followed by light tapping on the flask. Once peeled off, trypsin inhibitor was used to neutralize trypsin and the cells were centrifuged (5430R Centrifuge, Eppendorf, Madrid, Spain) at 850× *g* in a 15 mL tube to get a pellet. The cell pellet was resuspended and added to new flasks with culture medium.

For the cytotoxicity assays, an immortalized human conjunctival epithelial cell line (IM-HConEpiC) (Innoprot, Bizkaia, Spain) was also used. The medium was renewed every two days, and its maintenance was carried out in collagen coated flasks using the Collagen I Coating Kit (1 mg/mL) (Innoprot, Bizkaia, Spain) and the IM-Ocular Epithelial Cell Medium Kit (Innoprot, Bizkaia, Spain). Subcultures were performed similarly to the corneal cell line. The passages used to assay performance ranged between 2–10. Cell cultures were maintained in a saturated humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO_2.

2.5.2 *In Vitro* Tolerance Determination in Human Corneal hTERT-HCECs Cells

The cytotoxicity of the different liposomal formulations containing 2 mg/mL brimonidine (FLB and FLP-B) or 40 µg/mL travoprost (FLT and FLPT) was determined. In addition, two commercial formulations containing brimonidine (CCB) and travoprost (CCT) were used for comparison. The evaluation was carried out by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, described before by our group [36]. Cell cultures were allowed to grow until 80–85% confluency and then cultured in 96-well plates at 20,000 cells/well.

After seeding and overnight incubation (16 h), the cells were exposed to the formulations, using a volume of 100 µL/well of formulation and 100 µL/well of the previously described culture medium. To simulate acute exposure, the human corneal cells were exposed for 1 h to formulations. On the other hand, exposure was also performed for 4 h to simulate a chronic treatment [32].

For cell viability determination, the supernatant was discarded and a solution of 0.3% MTT in culture medium was added. MTT solution was added at a volume of 100 µL/well. The exposure lasted 4 h, the time necessary for live cells to oxidize MTT to its formazan salt. To dissolve the formazan crystals formed, the reagent DMSO was used. The supernatant was first discarded and then 100 µL/well of DMSO was added. The absorbances were read in a spectrophotometer, using a wavelength of 550 nm, with prior shaking of the plate for 5 min.

The positive control selected was 0.005% BAK, a preservative commonly included in topical ophthalmic formulations, causing poor tolerance and cell dead. BAK was selected as a positive control due to findings by other authors, which links it to the development of DED and inflammatory processes in corneal and conjunctival cells [31,37]. 0.9% NaCl was used as a negative control, equated to 100% cell viability.

2.5.3 *In Vitro* Tolerance Determination in Human Conjunctival IM-HConEpiC Cells

Toxicity *in vitro* assays with an immortalized human conjunctival epithelial cell line (IM-HConEpiC) were performed in a similar way to the previous section. In this case, the density of cells seeded was 25,000 cells/well. Cells were exposed to the final 2 mg/mL brimonidine and 40 µg/mL travoprost containing formulations (FLB, FLT, FLP-B, and FLP-T) during 1 and 4 h. Cytotoxicity was measured with the MTT technique in the same way as in the previous section. As negative and positive control, 0.9% NaCl and 0.005% BAK, respectively, were also used.

2.5.4 Osmoprotection Studies by Hyperosmolar Stress Simulation in hTERT-HCECs Corneal Cells

Osmoprotection was performed in a previously developed hypertonic stress model in hTERT-HCECs cells [38]. This model allows the screening of osmoprotective substances or topical ophthalmic formulations in a hypertonic media. Briefly, 20,000 cells/well were seeded and incubated overnight in 96-well plates. Subsequently, the supernatants were aspirated, and the cells exposed to the different developed formulations for 4 h (100 µL of medium and 100 µL of formulation in each well) to simulate a preventive treatment to

cope with the onset of DED. 4 h pre-treatment with 0.9% NaCl was used as positive control.

After that, supernatants were removed, and the previously treated cells were exposed to hyperosmolar conditions 470 mOsm/L for 16 h, except for the negative control, which was exposed to isotonic conditions (NaCl 0.9%). Finally, the supernatants were discarded and 100 µL/well of 0.33 mg/mL MTT solution was added to determine cell viability, as described in the previous section.

2.6 *In Vivo* Studies

2.6.1 Animals

New Zealand albino rabbits (San Bernardo Farm, Spain) with approximately 3.5 kg weight were used to carry out the *in vivo* studies in accordance with the relevant regulations on animal experimentation (European Communities Council Directive (86/609/EEC) the Statement for the Use of Animals in Ophthalmic Vision Research in Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) [39] and Spanish Regulation of Experimental Studies with Animals (RD 53/2013 1 February modified by the RD 118/2021 23 February). The protocol code was: PROEX 114.4/21 (16/07/2020).

The animals were kept under inverted light cycle conditions and at a temperature of 22 °C and 50% humidity in a controlled atmosphere.

2.6.2 *In Vivo* Hypotensive Studies

The *in vivo* hypotensive effect was carried out with an instillation of 25 µL of each formulation into both eyes at 5 male New Zealand albino rabbits (10 eyes). For rabbit recovery, animals were maintained with no treatment for at least 48 h. IOP measurements were performed using a tonometer (Tonovet) and tonometer probes (Tiolat). To establish 100% intraocular pressure (Baseline), measurements were taken half an hour before (t = −0.5) and at the time of administration (t = 0). Subsequently, intraocular pressure measurements were taken hourly for an interval of 11 h and then at 24 h. In cases in which IOP pressure remained below 100% after 24 h, measurements were taken at 28, 32, and up to 48 h.

The decrease in IOP achieved by the liposomal formulations was firstly compared to those obtained with the base vehicle (FL and FLP without active ingredient). Subsequently, the hypotension achieved by a commercial formulation containing brimonidine (Alphagan®) (CCB) was compared with 2 mg/mL brimonidine liposomal formulations with and without polymer (FL-B and FLP-B). For the comparison of the FL-T and FLP-T (40 µg/mL) formulations, a commercial formulation with travoprost (Travatan®) (CCT) was used.

To analyze the results, we established the time at which the IOP was significantly reduced ($p < 0.05$) from baseline (Onset time) for each formulation and until what time this difference was significant (effective time). The times for calculating the areas under the curve (AUC_{0-}) were selected consequently. Data treatment was applied calculating the AUC_{0-t} and maximal IOP reduction (ΔIOP_{max}) produced by each formulation and testing its significance. In order to study whether one formulation had an advantage over another, it was studied whether the 95 CI interval of the difference between them did not include 0 (Relationship between the two mean difference test (*p*-value of the Student's *t*-test)).

2.7 Data Analysis

The software used to carry out the statistical analysis of *in vitro* studies was the GraphPad software Inc. Prism Version 8.0.2, US. For all data, measurements were taken in triplicate (mean ± SD). Statistical significance was established using the Ordinary one-way ANOVA test using the Sidak's multiple comparisons test ($\alpha \leq 0.05$).

Statistical treatment for IOP curves and areas was performed with Statgraphics 19, using description and comparison by hypothesis testing. It was considered significant at *p* value < 0.05%.

3 Results

3.1 Physicochemical Determination

The different liposomal formulations containing brimonidine or travoprost were characterized in terms of size, pH, osmolarity, surface tension, and viscosity (Table 2). The sizes of the liposomal vesicles were around 200 nm with a unimodal distribution (Figure 1). The average particle size resulted in values between 150 and 220 nm, increasing in both formulations when HPMC was included in the aqueous dispersion and maintaining the unimodal size distribution. The polydispersion index was, in all cases, between 0.10 and 0.16. The zeta potential of all formulations was found to be between −10 and 10 mV, which means a neutral zeta potential.

The pH of all formulations was neutral, being in the 6.5–7 range. All formulations were hypotonic, with values between 220 and 230 mOsm/L.

For the determination of the adequate extensibility of the formulations, surface tension and viscosity were measured. The surface tension values of all formulations were in the range of 25–30 mN/m. The viscosity of the liposomal formulations of both active ingredients was close to 1 mPa·s, while it increased when the polymer was included in both formulations.

Table 2. Physicochemical characterization of the liposomal formulation with and without HPMC 0.2% containing brimonidine or travoprost. Data are represented as the mean ± the standard deviation of the 3 values.

	FL-B	**FLP-B**	**FL-T**	**FLP-T**
Size (nm)	186.77 ± 65.97	212.33 ± 77.57	156.63 ± 61.83	184.27 ± 73.80
PDI	0.13	0.13	0.16	0.16
Zeta potential (mV)	2.76 ± 0.04	2.66 ± 0.22	0.63 ± 0.06	0.66 ± 0.07
pH	6.55 ± 0.00	6.53 ± 0.01	6.98 ± 0.02	7.03 ± 0.01
Osmolarity (mOsm/L)	226.33 ± 1.15	230 ± 1.00	221.6 ± 0.58	221 ± 1.00
Surface tension (mN/m)	28.37 ± 0.67	27.53 ± 1.01	25.53 ± 0.80	26.13 ± 0.15
Viscosity (mPa·s)	1.05 ± 0.01	3.90 ± 0.02	1.10 ± 0.01	3.93 ± 0.05

FL: DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, vitamin E 0.1 mg/mL, Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%; FLP: DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%, HPMC 0.2%.

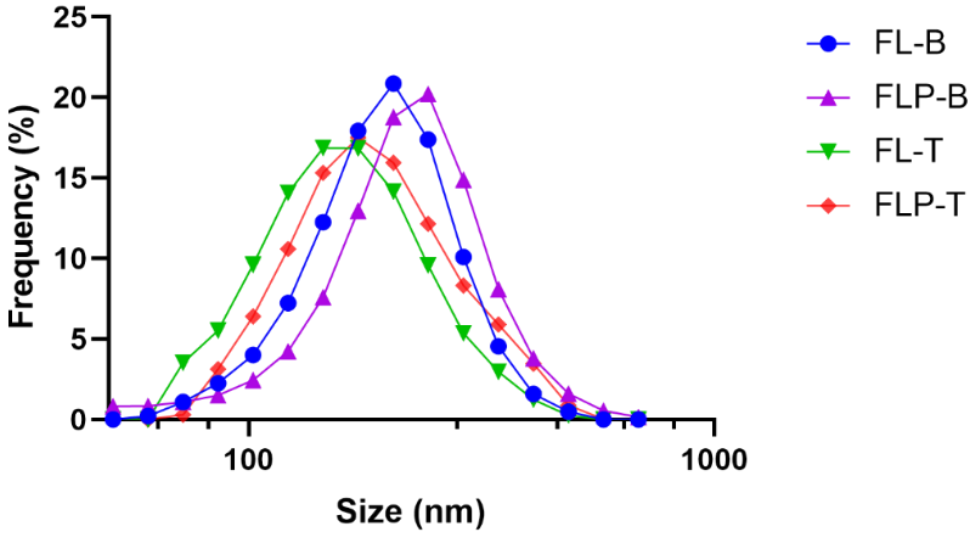

Figure 1. Particle size distribution of liposomal formulation containing brimonidine with (FLP-B) and without (FL-B) HPMC 0.2% and travoprost with (FLP-T) and without (FL-T) HPMC 0.2% represented in a semi-logarithmic scale.

3.2 HPLC Quantification and Encapsulation Efficiency of Active Ingredients

The active ingredients brimonidine and travoprost included in the liposomal formulations were determined in terms of yield and encapsulation efficiency (Data shown in Table 3).

Focusing on the liposomal formulation containing brimonidine (FL-B), the yield was around 100%, meaning that all drug initially included during the elaboration was retained in the formulation. However, according to %EE values, only about 25% of the drug was retained inside the liposomes, while the remaining 75% of brimonidine was found in the aqueous dispersion. In contrast, the yield data of the formulation containing travoprost (FL-T) suggested that around 11% of the drug initially used for the preparation of the liposomes was lost throughout the elaboration process. However, an encapsulation efficiency of this liposoluble active ingredient of values close to 100% were obtained due to the fact that travoprost was not detected in the aqueous dispersion by HPLC. The slope was 11.446 and the Y-intercept was −89.49 (Standard error: 397.1). The resulted Limit of detection (LD) and Limit of quantification (LQ) were 0.114 µg/mL and 0.347 µg/mL, respectively.

Table 3. Quantification and encapsulation efficiency of the active ingredients brimonidine and travoprost in liposomal formulations, determined by HPLC.

	Yield (%)	**EE (%)**
FL-B (Brimonidine)	100.10 ± 0.34	24.78 ± 0.32
FL-T (Travoprost)	89.15 ± 0.49	≥99.01

3.3 ***In Vitro* Studies**

3.3.1 In Vitro Tolerance Evaluation in hTERT-HCECs

With regard to the *in vitro* tolerance of formulations with active substances (Figure 2), the hTERT-HCECs cells were exposed to the formulation during 1 or 4 h, stabilizing 0.9% NaCl (negative control) as 100% cell viability.

The formulation FL-B showed a 93.30 ± 6.63% cell viability after 1 h exposure and 95.09 ± 15.33% after 4 h. In addition, when polymer was incorporated into the formulation (FLP-B), the viability values increased to 107.01 ± 8.74% and 105.33 ± 12.66% at 1 h and 4 h, respectively, however the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). On the contrary, CCB showed a viability of 12.44 ± 0.28% after 1 h and 3.18 ± 0.76% after 4 h. The difference between the cell viability after the exposition with the commercial formulation was statistically significantly lower than that of both liposomal formulations at 1 and 4 h ($p < 0.05$ in all cases).

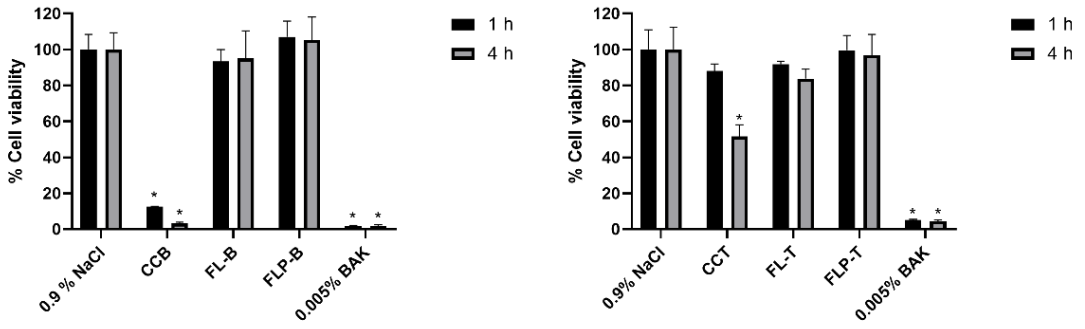

Figure 2. *In vitro* toxicity evaluation in human corneal hTERT-HCECs cells of liposomal formulations containing brimonidine (FL-B and FLP-B) (**A**) or travoprost (FL-T and FLP-T) (**B**) after 1 and 4 h exposure. FL-B: Brimonidine 0.2%, DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%; FLP-B: Brimonidine 0.2%, DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, Vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%, HPMC 0.2%. FL-T: 40 µg/mL, DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%; FLP-T: Travoprost 40 µg/mL, DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%, HPMC 0.2%. * Statistically significant difference with respect to the negative control ($p < 0.05$).

The data of cell viability obtained for the formulations containing travoprost was also higher for the liposomal formulations, all of them being above 80% (FL-T: 91.78 ± 1.63% after 1 h and 83.8 ± 5.31% after 4 h; FLP-T: 99.67 ± 8.06% after 1 h and 96.76 ± 11.71% after 4 h) in comparison to the data obtained for the marketed eye-drop (CCT: 87.97 ± 3.90% after 1 h and 51.55 ± 6.47% after 4 h) (Figure 2).

The 1-h exposure showed no significant differences between the CCT and FL-T formulations ($p = 0.067$), although resulted as being significant between the CCT and FL-P formulations ($p = 0.046$). In the 4-h exposure assays, both liposomal formulations showed significant differences compared with the commercial formulation CCT ($p = 0.003$ for FL-T and $p = 0.004$ for FLP-T). Furthermore, as it can be seen, the inclusion of HPMC appeared to produce a slight increase in cell viability, although the difference with the liposomal formulation without HPMC was not significant ($p > 0.05$).

3.3.2 *In Vitro* Tolerance Evaluation in Human Conjunctival Cells

After obtaining suitable values of cell viability with liposomal formulations in corneal cells, these were also tested on human conjunctival cells (IM-HConEpiC) (Figure 3). As in the *in vitro* tolerance tests on corneal cells, 0.9% NaCl was used as a negative control. The resulting cell viability upon exposure of the FL-B and FLP-B formulations for 1 h was above 90% in both formulations, being 93.02 ± 4.53% for FL-B and 97.61 ± 2.59% in the case of FLP-B. On the other hand, cell viability after 4 h of exposure was above 89% for the liposomal formulations with and without polymer (89.8 ± 6.82% and 91.89 ± 5.04%, respectively).

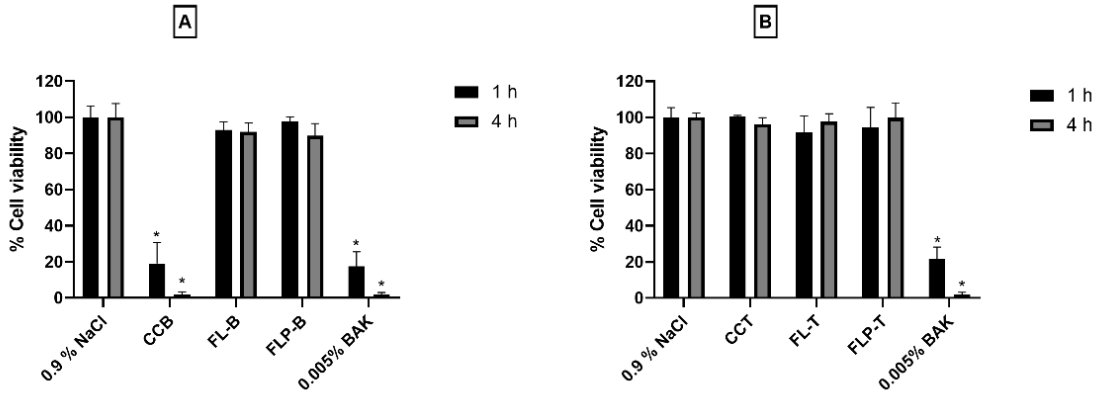

Figure 3. *In vitro* toxicity evaluation in human conjunctival cells of liposomal formulations containing brimonidine (FL-B and FLP-B) (**A**) or travoprost (FL-T and FLP-T) (**B**) after 1 and 4 h exposure. FL-B: Brimonidine 0.2%, DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%; FLP-B: Brimonidine 0.2%, DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, Vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%, HPMC 0.2%. FL-T: 40 µg/mL, DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%; FLP-T: Travoprost 40 µg/mL, DOPC 7.5 mg/mL, DMPC 2.5 mg/mL, vitamin E 0.1 mg/mL Ubiquinol 0.025 mg/mL, Taurine 0.5%, Ribitol 0.5%, HPMC 0.2%. * Statistically significant difference with respect to the negative control ($p < 0.05$).

Under the same experimental conditions, a cell viability value of 91.78 ± 9.02% was obtained for the FL-T formulation and 94.37 ± 11.13% for FLP-T after 1 h of exposure. Furthermore, when the exposure was 4 h, cell viability did not decrease for either

formulation (97.67 ± 4.41% and 99.88 ± 8.23%, respectively). Thus, in all cases, cell viability remained above 90%, exceeding 95% with an exposure of 4 h (Figure 3). No statistically significant differences were observed between the liposomal formulations of either brimonidine or travoprost ($p > 0.05$). There was also no difference between the commercial formulation of travoprost (CCT) and the liposomal formulations or the negative control. However, the commercial formulation of brimonidine (CCB) produced a statistically significant decrease in cell viability at both 1 and 4 h ($p < 0.05$).

3.3.3 Osmoprotection Studies

For osmoprotection studies, a hyperosmolar stress model was used to detect the osmoprotective activity of different substances. To this, a pre-treatment with the formulations was performed for 4 h, and then the cells were subjected to a chronic 16-h hyperosmolar stress. When the cells were pre-exposed to the liposomal formulations with and without polymer, there was a statistically significant ($p < 0.05$) increase in cell viability for all formulations after the hyperosmolar stress induction compared to the positive control (pre-treatment with 0.9% NaCl) (Figure 4).

Viability data after hyperosmolar stress in the assay performed to evaluate the brimonidine formulations were as follows: FL-B (28.96 ± 6.02%), FLP-B (32.60 ± 7.75%), and NaCl 0.9% (16.38 ± 4.93%). The liposomal formulation produced a significant increase in cell viability compared to the positive control ($p < 0.05$). Moreover, when HPMC was added to the formulation, the increase in cell viability resulted as being higher and being statistically significant compared to the positive control ($p < 0.005$), although there was no significant difference between formulations. These results mean an increase in the cell viability after hyperosmolar stress of 12.6% and 16.2% when the cells were pre-exposed to FL-B and FLP-B, respectively.

In the case of formulations, including travoprost, the viability results in stressed cells were the following: FL-T (22.40 ± 2.08%), FLP-T (26.27 ± 5.52%), and NaCl 0.9% (14.87 ± 0.47%). Liposomal formulations promoted a significant increase ($p < 0.05$ and $p < 0.005$ for FL-T and FLP-T, respectively) of cell viability compared to NaCl in the hypertonic stress conditions. Accordingly, both formulations showed superior osmoprotective activity with the addition of HPMC. The increase in cell viability after hyperosmolar

stress was 7.55% and 11.4% when the cells were pre-exposed to FL-T and FLP-T, respectively.

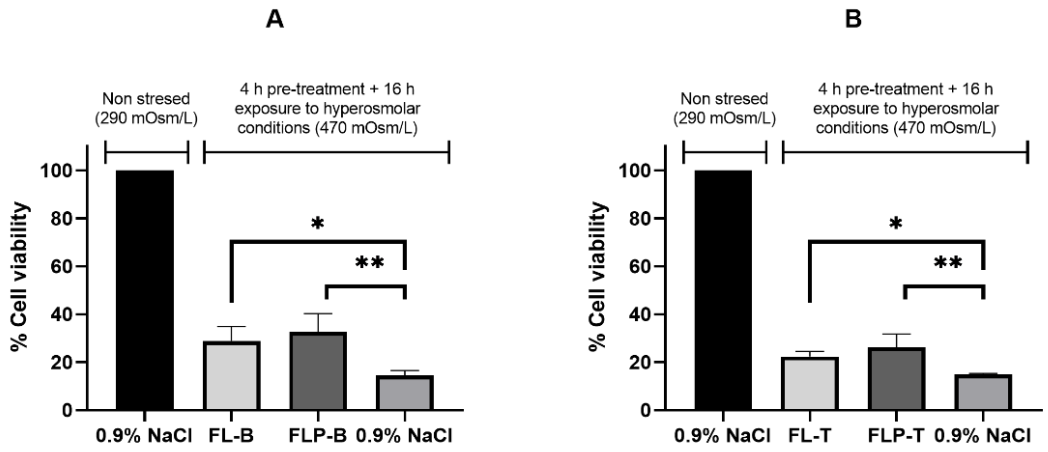

Figure 4. Osmoprotective effect after liposomes pre-incubation during 4 h and exposure to a 470 mOsm/L NaCl solution during 16 h. Evaluation of liposomal formulations containing brimonidine (**A**) or travoprost (**B**) in hTERT-HCECs cells (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$).

3.4 *In Vivo* Hypotensive Efficacy Studies

3.4.1 Brimonidine Liposomal Formulations

The potential reduction in intraocular pressure observed in rabbits receiving the liposomal formulations was evaluated and compared to that produced by the marketed reference formulations. Previously, it was shown that unloaded liposomal formulations, without and with HPMC (FL and FLP), had no effect on the intraocular pressure of the animals since, upon instillation, they produced intraocular pressure values statistically similar ($p > 0.05$) to the values obtained before installation and considered as 100% IOP.

As shown in Figure 5, when comparing the commercial with the FL-B formulation, a maximal reduction in intraocular pressure 2 h after instillation was observed in both cases, however, the hypotensive effect onset occurred faster for FL-B (1h for the liposomal formulation and at 2 h for the marketed one). This was corroborated by the statistical treatment, so one hour after administration of the brimonidine commercial preparation (CCB) the intraocular pressure remained at 94.15 ± 8.21% compared to the IOP at

baseline (100%), not being statistically different (p = 0.051, CI95 (88.28–100.02)), and the Onset time (t onset) was not until 2 h of administration (p < 0.0001, CI95 (57.48–69.38)). In contrast, liposomal formulation FL-B showed an IOP of 80.90 ± 7.29% 1 h after the administration compared to baseline, which means a significant decrease (p < 0.0001, CI95 (75.69–86.12)). The inclusion of HPMC in the formulation (FLP-B) kept this similar initial behavior of the liposome formulation (Figures 6 and 7), also showing an onset of action one hour after instillation, with a reduction of the intraocular pressure to 84.26 ± 5.05% (p < 0.0001, CI95 (80.65–87.87)). Furthermore, the maximum effect after was also observed after two hours of administration.

Regarding the maximum IOP reductions (ΔIOP_{max}), the results (mean ± SD) were 36.57 ± 8.33, 40.85 ± 7.11, and 45.57 ± 5.05 for CCB, FL-B, and FLP-B formulations, respectively, showing significant differences between CCB and FLP-B (p = 0.009), demonstrating a beneficial effect on the IOP reduction by combining the use of liposomes and HPMC.

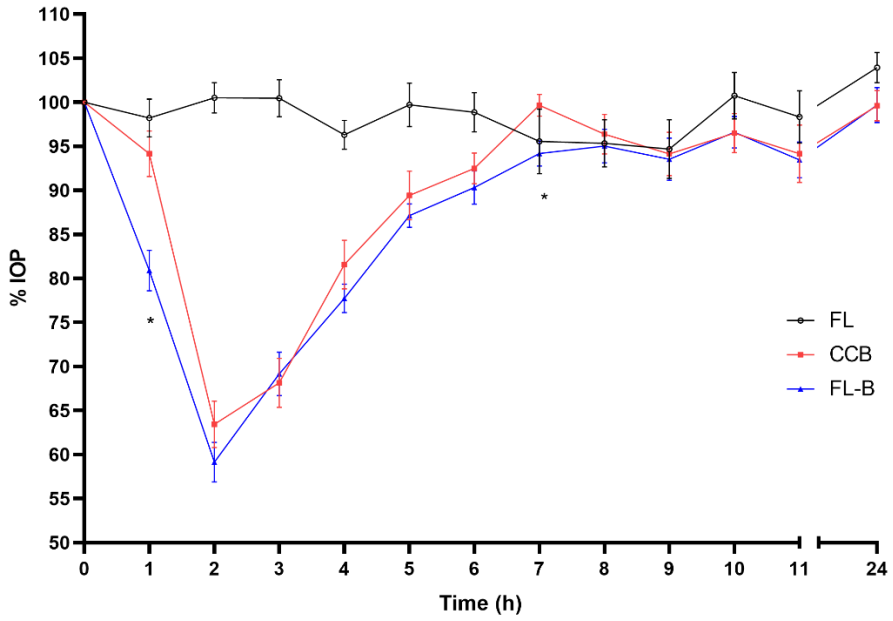

Figure 5. Decrease in intraocular pressure after administration of the liposomal formulation containing brimonidine (0–24 h), with statistical significance between CCB and FL-B formulations (* p < 0.05).

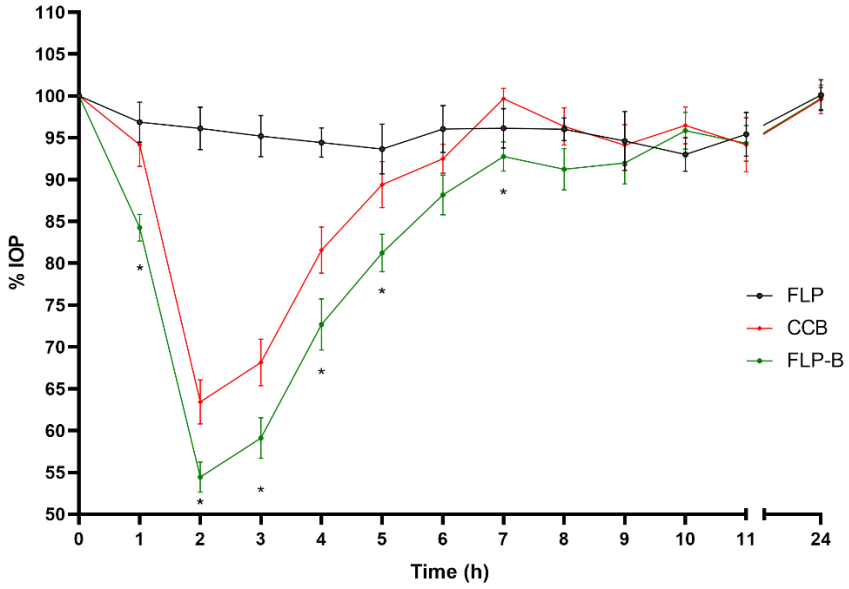

Figure 6. Decrease in intraocular pressure after administration of the liposomal formulation containing brimonidine and HPMC (0–24 h), with statistical significance between CCB and FLP-B formulations (* $p < 0.05$).

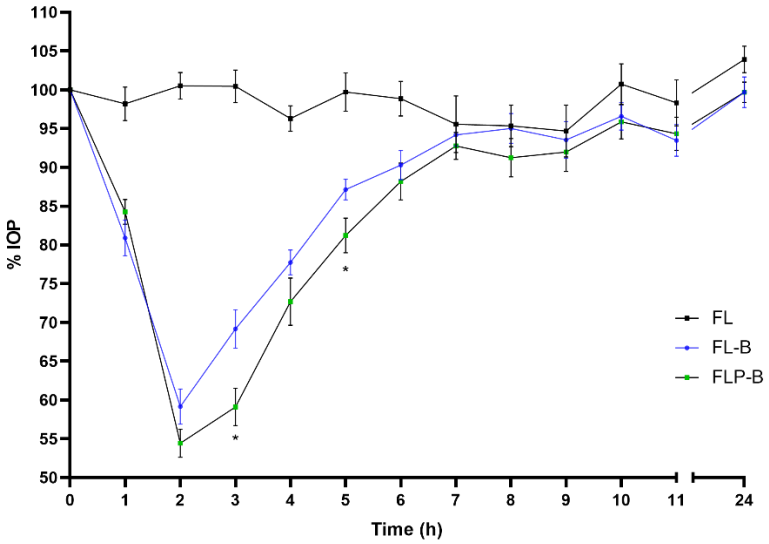

Figure 7. Decrease in intraocular pressure after administration of the liposomal formulation containing brimonidine and HPMC (0–24 h), with statistical significance between FL-B and FLP-B formulations (* $p < 0.05$).

The formulation of brimonidine in liposomes provoked an increment in the hypotensive effect time period. Seven hours post-instillation, IOP values produced by the commercial formulation CCB (99.66 ± 3.92%) were no longer significant with respect to 100% IOP

(p = 0.79; CI95 (96.86–102.46)). On the contrary, 9 h after the administration, the liposomal formulations FL-B and FL-P still showed an IOP of 93.53 ± 7.55% (p = 0.02; CI95 (88.13–98.93)) and 91.99 ± 7.92% (p = 0.02; CI95 (86.32–97.66)), respectively, which means a statistically significant prolongation of the effect. At 10 h, the differences were no longer significant for FL-B and FLP-B. Based on these results, it was decided to analyze the area under the curve between time 0 and time 10 h ($AUC_{0–10h}$) (Figure 8). The $AUC_{0–10h}$ results expressed in mean ± standard deviation (SD) were as follows: CCB: 122.44 ± 37.26; FL-B: 154.62 ± 29.48, and FLP-B: 186.19 ± 38.03.

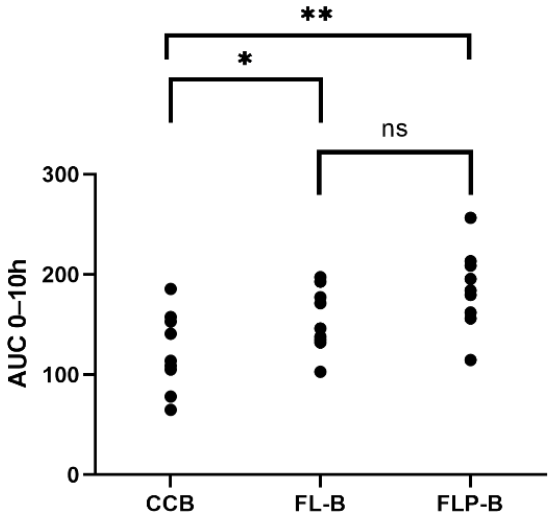

Figure 8. Area under curve values from time 0 h to time 10 h obtained after the instillation of the different formulations, representing the value of each eye. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ^{ns} Non Significant.

Subsequently, a determination was made of the differences between the $AUC_{0–10h}$ and the ΔIOP_{max} obtained for each formulation (Supplementary material Tables S1–S3). When comparing the $AUC_{0–10h}$ values, it was observed that both FL-B (p = 0.045) and FLP-B (p = 0.001) showed a significant difference compared to commercial formulation. The ocular bioavailability for FL-B and FLP-B, evaluated as the corresponding $AUC_{0–10h}$, resulted in being 1.3 and 1.5 times higher, respectively, than after instillation of CCB. Between the two liposomal formulations (with and without HPMC), a slight, but not significant (p = 0.053), difference was observed.

3.4.2 Travoprost Liposomal Formulations

The effect in IOP reduction was more extended but less pronounced using travoprost formulations. Efficacy studies of the hypotensive effect of the formulations prepared with travoprost could be extended up to 48 h after the single administration (Figures 9–11). At neither of these long times was any hypotensive effect of the unloaded liposomal formulations (FL and FLP) observed ($p > 0.05$).

Differences were observed between the commercial formulation and the liposomal formulations (FL-T and FLP-T) loaded both with travoprost, showing a clear improvement in efficacy over CCT in several aspects. Firstly, the onset time of the hypotensive effect was shorter for the liposomal formulations. As can be seen in Figures 10 and 11, 1 h after CCT administration the IOP was still 97.07 ± 9.08%, which was not statistically significant ($p = 0.334$, CI95 (90.57–103.57)) compared to the initial IOP (100%). It was not until 2 h after administration when the IOP significantly decreased to 88.61 ± 5.36% ($p < 0.0001$, CI95 (84.78–92.44)) compared to baseline. By contrast, administering the liposomal formulations the IOP decreased significantly in only 1 h after administration in both cases, being 88.93 ± 4.92 ($p < 0.0001$, CI95 (85.41–92.45)) and 86.39 ± 3.60 ($p < 0.0001$, CI95 (83.81–88.97)) for FL-T and FLP-T, respectively.

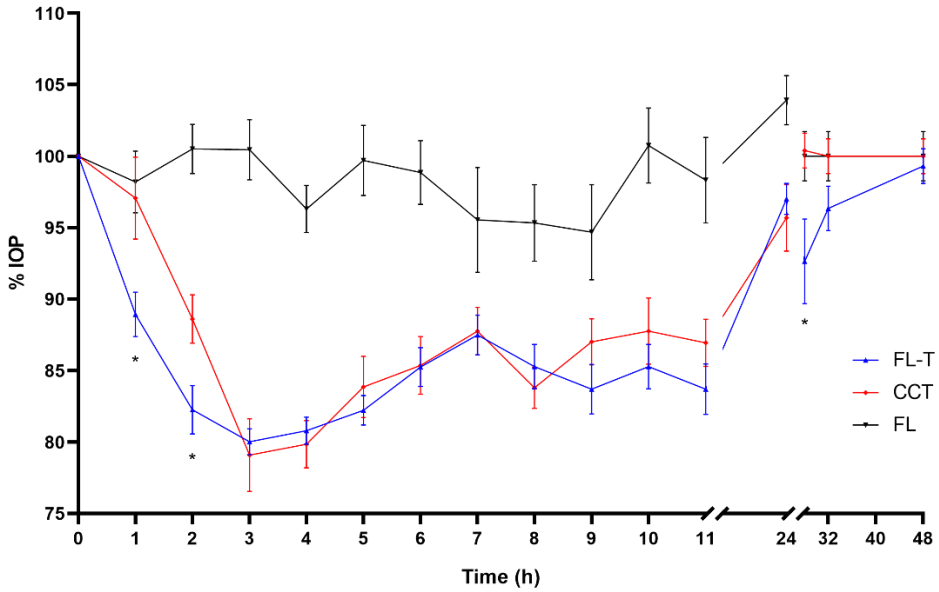

Figure 9. Decrease in intraocular pressure after administration of the liposomal formulation containing travoprost (0–48 h), with statistical significance between CCT and FL-T formulations (* $p < 0.05$).

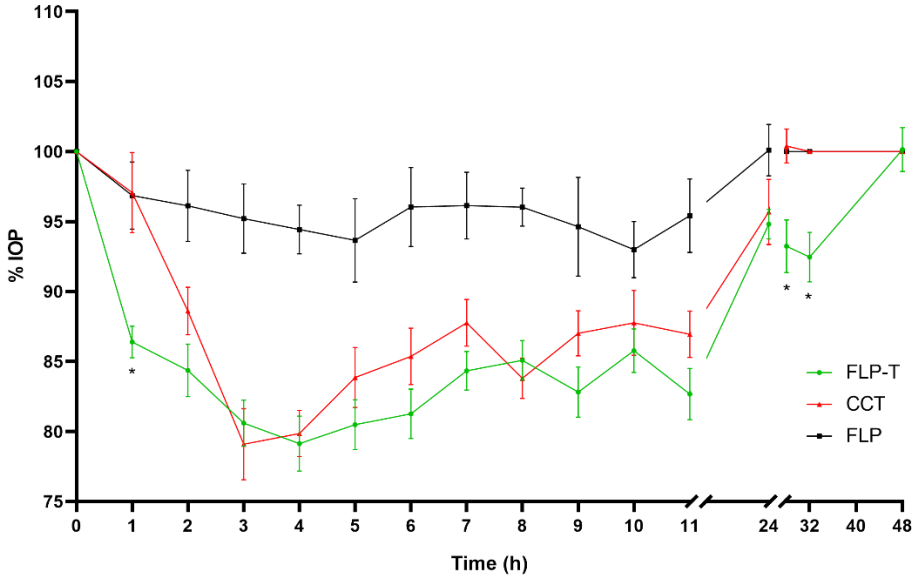

Figure 10. Decrease in intraocular pressure after administration of the liposomal formulation containing travoprost and HPMC (0–48 h), with statistical significance between CCT and FLP-T formulations (* $p < 0.05$).

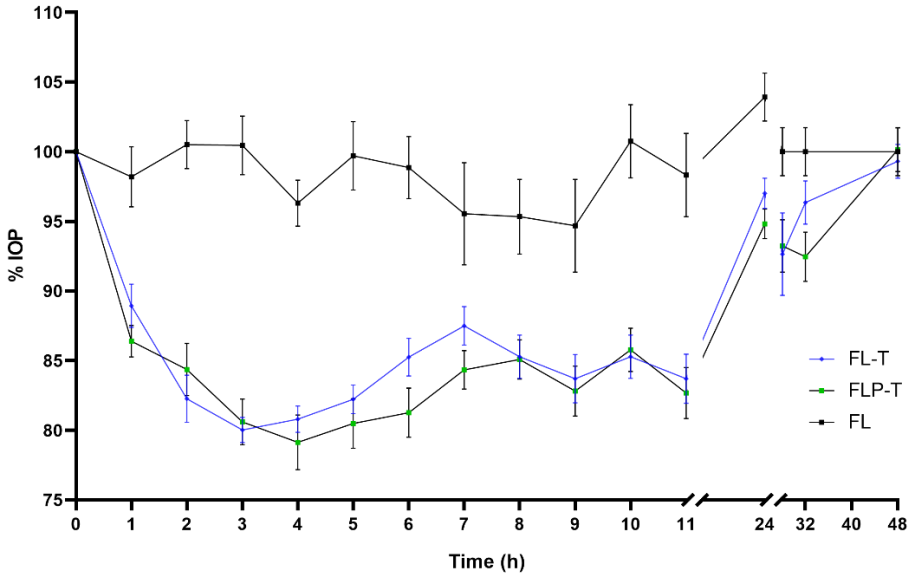

Figure 11. Decrease in intraocular pressure after administration of the liposomal formulation containing travoprost and HPMC (0–48 h), with statistical significance between FL-T and FLP-T formulations (* $p < 0.05$).

Secondly, significant improvements were also observed in the duration of IOP reduction. When rabbits were treated with the commercial formulation, 24 h after administration the IOP still showed a reduction of 94.31 ± 7.39% compared to baseline, however this was

not significant (p = 0.098, CI95 90.40–100.97)). In contrast, liposomal formulations FL-T and FLP-T still both showed a statistically significant reduction 32 h after administration: The IOP remained at 96.35 ± 4.90% (p = 0.043, CI95 (92.88–99.85)) and 92.46 ± 5.57% (p = 0.002, CI95 (88.47–96.44)), respectively. No significant differences were observed for any formulation at 48 h after administration.

Furthermore, an improvement in ocular bioavailability was also observed, calculated as the areas under the curve of IOP reduction effect between time 0 and 48 h ($AUC_{0–48h}$) (Figure 12). The $AUC_{0–48h}$ were as follows (mean ± SD): 258.54 ± 117.99 for CCT; 388.58 ± 117.66 for FL-T; 442.69 ± 133.20 for FLP-T. Subsequently, a determination was made of the differences between the $AUC_{0–48h}$ (Supplementary material Tables S4–S6), the CCT data being statistically lower than the liposomal formulations (p = 0.023 and p = 0.004 for FL-T and FLP-T, respectively). However, the difference was not found to be significant when compared the areas of the two liposomal formulations (p = 0.348). According to these calculations, it can be said that the ocular bioavailability of FL-T and FLP-T were 1.5 and 1.7 times greater than CCT, respectively.

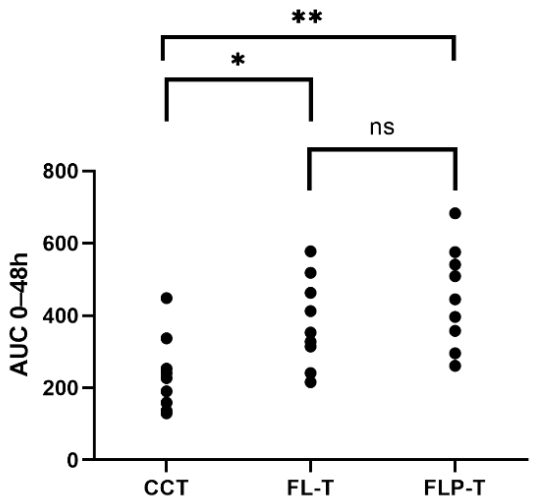

Figure 12. Area under curve from 0 to 48 h of the different formulations, representing the value of each eye. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ^{ns} Non Significant.

However, regarding the ΔIOP_{max} (Supplementary material Tables S4–S6), no significant differences were observed between the 3 formulations (CCT: 20.91 ± 8.03; FL-T: 19.97 ± 2.87; FLP-T 20.86 ± 6.19 expressed in mean ± SD). While for the commercial formulation and the FL-T formulation showed a maximum IOP reduction at 3 h, for the

FLP-T formulation it was at 4 h. Apparently, this formulation, which contained HPMC, showed a more gradual and prolonged effect.

4 Discussion

The potential of liposomes as drug delivery systems for ocular surface is enormous and increasingly evident. They are investigated to treat pathologies of the ocular surface itself, as is the case for numerous ocular surface infections, as well as for anesthesia [9] and to increase ocular bioavailability in the anterior segment of the eye [40]. In this sense, several authors have explored the possibility of combining hypotensive agents with liposomes to reduce intraocular pressure, such as latanoprost [41] or acetazolamide [42] loaded into soy phosphatidylcholine liposomes.

Furthermore, liposomes have been also evaluated for the development of artificial tears to treat dry eye [9], with or without active ingredients [43]. In fact, there are already artificial tears based in liposomes in the market [44]. The aim of our study was to create liposomes loaded with antihypertensive agents included in an osmoprotective vehicle able to control the IOP while preventing the adverse effects of the medication, which can cause damage to the ocular surface [31] as summarized in Figure 13.

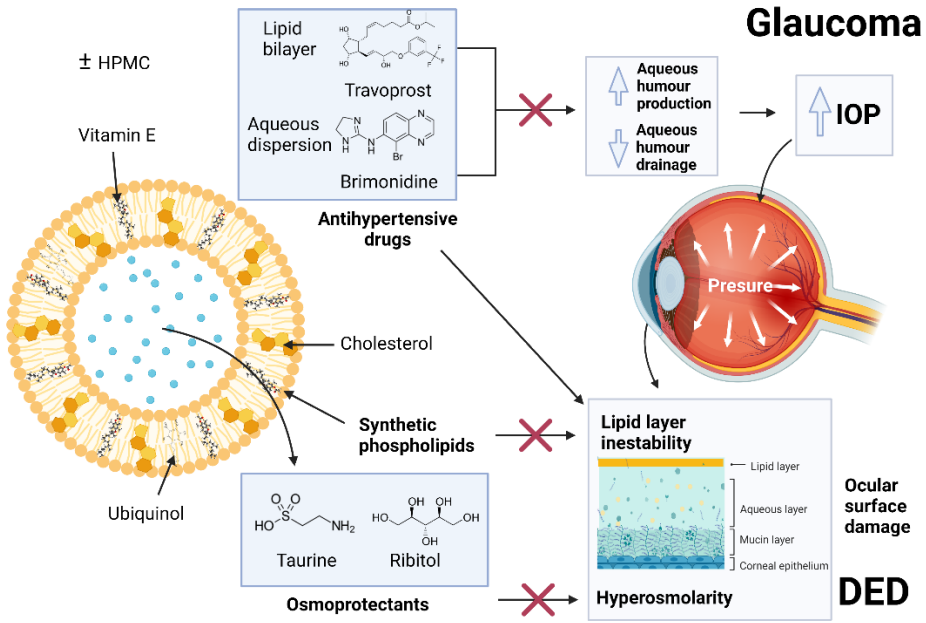

Figure 13. Liposome structure and mechanism for the treatment of glaucoma and prevention of dry eye.

The formulations developed included the synthetic phospholipids DOPC and DMPC in their composition. In the literature, numerous authors, including our research group, have used phosphatidylcholine for liposome formation. In addition to being well tolerated [36,45], phosphatidylcholine is one of the major components of the ocular surface [46]. However, despite their advantages, the composition of natural phosphatidylcholines is not exactly known, which can attract reproducibility issues, among others. In this work we decided to use neutral synthetic phospholipids (DOPC and DMPC) with homogenous fatty acid composition for liposome preparation, which have been shown to be well tolerated in topical administration [47]. A great number of studies have been carried out with synthetic phospholipids for the preparation of liposomes showing good stability [48]. Additionally, DOPC has a similar transition temperature to phosphatidylcholine (approximately −16.5 °C) [49], and the addition of DMPC, which has a higher transition temperature [50], can increase the rigidity of liposomes. The antioxidant capacity of DOPC is also remarkable [51]. Previously, liposomes composed of these synthetic phospholipids had been tested by our research group in terms of *in vitro* tolerance in ocular surface cells with and without antioxidant and osmoprotective compounds [47].

Our liposomal formulations were composed by several components with antioxidant and osmoprotective activity. Antioxidant compounds were included in the lipid bilayer, in addition to cholesterol, this last one providing rigidity to liposomes [52]. Vitamin E is a well-known hydrophobic antioxidant, traditionally included in liposomes to preserve from lipid peroxidation [53]. Additionally, ubiquinol was also included in the formulation, whose antioxidant properties have been already described by several authors [54]. Regarding the additional protection to avoid the development of DED, ribitol, considered a cryoprotectant compound [23,55], as well as osmoprotectant [56], was included in the vehicle. In addition, taurine was also added. Several studies have demonstrated a significant osmoprotective and antioxidant effect in corneal epithelial cells for this aminoacid [57]. In fact, it has already demonstrated an osmoprotective activity in a hyperosmolar model in corneal cells developed by our group [38]. The osmoprotective activity of these substances were also demonstrated in this work using a hyperosmolar model in corneal cells. The use of a borate buffer allows the maintenance of the pH, and also acts as a preservative of the formulation due to its antimicrobial capacity reported by other authors [58].

All the liposomal formulations were designed to offer physicochemical characteristics suitable for administration on the ocular surface (Table 2). In addition, the vesicle size resulted close to 200 nm, which allows for decreased immunogenicity and evasion of phagocytosis uptake [9]. The increase in size observed after HPMC addition could be explained by the coating of the liposomal vesicles with the polymer, a fact previously reported by other authors [4]. The zeta potential was neutral for all the formulations (−10–10 mV). The surface tension for all formulation was below the values observed in tear film for normal individuals and patients with DED (43.6 ± 2.7 mN/m and 49.6 ± 2.2 mN/m respectively), which allows the formulation to be well extended in the ocular surface [46]. Regarding the viscosity, the tear film values fall within 1–8.3 mPa·s, so the values of our formulations (Tables 2 and 3) were found to be within the range [9]. As previously mentioned, the hypotonicity of the formulations will also counteract the effect of the hypertonicity present in the DED [21].

All the brimonidine initially included for preparation of the formulations was found in the formulation FL-B, while around 11% of travoprost was lost during preparation of liposomal formulation (FL-T). This difference can be explained by the preparation method of the liposomal formulations: Brimonidine was incorporated as an aqueous solution into the lipid layer formed in the round-bottom flask, thus being less subject to losses. However, travoprost is incorporated into the chloroform solution together with other oily components to form the lipid layer. This means that it will be more subject to losses in fabrication, as it must be mechanically incorporated into the aqueous dispersion. Regarding the encapsulation efficiency, for FL-B it was 24.80 ± 0.32%, while for FL-T it was ≥99.01%, which can be easily explained by the nature of the active ingredients. Brimonidine, a water-soluble active ingredient, was distributed into both the aqueous dispersion, and the aqueous core inside the liposomes [59], travoprost, which is liposoluble in nature, was incorporated entirely into the lipid bilayer.

In vitro tolerance studies of the formulations resulted in all liposomal formulations in cell viability values higher than 80% then being over the “good tolerance” limit. This provides us with very promising results, as the studies were conducted on two human cell lines present on the ocular surface: cornea and conjunctiva [60].

In the studies carried out in human corneal hTERT-HCECs cells, the cell viability of our formulations was compared with commercial formulations of both active ingredients

(CCB and CCT), because the human corneal line is sensitive enough to show differences in the tolerance. In the case of CCB (Figure 2), cell viabilities were much lower (less than 15% cell viability in only one hour of exposition), probably due to the use of the preservative BAK, which has been shown to be toxic to the ocular surface [31,61]. The same can be observed in conjunctival cells for the CCB formulation (Figure 3), with a significant decrease in cell viability ($p < 0.05$) after only one hour of exposure. The commercial formulation containing travoprost (CCT), despite not containing this preservative, showed a cell viability of approximately 50% after 4 h of exposure in human corneal cells (Figure 2). Therefore, our liposomal formulations seem to be of great advantage in maintaining the integrity of the ocular surface, as cell viability was considerably higher. In addition, cell viability values for formulations with HPMC polymer (FLP-B and FLP-T) outperformed those without HPMC (FL-B and FL-T), with cell viability values higher than 95%. These results agree with previous research, in which HPMC has shown to have protectant activity in corneal and conjunctival cells [38,62]. Considering the extensive literature on the adverse effects of antiglaucomatous formulations [63–65], the fact that our formulations show such a high tolerance in cornea and conjunctiva cells would be a great advantage, both to reduce the side effects and to avoid the development of dry eye symptoms.

To complete the tolerance study in ocular surface cells, conjunctival cells were used. When exposed the formulations to conjunctival IM-HConEpiC cells, a minimum of 89% viability was obtained in all conditions for liposomal formulations. Very relevant results were obtained, especially in the case of travoprost formulations (FL-T and FLP-T), where more than 97% viability was achieved after 4 h of exposure. This, together with the promising cytotoxicity results observed in corneal cells, leads us to believe that these formulations could be good candidates for the safe administration of drugs on the ocular surface treatment of ocular pathologies.

The high correlation between topical glaucoma treatment and damage to the ocular surface [66] leading to DED, makes the development of novel formulations able to protect the ocular surface from the damage created in this type of chronic treatment necessary. As it has been widely described in the literature, hyperosmolarity plays a crucial role in DED. Increased tear evaporation or decreased tear production in the DED will increase the osmolarity of the tear film [20]. This increase in osmolarity will trigger inflammatory

processes and damage to the corneal epithelium and conjunctiva, which are worsened by the inflammation in a vicious cycle [21], as extensively explained in the introduction.

In vitro osmoprotection studies could help to select excipients and to test formulations as preliminary studies. Our group has developed an *in vitro* model in corneal cells capable of simulating hyperosmolar stress [38]. In this model, a 16-h exposure to a 470 mOsm/L hyperosmolar solution was used to simulate hyperosmolar stress. This exposure resulted in a decrease in cell viability, as well as a related increase in apoptosis in corneal cells. In addition, by pre-exposure to different substances, this model allows us to sensitively detect the osmoprotection activity produced by different excipients or formulations.

The results demonstrated a significant increase in cell viability of human corneal cells when, prior to hyperosmolar stress (16 h), they were pre-exposed for only 4 h to the proposed liposomal formulations. For all of them the increase in cell viability was statistically significant with respect to the positive control ($p < 0.05$), in which the pre-exposure was carried out with NaCl 0.9% (Figure 4). In both cases (brimonidine and travoprost liposomal formulations), the inclusion of 0.2% HPMC in the vehicle statistically increased the osmoprotective activity ($p < 0.005$ for FLP-B and FLP-T). Therefore, at least *in vitro*, FLP-B and FLP-T appeared to have superior osmoprotective activity than FL-B and FL-T. These results agree with previous studies conducted by our group, where HPMC was shown to have osmoprotective activity in human corneal cells [38]. HPMC, in addition to being reported to protect ocular surface cells [62], has been shown in previous work to increase the bioavailability of liposome-encapsulated drugs [4]. The significant increase in cell viability with short periods of exposure (only 4 h) before the hyperosmolar stress suggests a high osmoprotectant activity, which would be higher in chronic treatments. *In vitro* osmoprotective capacity shown by our liposomal formulations (FL-B, FLP-B, FL-T, and FLP-T) is promising, as it could protect the ocular surface from damage caused by the hyperosmolarity of dry eye, preventing its symptoms, while treating the increased IOP associated with glaucoma.

In vivo efficacy studies have been performed to assess the hypotensive effect of two hypotensive agents of different polarity (a hydrophilic compound such as brimonidine or a hydrophobic compound such as travoprost) both included in liposomal formulations with or without HPMC in the vehicle. In addition, the hypotensive activity of two commercial formulations containing these same active agents was also evaluated. The

European Agency for the Evaluation of Medicines for Human Use recommended the use of 95 confidence intervals and a *p*-value <0.05 to establish differences between formulations [67]. Consequently, these were our criteria for evaluating the treatments.

Formulations containing brimonidine had a more intense but shorter effect than those containing travoprost, which is due to the different mechanism. This behavior is well known and is due to the different mechanisms of action of each of the active agents [6,68].

Analyzing the effect of the brimonidine-containing formulations, we found that our liposomal formulations had a shorter t onset of effect than the commercial formulation (1 h for FL-B and FLP-B vs. 2 h for CCB). The effect of all formulations showed a maximum effect at 2 h after administration, with the reduction in IOP being approximately 40%. This is consistent with observations by other authors, who found that brimonidine has a rapidly ocular surface penetration, with the greatest effect in the first 5 h [69]. As discussed in Section 3.4.1, the ΔIOP_{max} was higher in the treatment with liposomal formulations than with CCB, being significantly greater in the case of the FLP-B formulation versus CCB ($p = 0.009$). The duration of effect was 7 h for CCB and 10 hs for the liposomal formulations (FL-B and FLP-B) and the ocular bioavailability, calculated as the $AUC_{0–10h}$, was 1.3 and 1.5 times higher for FL-B and FLP-B compared to CCB, respectively, showing in both cases significant differences ($p < 0.05$). Therefore, the inclusion of part of the brimonidine in liposomal vesicles allowed for a faster, greater, and longer effect. It is noteworthy that our liposomal formulations do not contain BAK, unlike the commercial CCB formulation. BAK causes damage to the cornea but also leads to increased penetration of drugs through the cornea [70], so overcoming the effects on IOP produced by the CCB formulation is even more promising, in addition to providing better tolerance in ocular surface cells.

The commercial formulation containing travoprost (CCT) is a novel emulsion composed of aqueous and oily components. However, the adverse effects of this formulation were notable. Indeed, in other works it has been shown that these commercial formulations are cytotoxic in human conjunctival cells [71]. The CCT formulation contains different co-solvents in its composition, which may increase the penetration of the active compound, but also the toxicity of the formulation.

The *in vivo* efficacy studies of the travoprost formulations proposed in this work showed that the onset time was also faster when travoprost was formulated in liposomes compared to the commercial formulation (CTT). In this case it was also 1 h for FL-T and FLP-T and 2 h for CCT. On the other hand, the duration of effect was much longer (48 h) for FL-T and FLP-T formulations, which outperformed the 28 h of effect observed with CCT. If we focus on the $AUC_{0–48h}$ of the IOP reduction effect as measurement of the ocular bioavailability [72,73], we found that for the liposomal formulations FL-T and FLP-T it was 1.5 and 1.7 times higher than for CCT, respectively. Moreover, the differences between the $AUC_{0–48h}$ of CCT vs. FL-T (Table S5) and CCT vs. FLP-T (Table S6) were statistically significant ($p < 0.05$). As discussed above, although a higher increase in the $AUC_{0–48h}$ for FLP-T was observed, no significant differences were found between the two liposomal formulations. The longer duration of effect of these travoprost-containing liposomal formulations compared to the commercial formulation could be due to the liposoluble nature of travoprost. In fact, the encapsulation efficiency of travoprost was ≥99.01%, meaning that virtually all the active substance was in the lipid bilayer, which could increase internalization by the cells, improving the effect compared to commercial formulation CCT [12]. Although the hypotensive effect did not increase dramatically, the improvement of the effect, together with the remarkably better *in vitro* tolerance than the commercial formulations in ocular surface cells and their osmoprotective capacity, show the promise of liposomal formulations. The superiority of FLP-B and FLP-T vs. FL-B and FL-T in IOP reduction is consistent with the observations of other authors, who reported improved bioavailability with the use of HMPC in their formulations [4,74]. Additionally, as discussed above, the use of HPMC has been described as protective for the ocular surface, which is consistent with the higher osmoprotective activity of these two formulations discussed previously. Therefore, FLP-B and FLP-T appear to have major advantages for the treatment of glaucoma and the improvement of DED symptoms related with topical antihypertensive treatment.

5 Conclusions

The liposomal formulations loaded with both active ingredients (brimonidine and travoprost) developed in our study showed suitable physiochemical characteristics for administration onto the ocular surface, an excellent *in vitro* tolerance, significantly superior to commercial formulations, osmoprotective properties in a hyperosmolar stress model in human corneal cells, and faster and longer *in vivo* hypotensive efficacy in normotensive New Zeland albino rabbits compared to commercial formulations. Therefore, liposomal formulations were good candidates for glaucoma treatment while providing ocular surface protection, especially the HPMC-containing formulations (FLP-B and FLP-T), which showed a greater osmoprotective effect on corneal cells, as well as slight improvements in the hypotensive effect compared to those without polymer.

Funding

This research was funded by the FEDER-CICYT European funding (Fondo Europeo de Desarrollo Regional), grant number FIS-PI17/00079-PI17/00466, the UCM 920415 Research Group "Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development in Ophthalmology (InnOftal)", the MSCA-RISE-3DNEONET 734907 and the ISCII-FEDER RETICS (OFTARED) RD16/0008/0004 and RD16/0008/0009.

Acknowledgments

M.A.G.-C. thanks for the PhD Spanish MECD fellowship (Reference FPU18/03445). Figure 13 were created with Biorender.

6 Supplementary Materials

Table S1. Relationship between the two mean difference test (P-value of Student's test) and confidence intervals for the difference of the means. CCL and FL-B.

	P-Value for H0: Difference = 0	95% Confidence Interval
Maximal IOP reduction (%)	0.232	(-3.00< FL-B – CCB <11.56)
$AUC_{0–10h}$ (%·h)	0.045	(0.65 < FL-B – CCB < 63.78)

Table S2. Relationship between the two mean difference test (P-value of Student's test) and confidence intervals for the difference of the means. CCL and FLP-B.

	P-Value for H0: Difference = 0	95% Confidence Interval
Maximal IOP reduction (%)	0.009	(2.52< FLP-B – CCB < 15.47)
$AUC_{0–10h}$ (%·h)	<0.001	(18.37 < FLP-B – CCB < 99.12)

Table S3. Relationship between the two mean difference test (P-value of Student's test) and confidence intervals for the difference of the means. FL-B and FLP-B.

	P-Value for H0: Difference = 0	95% Confidence Interval
Maximal IOP reduction (%)	0.104	(-10.51 < FLP-B– FL-B <1.07)
$AUC_{0–10h}$ (%·h)	0.053	(-0.39 < FLP-B– FL-B < 63.55)

Table S4. Relationship between the two mean difference test (P-value of Student's test) and confidence intervals for the difference of the means. CCT and FL-T.

	P-Value for H0: Difference = 0	95% Confidence Interval
Maximal IOP reduction (%)	0.889	(-14.96< FL-T – CCT < 13.08)
$AUC_{0–48h}$ (%·h)	0.023	(19.33 < FL-T – CCT <240.74)

Table S5. Relationship between the two mean difference test (P-value of Student's test) and confidence intervals for the difference of the means. CCT and FLP-T.

	P-Value for H0: Difference = 0	95% Confidence Interval
Maximal IOP reduction (%)	0.988	(-6.79< FLP-T – CCT < 6.68)
$AUC_{0–48h}$ (%·h)	0.004	(65.93< FLP-T – CCT <302.37)

Table S6. Relationship between the two mean difference test (P-value of Student's test) and confidence intervals for the difference of the means. FL-T and FLP-T.

	P-Value for H0: Difference = 0	95% Confidence Interval
Maximal IOP reduction (%)	0.685	(-3.66< FLP-T – FL-T < 5.42)
$AUC_{0–48h}$ (%·h)	0.348	(-63.97< FLP-T – FL-T <172.18)

7 References

1. Meier-Gibbons, F.; Marc, T. Influence of Cost of Care and Adherence in Glaucoma Management: An Update. *J. Ophthalmol.* **2020**, *2020*, 5901537.

2. Tham, Y.; Li, X.; Wong, T.Y.; Quigley, H.A.; Aung, T.; Ed, F.; Cheng, C. Global Prevalence of Glaucoma and Projections of Glaucoma Burden through 2040 A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. Acad. Ophthalmol.* **2014**, *121*, 2081–2090. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.05.013.

3. Matlach, J.; Bender, S.; Binder, H.; Pfeiffer, N.; Hoffmann, E.M. Investigation of Intraocular Pressure Fluctuation as a Risk Factor of Glaucoma Progression. *Clin. Ophthalmol.* **2019**, *13*, 9–16.

4. Gómez-Ballesteros, M.; López-Cano, J.J.; Bravo-Osuna, I.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Osmoprotectants in Hybrid Liposome/HPMC Systems as Potential Glaucoma Treatment. *Polymers* **2019**, *11*, 929. https://doi.org/10.3390/polym11060929.

5. Maier, P.C.; Funk, J.; Schwarzer, G.; Antes, G.; Falck-Ytter, Y.T. Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *BMJ* **2005**, *331*, 134. https://doi.org/10.1136/bmj.38506.594977.E0.

6. Rahman, M.Q.; Ramaesh, K.; Montgomery, D.M. Brimonidine for Glaucoma. *Expert Opin. Drug Saf.* **2010**, *9*, 483–491. https://doi.org/10.1517/14740331003709736.

7. Whitson, J.T. Travoprost—A New Prostaglandin Analogue for the Treatment of Glaucoma. *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3*, 965–977. https://doi.org/10.1517/14656566.3.7.965.

8. Urtti, A. Challenges and Obstacles of Ocular Pharmacokinetics and Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1131–1135. https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.027.

9. López-Cano, J.J.; González-Cela-Casamayor, M.A.; Andrés-Guerrero, V.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Liposomes as Vehicles for Topical Ophthalmic

Drug Delivery and Ocular Surface Protection. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2021**, *18*, 819–848. https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1872542.

10. Abal, P.P. Pharmaceutical Microscale and Nanoscale Approaches for Efficient Treatment of Ocular Diseases. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2016**, *6*, 686–707. https://doi.org/10.1007/s13346-016-0336-5.

11. Herrero-Vanrell, R.; de la Torre, M.V.; Guerrero, V.-A.; Barbosa-Alfaro, D.; Martínez, I.T.-M.; Bravo-Osuna, I. Nano and Microtechnologies for Ophthalmic Administration, an Overview. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2013**, *23*, 75–102. https://doi.org/10.1016/S1773-2247(13)50016-5.

12. Romaní, L.-S.; Vicario-de-la-Torre, M.; Crespo-Moral, M.; López-García, A.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T.; Diebold, Y. Novel Anti-Inflammatory Liposomal Formulation for the Pre-Ocular Tear Film: In Vitro and Ex Vivo Functionality Studies in Corneal Epithelial Cells. *Exp. Eye Res.* **2017**, *154*, 79–87. https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.11.010.

13. Garrigue, J.S.; Amrane, M.; Faure, M.O.; Holopainen, J.M.; Tong, L. Relevance of Lipid-Based Products in the Management of Dry Eye Disease. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2017**, *33*, 647–661. https://doi.org/10.1089/jop.2017.0052.

14. Eibl, H.; Kaufmann-Kolle, P. Medical Application of Synthetic Phospholipids as Liposomes and Drugs. *J. Liposome Res.* **1995**, *5*, 131–148. https://doi.org/10.3109/08982109509039914.

15. Okuda, M.; Yamamoto, Y. Usefulness of Synthetic Phospholipid in Measurement of Activated Partial Thromboplastin Time: A New Preparation Procedure to Reduce Batch Difference. *Clin. Lab. Haematol.* **2004**, *26*, 215–223.

16. José, A.; Orobia, M.; Saa, J.; Lorenzo, A.O.; Herreras, J.M. Combination of Hyaluronic Acid , Carmellose , and Osmoprotectants for the Treatment of Dry Eye Disease. Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ) 2018, 12, 453–461.

17. Contreras-Ruiz, L.; de la Fuente, M.; García-Vázquez, C.; Seijo, B.; Sáez, V.; Alonso, M.J.; Calonge, M.; Diebold, Y. Ocular Tolerance to a Topical Formulation of Hyaluronic. *Cornea* **2010**, *29*, 550–558.

18. Andrés-Guerrero, V. Nuevas Formas de Vehiculización de Agentes Hipotensores Para El Tratamiento Del Glaucoma. Ph.D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 2011.

19. Gipson, I.K. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. The Friedenwald Lecture. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 4391–4398.

20. Bron, A.J.; de Paiva, C.S.; Chauhan, S.K.; Bonini, S.; Gabison, E.E.; Jain, S.; Knop, E.; Markoulli, M.; Ogawa, Y.; Perez, V.; et al. TFOS DEWS II Pathophysiology Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 438–510. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.011.

21. Baudouin, C.; Aragona, P.; Messmer, E.M.; Tomlinson, A.; Calonge, M.; Boboridis, K.G.; Akova, Y.A.; Geerling, G.; Labetoulle, M.; Rolando, M. Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN Group Meeting. *Ocul. Surface* **2013**, *11*, 246–258.

22. Luo, L.; Li, D.Q.; Pflugfelder, S.C. Hyperosmolarity-Induced Apoptosis in Human Corneal Epithelial Cells Is Mediated by Cytochrome c and MAPK Pathways. *Cornea* **2007**, *26*, 452–460. https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318030d259.

23. Hájek, J.; Váczi, P.; Barták, M.; Smejkal, L.; Lipavská, H. Cryoproective Role of Ribitol in Xanthoparmelia Somloensis. *Biol. Plant.* **2009**, *53*, 677–684. https://doi.org/10.1007/s10535-009-0122-z.

24. Bucolo, C.; Fidilio, A.; Bianca, C.; Platania, M.; Geraci, F.; Lazzara, F.; Drago, F. Antioxidant and Osmoprotecting Activity of Taurine in Dry Eye Models. *Journal Of Ocular Pharmacology And Therapeutics* **2017**, *34*, 188–194.

25. Deng, R.; Su, Z.; Hua, X.; Zhang, Z.; Li, D.Q.; Pfugfelder, S.C. Osmoprotectants Suppress the Production and Activity of Matrix Metalloproteinases Induced by Hyperosmolarity in Primary Human Corneal Epithelial Cells. *Mol. Vis.* **2014**, *20*, 1243–1252.

26. Wakamatsu, T.H.; Dogru, M.; Matsumoto, Y.; Kojima, T.; Kaido, M.; Ibrahim, O.M.A.; Sato, E.A.; Igarashi, A.; Ichihashi, Y.; Satake, Y.; et al. Evaluation of Lipid Oxidative Stress Status in Sjögren Syndrome Patients. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 201–210. https://doi.org/10.1167/iovs.12-10325.

27. Schniertshauer, D.; Gebhard, D.; van Beek, H.; Nöth, V.; Schon, J. The Activity of the DNA Repair Enzyme HOGG1 Can Be Directly Modulated by Ubiquinol. *DNA Repair* **2020**, *87*, 102784. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102784.

28. Stern, M.E.; Gao, J.; Siemasko, K.F.; Beuerman, R.W.; Pflugfelder, S.C. The Role of the Lacrimal Functional Unit in the Pathophysiology of Dry Eye. *Exp. Eye Res.* **2004**, *78*, 409–416. https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.003.

29. Wong, A.B.C.; Wang, M.T.M.; Liu, K.; Prime, Z.J.; Danesh-Meyer, H.V.; Craig, J.P. Exploring Topical Anti-Glaucoma Medication Effects on the Ocular Surface in the Context of the Current Understanding of Dry Eye. *Ocul. Surf.* **2018**, *16*, 289–293. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2018.03.002.

30. Zhang, R.; Park, M.; Richardson, A.; Tedla, N.; de Paiva, C.S.; Watson, S.; Wakefield, D.; di Girolamo, N. Dose-Dependent Benzalkonium Chloride Toxicity Imparts Ocular Surface Epithelial Changes with Features of Dry Eye Disease. *Ocul. Surf.* **2019**, *18*, 158–169. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2019.11.006.

31. Actis, A.G.; Rolle, T. Ocular Surface Alterations and Topical Antiglaucomatous Therapy: A Review. *Open Ophthalmol. J.* **2014**, *8*, 67–72.

32. Vicario-de-la-Torre, M.; Caballo-González, M.; Vico, E.; Morales-Fernández, L.; Arriola-Villalobos, P.; de las Heras, B.; Benítez-del-Castillo, J.M.; Guzmán, M.; Millar, T.; Herrero-Vanrell, R.; et al. Novel Nano-Liposome Formulation for Dry Eyes with Components Similar to the Preocular Tear Film. *Polymers* **2018**, *10*, 425. https://doi.org/10.3390/polym10040425.

33. Sun, J.; Zhang, X.; Huang, T. A Validated Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Brimonidine Tartrate in BRI/PHEMA Drug Delivery Systems. *Chem. Cent. J.* **2017**, *11*, 1–10. https://doi.org/10.1186/s13065-017-0292-2.

34. USP-NF. Travoprost. Available online: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-D1797DD9-B8F5-4E00-8A36-136E2E5785D2_1_en-US?source=TOC (accessed on 3 March 2022).

35. Brugnera, M.; Vicario-De-la-torre, M.; Andrés-Guerrero, V.; Bravo-Osuna, I.; Molina-Martínez, I.T.; Herrero-Vanrell, R. Validation of a Rapid and Easy-to-Apply

Method to Simultaneously Quantify Co-Loaded Dexamethasone and Melatonin PLGA Microspheres by HPLC-UV: Encapsulation Efficiency and In Vitro Release. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 288. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020288.

36. Vicario-de-la-Torre, M.; Benítez-del-Castillo, J.M.; Vico, E.; Guzmán, M.; de-las-Heras, B.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Design and Characterization of an Ocular Topical Liposomal Preparation to Replenish the Lipids of the Tear Film. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 7839–7847. https://doi.org/10.1167/iovs.14-14700.

37. Epstein, S.P.; Chen, D.; Asbell, P.A. Evaluation of Biomarkers of Inflammation in Response to Benzalkonium Chloride on Corneal and Conjunctival Epithelial Cells. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2009**, *25*, 415–424. https://doi.org/10.1089/jop.2008.0140.

38. López-Cano, J.J.; González-Cela-Casamayor, M.A.; Andrés-Guerrero, V.; Herrero-Vanrell, R.; Benítez-Del-Castillo, J.M.; Molina-Martínez, I.T. Combined Hyperosmolarity and Inflammatory Conditions in Stressed Human Corneal Epithelial Cells and Macrophages to Evaluate Osmoprotective Agents as Potential DED Treatments. *Exp. Eye Res.* **2021**, *211*, 108723. https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108723.

39. ARVO. Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Available online: https://www.arvo.org/About/policies/statement-for-the-use-of-animals-in-ophthalmic-and-vision-research/ (accessed on 23 June 2021).

40. Taha, E.I.; El-Anazi, M.H.; El-Bagory, I.M.; Bayomi, M.A. Design of Liposomal Colloidal Systems for Ocular Delivery of Ciprofloxacin. *Saudi Pharm. J.* **2014**, *22*, 231–239. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.003.

41. Natarajan, J.V.; Ang, M.; Darwitan, A.; Chattopadhyay, S.; Wong, T.T.; Venkatraman, S.S. Nanomedicine for Glaucoma: Liposomes Provide Sustained Release of Latanoprost in the Eye. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 123–131. https://doi.org/10.2147/ijn.s25468.

42. Hathout, R.M.; Mansour, S.; Mortada, N.D.; Guinedi, A.S. Liposomes as an Ocular Delivery System for Acetazolamide: In Vitro and in Vivo Studies. *AAPS PharmSciTech* **2007**, *8*, E1–E812 https://doi.org/10.1208/pt0801001.

43. Gökçe, E.H.; Sandri, G.; Eğrilmez, S.; Bonferoni, M.C.; Güneri, T.; Caramella, C.; Gökçe, E.H.; Sandri, G.; Eğrilmez, S.; Bonferoni, M.C.; et al. Cyclosporine A-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Ocular Tolerance and In Vivo Drug Release in Rabbit Eyes Cyclosporine A-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Ocular Tolerance and In Vivo Drug Release in Rabbit Eyes. *Curr. Eye Res.* **2009**, *34*, 996–1003. https://doi.org/10.3109/02713680903261405.

44. Ebrahim, S.; Peyman, G.A.; Lee, P.J. Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* **2005**, *50*, 167–182. https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.12.006.

45. Acar, D.; Molina-Martínez, I.T.; Gómez-Ballesteros, M.; Guzmán-Navarro, M.; Benítez-del-Castillo, J.M.; Herrero-Vanrell, R. Novel Liposome-Based and in Situ Gelling Artificial Tear Formulation for Dry Eye Disease Treatment. *Contact Lens Anterior Eye* **2018**, *41*, 93–96. https://doi.org/10.1016/j.clae.2017.11.004.

46. Willcox, M.D.P.; Argüeso, P.; Georgiev, G.A.; Holopainen, J.M.; Laurie, G.W.; Millar, T.J.; Papas, E.B.; Rolland, J.P.; Schmidt, T.A.; Stahl, U.; et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 366–403. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.03.006.

47. Casamayor, M.A.G.C.; Cano, J.J.L.; Guerrero, V.A.; Vanrell, R.H.; del Castillo, J.M.B.; Martínez, I.T.M. A Novel Osmoprotective Liposomal Formulation from Synthetic Phospholipids to Reduce in Vitro Hyperosmolar Stress in Dry Eye Treatments. *J. Liposome Res.* **2022**, 1–12. https://doi.org/10.1080/08982104.2022.2087083.

48. Anderson, M.; Omri, A. The Effect of Different Lipid Components on the in Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations. *Drug Delivery: J. Deliv. Target. Ther. Agents* **2004**, *11*, 33–39. https://doi.org/10.1080/10717540490265243.

49. Attwood, S.J.; Choi, Y.; Leonenko, Z. Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 3514–3539. https://doi.org/10.3390/ijms14023514.

50. Chen, W.; Duša, F.; Witos, J.; Ruokonen, S.K.; Wiedmer, S.K. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33107-5.

51. Cardenia, V.; Waraho, T.; Rodriguez-Estrada, M.T.; McClements, D.J.; Decker, E.A. Antioxidant and Prooxidant Activity Behavior of Phospholipids in Stripped Soybean Oil-in-Water Emulsions. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88*, 1409–1416. https://doi.org/10.1007/s11746-011-1807-y.

52. Briuglia, M.L.; Rotella, C.; McFarlane, A.; Lamprou, D.A. Influence of Cholesterol on Liposome Stability and on in Vitro Drug Release. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2015**, *5*, 231–242. https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8.

53. Edge, R.; Land, E.J.; Mcgarvey, D.J.; Truscott, T.G. Carotenoids Enhance Vitamin E Antioxidant Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *7863*, 621–622.

54. Afri, M.; Ehrenberg, B.; Talmon, Y.; Schmidt, J.; Cohen, Y.; Frimer, A.A. Active Oxygen Chemistry within the Liposomal Bilayer: Part III: Locating Vitamin E, Ubiquinol and Ubiquinone and Their Derivatives in the Lipid Bilayer. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *131*, 107–121. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.04.007.

55. Fontaniella, B.; Vicente, C.; Legaz, M. The Cryoprotective Role of Polyols in Lichens: Effects on the Redistribution of RNase in Evernia Prunastri Thallus during Freezing. *Plant Physiol. Biochem.* **2000**, *38*, 621–627.

56. Tran, K.N.; Pham, N.; Jang, S.H.; Lee, C.W. Purification and Characterization of a Novel Medium-Chain Ribitol Dehydrogenase from a Lichen-Associated Bacterium Sphingomonas Sp. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0235718. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235718.

57. Bucolo, C.; Fidilio, A.; Platania, C.B.M.; Geraci, F.; Lazzara, F.; Drago, F. Antioxidant and Osmoprotecting Activity of Taurine in Dry Eye Models. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2017**, *34*, 188–194. https://doi.org/10.1089/jop.2017.0008.

58. Houlsby, R.D.; Ghajar, M.; Chavez, G. Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *89*, 803–806.

59. Prabhu, P.; Kumar, R.N.; Koland, M.; Harish, N.M.; Vijayanarayan, K.; Dhondge, G.; Charyulu, R.N.; Sciences, P. Preparation and Evaluation of Nano-Vesicles of Brimonidine Tartrate as an Ocular Drug Delivery System. *J. Young Pharm.* **2010**, *2*, 356–361. https://doi.org/10.4103/0975-1483.71623.

60. Cher, I. Ocular Surface Concepts: Development and Citation. *Ocul. Surf.* **2014**, *12*, 10–13. https://doi.org/10.1016/j.jtos.2013.10.004.

61. Bonniard, A.A.; Yeung, J.Y.; Chan, C.C.; Birt, C.M.; Aguayo, A.; Yeung, J.Y.; Chan, C.C.; Birt, C.M. Ocular Surface Toxicity from Glaucoma Topical Medications and Associated Preservatives Such as Benzalkonium Chloride (BAK). *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2016**, *12*, 1279–1289. https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1209481.

62. Ye, J.; Zhang, H.; Wu, H.; Wang, C.; Shi, X.; Xie, J.; He, J.; Yang, J. Cytoprotective Effect of Hyaluronic Acid and Hydroxypropyl Methylcellulose against DNA Damage Induced by Thimerosal in Chang Conjunctival Cells. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *250*, 1459–1466. https://doi.org/10.1007/s00417-012-2087-4.

63. Barabino, S.; Antonelli, S.; Cimbolini, N.; Mauro, V.; Bouzin, M. The Effect of Preservatives and Antiglaucoma Treatments on the Ocular Surface of Mice with Dry Eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 6499–6504. https://doi.org/10.1167/iovs.14-14548.

64. Marsovszky, L.; Resch, M.D.; Visontai, Z.; Németh, J. Confocal Microscopy of Epithelial and Langerhans Cells of the Cornea in Patients Using Travoprost Drops Containing Two Different Preservatives. *Pathol. Oncol. Res.* **2014**, *20*, 741–746. https://doi.org/10.1007/s12253-014-9755-0.

65. Walsh, K.; Jones, L. The Use of Preservatives in Dry Eye Drops. *Clin. Ophthalmol.* **2019**, *13*, 1409–1425.

66. Studies, A. Ocular Surface Inflammatory Changes Induced by Topical Antiglaucoma Drugs Human and Animal Studies. *Ophthalmology* **1999**, *106*, 556–563.

67. Committee for Medicinal Products for Human Use. *Points to Consider on Switching Between Superiority and Non-Inferiority*; EMEA: London, UK, 2000; pp. 1–10.

68. Toris, C.B.; Gabelt, B.T.; Kaufman, P.L. Update on the Mechanism of Action of Topical Prostaglandins for Intraocular Pressure Reduction. *Surv. Ophthalmol.* **2008**, *53*, S107–S120. https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2008.08.010.

69. Acheampong, A.A.; Small, D.; Baumgarten, V.; Welty, D.; Tang-Liu, D. Formulation Effects on Ocular Absorption of Brimonidine in Rabbit Eyes. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2002**, *18*, 325–337. https://doi.org/10.1089/10807680260218498.

70. Okabe, K.; Kimura, H.; Okabe, J.; Kato, A.; Shimizu, H.; Ueda, T.; Shimada, S.; Ogura, Y. Effect of Benzalkonium Chloride on Transscleral Drug Delivery. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 703–708. https://doi.org/10.1167/iovs.03-0934.

71. Cannas, S.; Usai, D.; Pinna, A.; Benvenuti, S.; Tardugno, R.; Donadu, M.; Zanetti, S.; Kaliamurthy, J.; Molicotti, P. Essential Oils in Ocular Pathology: An Experimental Study. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2015**, *9*, 650–654. https://doi.org/10.3855/jidc.6842.

72. Kassem, M.A.; Rahman, A.A.; Ghorab, M.M.; Ahmed, M.B.; Khalil, R.M. Nanosuspension as an Ophthalmic Delivery System for Certain Glucocorticoid Drugs. *Int. J. Pharm.* **2007**, *340*, 126–133. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.03.011.

73. Bravo-Osuna, I.; Vicario-De-La-Torre, M.; Andrés-Guerrero, V.; Sánchez-Nieves, J.; Guzmán-Navarro, M.; de la Mata, F.J.; Gómez, R.; de las Heras, B.; Argüeso, P.; Ponchel, G.; et al. Novel Water-Soluble Mucoadhesive Carbosilane Dendrimers for Ocular Administration. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 2966–2976. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00182.

74. Design, D. Development and Characterization of PLGA Nanoparticle-Laden Hydrogels for Sustained Ocular Delivery of Norfloxacin in the Treatment of

Pseudomonas Keratitis: An Experimental Study. *Drug Des. Dev. Ther.* **2021**, *15*, 399–418.

CAPÍTULO III - CHAPTER III. Tri-loaded PLGA microspheres with neuroprotective and hypotensive drugs for glaucoma treatment.

CAPÍTULO III – CHAPTER III

RESUMEN

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial que afecta a la retina y el nervio óptico, y cuyo factor de riesgo modificable más importante es la presión intraocular (PIO) elevada. La administración tópica de fármacos hipotensores es la primera línea de tratamiento del glaucoma. Sin embargo, la adherencia es difícil para los pacientes, debido a la elevada frecuencia de dosificación, las molestias y los efectos secundarios sobre la superficie ocular. Además, el control de la presión intraocular no evita la degeneración retiniana, y cabe mencionar que también se producen procesos glaucomatosos en pacientes normotensos. Las terapias neuroprotectoras han surgido para prevenir o retrasar la neurodegeneración glaucomatosa. El daño neuronal es el resultado de factores multifactoriales y la combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción resulta de gran interés. Dado que la retina es el lugar diana de los fármacos neuroprotectores en el glaucoma, la administración intravítrea permite alcanzar eficazmente los tejidos intraoculares. Sin embargo, son necesarias inyecciones frecuentes para mantener concentraciones terapéuticas en los tejidos oculares posteriores. Los sistemas de administración intraocular de fármacos (IODDS) surgen como plataformas terapéuticas útiles, ya que son capaces de liberar principios activos durante largos periodos de tiempo, evitando así la necesidad de inyecciones repetidas.

El objetivo de este trabajo fue co-encapsular tres principios activos con actividad hipotensora (latanoprost), antioxidante (melatonina) y antiinflamatoria (ketorolaco) en microesferas biodegradables de ácido (poli láctico-co-glicólico) (PLGA) capaces de liberar los fármacos durante meses tras la inyección intravítrea, abordando el glaucoma de forma multifactorial y evitando la necesidad de administración repetida.

Se prepararon microesferas de PLGA multicargadas con melatonina y ketorolaco mediante la técnica de extracción-evaporación de disolventes en emulsión de aceite en agua. Las microesferas se caracterizaron en términos de morfología externa, distribución del tamaño de partícula, eficacia de encapsulación (EE), liberación *in vitro* y tolerancia *in vitro* en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE-1). Durante el proceso de optimización se probaron diferentes pesos moleculares y composiciones de PLGA. El PLGA 85:15 fue el seleccionado entre los diferentes evaluados. Posteriormente, se estudió la inclusión de vitamina E y latanoprost a la formulación optimizada. Todas las MS tri-cargadas mostraron una buena tolerancia en RPE-1 tras 24 horas de exposición

(>90% de viabilidad celular). La formulación final que incluía vitamina E (KML4VE) dio como resultado un tamaño de partícula de 33,58 ± 5,44 µm y un contenido de fármaco (µg/mg de MSs) de 39,70 ± 5,89, 67,28 ± 4,17 y 7,51 ± 0,58 para melatonina, ketorolaco y latanoprost respectivamente. Las MSs fueron capaces de liberar de forma sostenida los fármacos arbóreos durante 70 días. Según los resultados, las microesferas tri-cargadas con fármacos hipotensores y neuroprotectores pueden considerarse un prometedor sistema de liberación controlada para el tratamiento del glaucoma.

ABSTRACT

Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative disease affecting the retina and optic nerve, which the most important modifiable risk factor is the high intraocular pressure (IOP). Topical administration of hypotensive drugs is the first line of glaucoma treatment. However, adherence is difficult for patients, due to the high dosing frequency, discomfort and side effects on the ocular surface. In addition, control of intraocular pressure does not avoid retinal degeneration, and it is worth mentioning that glaucomatous processes also occur in normotensive patients. Neuroprotective therapies emerge to prevent or delay glaucomatous neurodegeneration. Neuronal damage results from multifactorial factors and the combination of drugs with different mechanisms of action results of great interest. As the retina is the target site of neuroprotective drugs in glaucoma, intravitreal administration allows to effectively reach intraocular tissues. However, frequent injections are needed to maintain therapeutic concentrations in the posterior ocular tissues. Intraocular drug delivery systems (IODDS) emerge as useful therapeutic platforms as they are capable of releasing active substances over long periods of time, thus avoiding the need for repeated injections.

The aim of this work was to co-encapsulate three active substances with hypotensive (latanoprost), antioxidant (melatonin) and anti-inflammatory (ketorolac) activity in biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres capable of releasing the drugs for months after intravitreal injection, approaching glaucoma in a multifactorial way and avoiding the need for repeated administration.

Multi-loaded PLGA microspheres with melatonin and ketorolac were prepared using the oil-in-water emulsion solvent extraction-evaporation technique. The microspheres were characterized in terms of external morphology, particle size distribution, encapsulation efficiency (EE), *in vitro* release and *in vitro* tolerance in retinal pigment epithelium cells (RPE-1). Different PLGA molecular weight and compositions were tested during the optimization process. PLGA 85:15 was the one selected among the different evaluated. Subsequently, the inclusion of vitamin E and latanoprost to the optimized formulation was studied. All tri-loaded MSs showed good tolerance in RPE-1 after 24 hours of exposure (>90% cell viability). The final formulation including vitamin E (KML4VE) resulted in 33.58 ± 5.44 µm particle size and drug content (µg/mg MSs) of 39.70 ± 5.89, 67.28 ± 4.17 and 7.51 ± 0.58 for melatonin, ketorolac and latanoprost respectively. MSs

were able to co-deliver in a sustained manner the tree drugs over 70-days. According to the results, the tri-loaded microspheres with hypotensive and neuroprotective drugs can be considered as promising controlled-release system for the treatment of glaucoma.

1 Introduction

Glaucoma, one of the main causes of irreversible blindness, is a multifactorial neurodegenerative disorder which courses with a gradual degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) and their axons in the optic nerve [1]. There are several types of glaucoma, such as congenital glaucoma, angle-closure glaucoma and open-angle glaucoma, the most frequent one [2]. Currently, the most important modifiable risk factor for the development of glaucoma is the increased intraocular pressure (IOP). For this reason, the treatment of glaucoma is mainly focused on the topical administration of hypotensive drugs, which act by increasing the drainage of aqueous humor or decreasing its production. Currently, there are numerous hypotensive eye drops on the market for the treatment of glaucoma, aimed at reducing intraocular pressure [3].

However, one of the major problems with the topical route is the low local bioavailability, which results in increased frequency of administration, and therefore poor patient compliance and producing adverse effects such as dry eye disease (DED) [4,5]. In addition, control of intraocular pressure does not avoid retinal degeneration, and it is worth mentioning that glaucomatous processes also occur in normotensive patients. Neuroprotective therapies emerge to prevent or delay glaucomatous neurodegeneration, thus preventing the progression of blindness. [6,7]. Numerous strategies have been pursued for neuroprotection. The most frequent therapeutic targets are glutamate receptors, potentiation of protective autoimmunity, neurotrophin deprivation, nitric oxide synthesis, voltage-gated sodium and calcium channels, oxidative stress, heat shock proteins, inflammation and retinal ganglion cell death and apoptosis [7].

In order to reach the posterior segment of the eye to provide neuroprotection intravitreal injections are needed. However, they have important disadvantages associated with intravitreal route such as high cost, invasiveness, or potential adverse effects, which are further increased by the fact that multiple injections will be required to maintain therapeutic drug levels in the retina and surrounded tissues [8].

Intraocular drug delivery systems (IODDS) have emerged as therapeutic platforms to overcome this limitation. IODDS are capable of releasing active substances over long periods of time, thus avoiding the need for repeated injections [9]. The use of IODDS is a solution to reduce the cost and adverse effects of treatment and maximize its effects.

Within the IODDS, the intraocular polymeric implants are widely used, which can be prepared from non-biodegradable or biodegradable polymers. Biodegradable polymers are more desirable for IODDS, since, upon injection, they can release the active substance while degrading, without the need to be removed. Of particular note is the use of the polymers poly (lactic) acid (PLA) and poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA), which has been approved by the FDA and the EMA for intraocular systems [10]. Nowadays the use of PLGA for the development of biodegradable microspheres which enable to encapsulate low and high molecular weight substances is increasing [9,11].

Among the different drugs used to reduce IOP, the most common are prostaglandin 2 analogues (PGE2) such as latanoprost, bimatoprost or travoprost, which decrease the IOP by increasing the aqueous humour outflow [12].

On the other hand, as previously discussed, neuroprotection is an important approach in the treatment of glaucoma. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a neuroprotectant used in retinal degenerative diseases [13]. It is an active substance with antioxidant properties that has been shown in numerous studies to have neuroprotective activity in retinal degeneration produced in glaucoma disease [14,15]. In fact, melatonin has been shown to have a neuroprotective and antiapoptotic effect thanks to the reduction of damage from oxidative stress [16,17]. In addition, melatonin has been proposed to help regulate the circadian rhythms and reduce the IOP [18].

Another interesting drug is the prostaglandin analog latanoprost, which in addition to being an antihypertensive has also shown a potential neuroprotective effect. In this regard, other authors have found an antiapoptotic effect of latanoprost in rat retinal ganglion cells both *in vitro* and *in vivo* [19]. Moreover, previous research has found that latanoprost administered intravitreally was able to reduce RGC damage induced by either NMDA or optic nerve axotomy in Sprague-Dawley rats [20].

Furthermore, although the mechanisms involving inflammation in glaucoma are not yet fully understood, it is known that the immune cells play an important role in neurodegeneration and neuroprotection of RGCs [21]. The non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ketorolac (that inhibit the enzyme cyclooxygenase) is a safe and effective agent already tested to treat the ocular inflammation.

Previously, it has been shown that ketorolac was able to protect RGCs *in vivo* after axonal damage [22]. In addition, other authors have found that the use of the anti-inflammatory drug ketorolac may improve the IOP-lowering effect in patients treated with latanoprost [23].

The aim of this work was to combine anti-inflammatory, antioxidative (both neuroprotective) and antihypertensive drugs in a microparticulate delivery system for the treatment of glaucoma, with the objective of maintaining the effect for weeks after a single intravitreal injection. For this purpose, ketorolac, melatonin and latanoprost were included in PLGA microspheres to create a multi-functional controlled release system.

2 Material and methods

2.1 Materials

The active substances ketorolac and melatonin with high purity were supplied by Merck (Darmstadt, Germany), as well as vitamin E 96% and Polyvinyl alcohol 67,000 g/mol (PVA). Latanoprost was from Quimigen (Madrid, Spain). Different types of Poly(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) were purchased from Evonik (Darmstadt, Germany): PLGA 503, 503H 735 S, 735H, 85:15. The mobile phases were prepared with methanol and acetonitrile HPLC grade provided by PanReac (AppliChem, Barcelona, Spain).

2.2 PLGA Microspheres preparation.

The microencapsulation of the different compounds was performed by the oil/water emulsion solvent extraction-evaporation technique [24]. For the manufacture of the formulations, 400 mg of PLGA were dissolved in 0.7 mL of dichloromethane (DCM). After that, the active substances were added together with 25% v/v ethanol for dissolution. Subsequently, the mixture was subjected to cold ultrasonication for 5 minutes and stirred with a sonication probe for 1 minute at 4ºC, forming the final O-phase. To create the emulsion, the external aqueous phase, composed of 2% polyvinyl alcohol (PVA) in MilliQ® water, was added (5 mL) and the emulsion was formed at 10,000 rpm during 2 minutes in a homogenizer. The subsequent maturation took place for 3 hours in an agitation bath at room temperature, using 0.1% PVA in water as maturation phase, until complete evaporation of the organic solvents. Finally, the desired microspheres fraction size (38-20 µm) was washed and collected using two sieves (38 and 20 µm size). The

particles were freeze-dried (Freezing at -80ºC for 15 min and drying at -80ºC and 0.1 mBar for 12 hours. MSs were stored under dry conditions at −30 ◦C.

The PLGA polymers used were of different lactic-glycolic ratios and molecular weights: PLGA 503, 503H, 735S, 735H and PLGA 85:15. The first step of the optimization process consisted of the selection of the polymer more suitable for the microencapsulation of fixed amounts of ketorolac and melatonin (60 mg and 80 mg respectively). After that, the addition of vitamin E (40 µL) and the antihypertensive agent latanoprost in two different amounts (2 and 4 mg) was evaluated.

2.3 Latanoprost, ketorolac and melatonin quantification by HPLC.

The quantification of the different drugs was carried out using two different methods. For simultaneous melatonin and ketorolac quantification, a method previously validated by our group was used [24]. Briefly, the mobile phase was composed of methanol and 50 mM ammonium formiate solution (adjusted with formic acid to pH 4) in a 60:40 ratio. The quantification was performed with an Ascentis C18 25 cm x 4.6 mm x 5 µm column. The flow was 1 mL/min and the analysis time was 8 minutes. The column temperature was maintained at 45 ºC. The wavelengths of maximum absorption were 313.5 nm for ketorolac and 222.5 for melatonin.

For the quantification of latanoprost, a method previously described by other authors with some modifications was used [25]. The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1% v/v trifluoroacetic acid (TFA) adjusted at pH 3 in water in a 70:30 ratio. The flow was 1 mL/min and the analysis time was 3 minutes. The column used for this analysis was a Ascentis C18 10 cm x 4.6 mm x 3 µm. The wavelength of maximum absorption was 205.0 nm.

2.4 Microspheres characterization

2.4.1 Mean particle size and particle distribution.

Dual light scattering technique (Microtrac® S3500 Series Particle Size Analyzer, Montgomeryville, PA, USA) was used to obtain the mean particle size and size distribution of the MSs. The measurements were performed in triplicate and expressed in volume mean diameters ± standard deviation.

2.4.2 Morphology evaluation of MSs

For morphology evaluation scanning electron microscopy (SEM, Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan) was used. MSs were coated with a gold sputter-coating for 60 seconds for external surface observation.

2.4.3 Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency of the formulations (EE%), understood as the drug successfully entrapped into the MSs, was performed by adding 1 mL dichloromethane (DCM) to 1 mg of MSs and stirred with vortex for 30 seconds to dissolve the PLGA. Subsequently 2.5 mL MeOH were added, and the mixture was stirred for 1 minute to precipitate the PLGA. The resulting solution of the active compounds in the DCM:MeOH mixture was centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes and filtered through a 0.22 µm pore size nylon filter (JNY022013N, Filter-Lab®, Barcelona, Spain). Finally, the samples were quantified by HPLC. The EE of the drugs were calculated individually as the ratio of the actual amount of drug per weight of MSs to the total weight of drug added during the processing of the microspheres (1) (2).

$$EE\ (\frac{\mu g}{\text{mg MSs}}) = \frac{\mu g\ \text{Drug}}{mg\ MSs\ weighted} \quad (1)$$

$$EE\ (\%) = \frac{\frac{\text{mg Drug}}{\text{mg MSs}\ weighted}}{\frac{mg\ Drug\ added}{mg\ Drugs\ added + mg\ PLGA\ added}} \quad (2)$$

2.4.4 *In vitro* release studies

For *in vitro* release studies, 5 mg of MSs loaded with active substances were weighed into Eppendorf tubes. Then, 2 mL of Phosphate-buffered saline (PBS), a buffer solution with 7.4 pH, was added. In all cases, the volume was sufficient to maintain sink conditions for the active substances. As an exception, for the study of the *in vitro* release of latanoprost 10 mg MSs were added due to the low amounts of latanoprost present in the MSs, which makes subsequent quantification difficult.

To quantify the released drugs, the PBS solution was removed after 24 h (burst), and every 7 days after centrifugation for 5 min at 5000 rpm. The supernatants were filtered with a 0.22 µm nylon filter. Fresh 2 mL of PBS was added to the tubes and the remaining

microspheres were gently resuspended to continue the assay. For the quantification of melatonin and ketorolac, the solutions in PBS were directly quantified by HPLC with the appropriate dilution. On the other hand, for the quantification of latanoprost, the 2 mL of solution was lyophilized until the complete elimination of water, and subsequently dissolved in 0.5 mL of acetonitrile.

To compare the release profiles, we use the similarity factor (f2) (3). Using f2, it can be established that the difference between the two release profiles is lower than 10% when values are between 50-100.

$$f2 = 50.\log\left[\frac{100}{\sqrt{1+\frac{\sum_{t=t}^{t=n}[\bar{R}(t)-\bar{T}(t)]^2}{n}}}\right] (3)$$

2.5 ***In vitro*** **cytotoxicity studies**

2.5.1 Cell Cultures

Human retinal pigment epithelium cells (RPE-1) donated by the UCD (University College of Dublin) were used for *in vitro* studies. Cells were cultured using a culture medium of Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F-12) supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, 3,5 % sodium bicarbonate 7,5% solution and 10 % fetal bovine serum (FBS). Cells were incubated at 37°C and 5% CO2. Cells were cultured to approximately 80% confluence, at which point cells were transferred into new T-75 flasks. Cells were detached from the T-75 flask using trypsin in EDTA (1 mL for 5 minutes). The detached cells were then resuspended and centrifuged at 850 x g for 10 minutes in a 15 mL falcon to obtain a pellet. Finally, the pellet was resuspended, and the desired number of cells was added to a new T-75 flask. The passages used for the assays were 10-25.

2.5.2 Cytotoxicity assay

The cytotoxicity study was carried out by seeding the cells in a 96-well plate at a density of 7,000 cells per well. Culture medium was used as a negative control (established as 100% cell viability) and dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% was used as positive control

[26]. The method for assessing the cytotoxicity of the formulations was the MTT method, studying the mitochondrial-dependent reduction of the tetrazolium salt 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) to formazan crystals. For the toxicity of the microspheres and their components, studies were conducted using the microspheres alone (MSs B), with vitamin E (MSs B VE), with ketorolac (MSs-Ketorolac), melatonin (MSs-Melatonin) and latanoprost (MSs-Latanoprost) alone, with ketorolac and melatonin without (KM) and with vitamin E (KMVE) and with vitamin E, ketorolac, melatonin and 2mg latanoprost (KML2VE) or 4 mg latanoprost (KML4VE).

For the assay the plates were seeded, and the cells were allowed to grow overnight. Subsequently, the culture medium was removed and 100 µL of new culture medium was added to each well. Subsequently, 100 µL of MSs suspension in culture medium was added at a concentration of 1 mg/mL to give a final concentration of 0.5 mg/mL. The negative control columns were supplemented with 100 µl of culture medium, and the positive control columns with 100 µl of 10% DMSO. The exposure lasted 24 hours. After that, the culture medium and compounds were removed and 100 µL/well of 0.83% MTT solution was added to the 96-well plate. Finally, the MTT was removed (2 hours of exposure) and the formazan salt crystals formed were dissolved using 100 µL/well of DSMO. The plate was read in a spectrophotometer at 550 nm wavelength.

3 Results

3.1 Polymer selection

3.1.1 Microspheres characterization

3.1.1.1 Size and morphology

The mean particle size observed in the selected size fraction (20-38 µm) of microspheres co-loaded with melatonin and ketorolac were all between 28 and 34 µm (Table 1) There were no significant differences between MSs prepared with different polymers ($p>0.05$). Particle size distribution also resulted unimodal in all cases.

Table 1. Mean size of microspheres developed with different types of PLGA expressed in µm ± SD.

Polymer	Particle size (µm ± SD)
503	31.07 ± 7.47
503 H	31.01 ± 6.84
75:25 S	29.73 ± 8.77
75:25 H	29.97 ± 6.97
85:15	30.04 ± 6.51

According to SEM pictures, formulations prepared with different polymers resulted in spherical structure with smooth non-porous surfaces (Figure 1). No crystals on the MS surfaces were observed for any of the formulations.

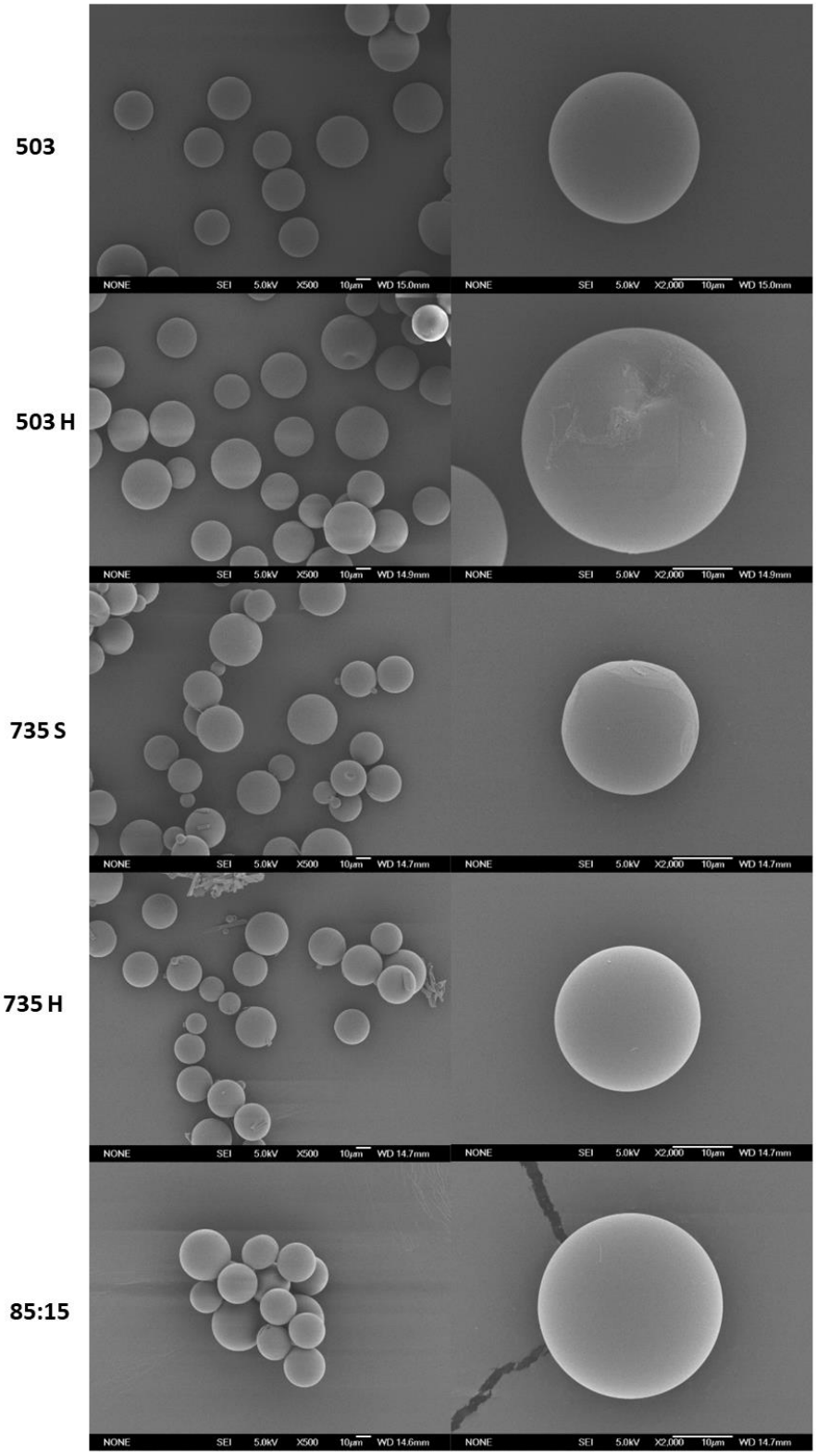

Figure 1. MSs elaborated with different types of PLGAs prepared from 60 mg ketorolac and 80 mg melatonin visualized by Scanning electron microscopy.

3.1.1.2 Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiencies of the drugs melatonin and ketorolac were quantified as described in the Material and Method section. (Table 2).

Ketorolac encapsulation efficiency was statistically significantly higher ($p<0.05$) when the two polymers with carboxy-terminal groups 503H and 735H were used for microencapsulation in comparison to the other PLGAs employed. Regarding melatonin, the EE results followed the same behavior for MSs prepared with 503H, showing statistically significant higher EE values ($p<0.05$) than MS prepared with the rest of the polymers (503: $p=0.02$, 735S: $p= 0.0001$, 85:15: $p= 0.002$, 735H $p = 0.034$). However, for MSs prepared with PLGA 735H, only statistically significant differences with 735S ($p= 0.0005$) and 85:15 ($p= 0.021$) polymers were found

Table 2. Encapsulation efficiency (EE) in µg/mg Mss and % of melatonin and ketorolac in MSs developed with different polymers (Mean ± SD).

	EE [µg/mg ms]		EE [%]	
Polymer	**Melatonin**	**Ketorolac**	**Melatonin**	**Ketorolac**
503	46.82 ± 3.88	65.48 ± 6.41	31.61 ± 2.63	58.69 ± 5.56
503 H	58.48 ± 3.38	76.06 ± 0.49	39.38 ± 2.31	68.82 ± 1.09
75:25 S	26.12 ± 1.63	52.83 ± 0.80	17.62 ± 1.08	47.48 ± 0.73
75:25 H	49.59 ± 3.52	78.85 ± 1.87	33.45 ± 2.34	70.65 ± 1.62
85:15	39.55 ± 3.15	67.24 ± 5.32	26.68 ± 2.11	60.46 ± 4.67

3.1.2 *In vitro* release studies

An initial release study over 14 days was performed with all the formulations containing melatonin and ketorolac. As can be seen in figure 2, drugs were completely released during this two-weeks period except for MSs composed of PLGA 85:15, which released only 61.27 ± 0.63% of the melatonin and 68.43 ± 0.18% of the loaded ketorolac. PLGA 503 and 503H, both with a lactic acid - glycolic acid ratio of 50:50, showed a faster release of the drugs, while the polymers 735 S and 735 H, with a ratio of 75:25, showed a slower, but still high release in this period.

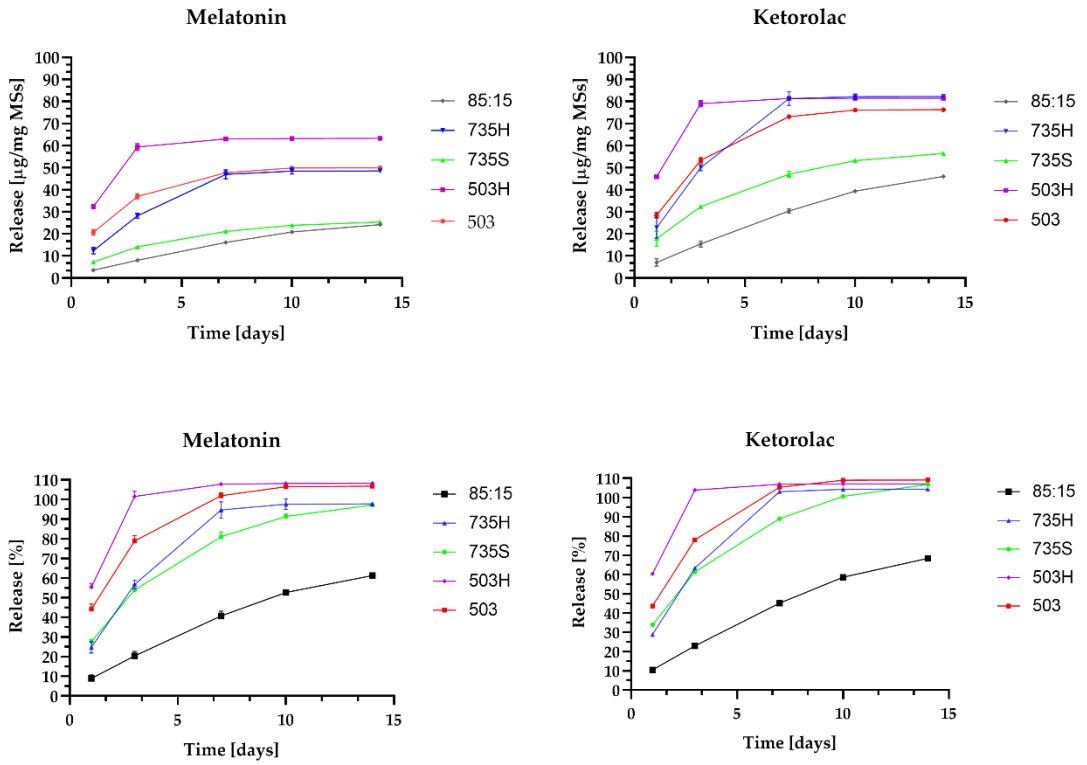

Figure 2. *In vitro* release of melatonin and ketorolac in MSs prepared with 80 mg melatonin and 60 mg ketorolac during 14 days in µg/mg MSs and %.

As expected, the polymers with a 50:50 ratio of lactic-glycolic acid had the highest burst release, being 44.22 ± 2.63 % for melatonin and 43.65 ± 1.91 % for ketorolac in the case of PLGA 503 polymer and 55.37 ± 1.79 % for melatonin and 60.37 ± 1.20 % for ketorolac when PLGA 503H polymer was used. This difference between PLGA 503 and 503H is probably due to the higher hydrophilicity of 503H because of its carboxyl-terminal group, which may result in a higher degradation of 503H in aqueous media [27,28]. The 75:25 ratio PLGAs showed the next highest bursts, being 27.62 ± 1.24 % for melatonin and

33.90 ± 6.58 % for ketorolac in the case of 735S and 24.86 ± 2.93% and 28.86 ± 5.99 % for melatonin and ketorolac respectively for 735H.

The lowest burst results were obtained for PLGA 85:15, with 8.91 ± 1.74 % values for melatonin and 10.51 ± 2.50 % for ketorolac, resulting significantly lower than the initial release observed for MS prepared with all other PLGAs, for both melatonin and ketorolac ($p<0.05$).

For this reason, the polymer PLGA 85:15 was selected for further technological development of the melatonin, ketorolac, and latanoprost tri-loaded microspheres.

3.2 Technological development of multi-loaded formulations

After the selection of PLGA 85:15 as the polymer with the best properties for the controlled release of melatonin and ketorolac, the inclusion of vitamin E and different amount of latanoprost (2 mg or 4 mg) in the formulation was studied and MSs were fully characterized.

3.2.1 Microspheres characterization

3.2.1.1 Size and morphology

When the average particle sizes of MSs developed with PLGA 85:15 including vitamin E and/or latanoprost (Tables 3 and 4) were measured, there were no significant differences after the addition of vitamin E and/or latanoprost in all MSs formulation ($p>0.05$).

Table 3. Mean size of melatonin and ketorolac microspheres developed with PLGA 85:15 with and without vitamin E expressed in µm ± SD.

Polymer	Particle size (µm ± SD)
85:15 (KM)	30.04 ± 6.51
85:15 (KMVE)	32.35 ± 8.64

Table 4. Mean size of ketorolac, melatonin and latanoprost microspheres developed with PLGA 85:15 expressed in µm ± SD.

MSs	Particle size (µm ± SD)
KML2	30.79 ± 2.36
KML4	28.86 ± 5.14
KML2VE	33.32 ± 8.65
KML4VE	33.58 ± 5.44

Subsequently, the morphology of MSs developed with PLGA 85:15, with or without vitamin E, and with different amounts of latanoprost was studied (Figure 3). Microspheres prepared with 85:15 PLGA containing ketorolac and melatonin with the addition of vitamin E (KMLVE) showed small pores on the surface. PLGA 85:15 MSs prepared including latanoprost in their formulation (KML2, KML4, KML2VE and KML4VE) were also spherical. In addition, similarly to the previous ones, MSs containing vitamin E in their composition (KML2VE and KML4VE) also showed small pores.

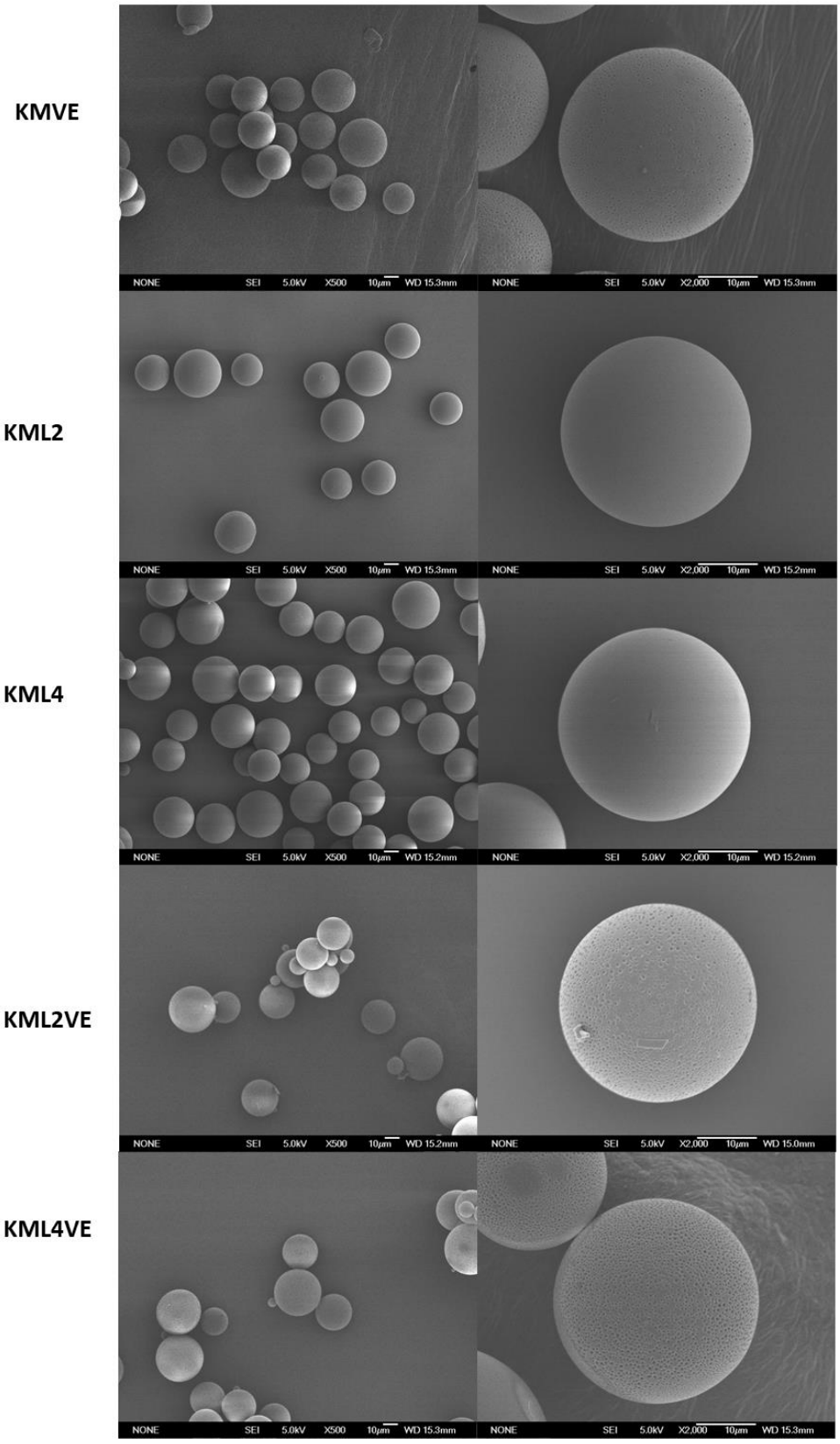

Figure 3. Microspheres prepared with 80 mg melatonin, 60 mg ketorolac and 2 mg/4 mg latanoprost developed with PLGA 85:15 visualized by Scanning electron microscopy.

To confirm that vitamin E caused the presence of pores in the MSs, visualization of blank PLGA 85:15 MSs, without (Blank MSs) and with the addition of vitamin E (Blank MSs VE), was also carried out (Figure 4). In this case it was also observed that the addition of vitamin E resulted in pores on the surface of the microspheres.

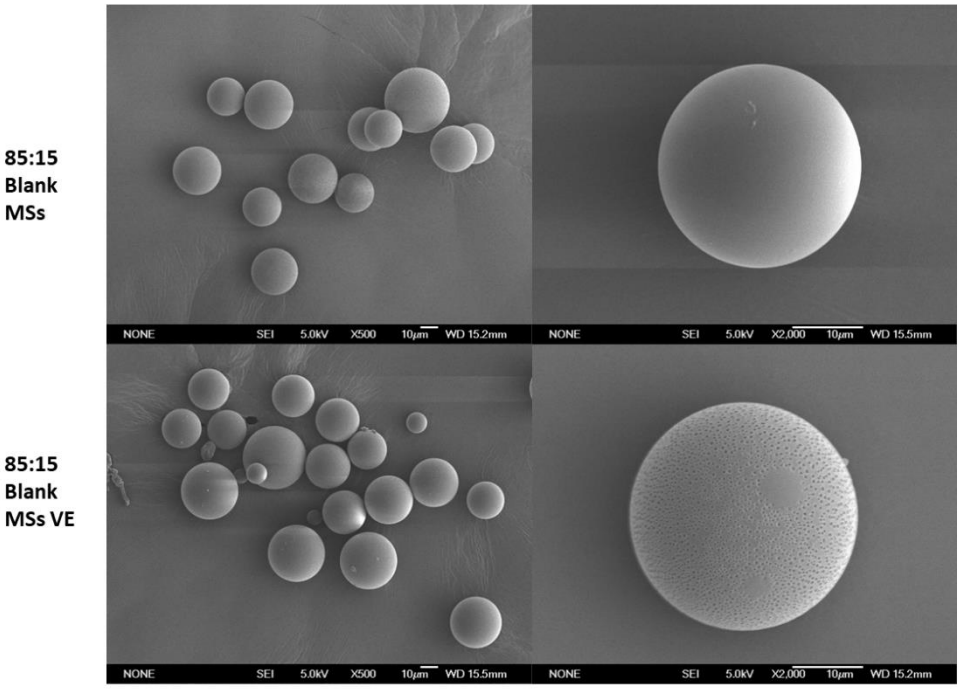

Figure 4. Blank microspheres (with and without vit E addition) developed with PLGA 85:15 visualized by Scanning electron microscopy.

3.2.1.2 Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency of ketorolac and melatonin was measured when vitamin E was included in the formulation developed with PLGA 85:15 (Table 5). Although slightly less encapsulation was observed for melatonin with the inclusion of vitamin E in the formulation, the results were not statistically significant ($p = 0.13$). Regarding ketorolac, the encapsulation efficacy did not change when vitamin E was added to the formulation ($p>0.05$).

Table 5. Encapsulation efficiency (EE) in µg/mg MSs and % of melatonin and ketorolac in MSs developed with 85:15 polymer with and without vitamin E (Mean ± SD).

	EE [µg/mg ms]		EE [%]	
Polymer	**Melatonin**	**Ketorolac**	**Melatonin**	**Ketorolac**
85:15 KM	39.55 ± 3.15	67.24 ± 5.32	26.68 ± 2.11	60.46 ± 4.67
85:15 KMVE	29.23 ± 8.93	65.63 ± 7.73	20.09 ± 6.54	62.61 ± 2.40

The second step in the development of the antiglaucomatous controlled release formulation was the inclusion of latanoprost. When ketorolac, melatonin and latanoprost (in two different amounts, 2 mg and 4 mg) were encapsulated in microspheres prepared with PLGA 85:15 with and without vitamin E (Table 6), the results showed no decrease in the encapsulation of ketorolac or melatonin after the inclusion of latanoprost. Furthermore, latanoprost was able to be encapsulated in both cases at approximately 100%, according to its high affinity for the oily phase due to its low water solubility [29]. In addition, there were no significant differences between the EE (%) data of melatonin, ketorolac and latanoprost ($p>0.05$ for all combinations).

Table 6. Encapsulation efficiency (EE) in µg/mg MSs and % of melatonin, ketorolac and latanoprost (2 mg / 4 mg) in MSs developed with 85:15 polymer with and without vitamin E addition (Mean ± SD).

	EE [µg/mg MSs]			EE [%]		
	Melatonin	**Ketorolac**	**Latanoprost**	**Melatonin**	**Ketorolac**	**Latanoprost**
KML2	31.63 ± 8.23	64.30 ± 9.50	4.27 ± 0.20	21.35 ± 5.57	57.87 ± 8.56	115.60 ± 5.38
KML4	38.44 ± 11.10	76.78 ± 10.38	8.12 ± 1.13	25.85 ± 7.49	69.42 ± 9.32	109.89 ± 15.30
KML2 VE	34.48 ± 4.12	68.47 ± 5.32	4.20 ± 0.17	23.48 ± 2.84	62.11 ± 4.90	114.00 ± 4.78
KML4 VE	39.70 ± 5.89	67.28 ± 4.17	7.51 ± 0.58	26.81 ± 3.98	59.87 ± 5.08	101.98 ± 7.80

3.2.2 *In vitro* release studies

Initially, to conduct a more in-depth study of the prolonged release of melatonin and ketorolac in MSs created with PLGA 85:15, a 42 days (6 weeks) *in vitro* release study was performed with the formulations prepared with PLGA 85:15 without and with vitamin E (KM and KMVE respectively) (Figure 5).

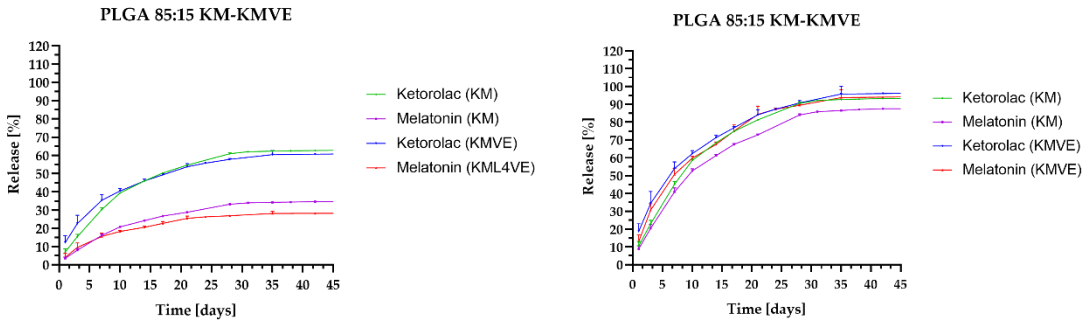

Figure 5. *In vitro* release in µg/mg MSs and % of melatonin and ketorolac in PLGA 85:15 MSs prepared with 80 mg melatonin and 60 mg ketorolac with and without vitamin E for 42 days.

The similarity factor was used to compare the different *in vitro* release obtained [26]. The results showed similarity when comparing melatonin profiles (f2= 65.13) and also when comparing ketorolac (f2= 70.12).

In the subsequent step of the optimization process, after confirming that the addition of vitamin E to melatonin and ketorolac loaded MSs did not affect the release profile, latanoprost was included in the formulations. It is worth mentioning that the formulations with vitamin E were preferred due to its antioxidant properties and the possibility that the oily substance provide to encapsulate proteins in its solid state in future studies, according to previous studies developed in the research group [30,31]. Therefore, after verifying, as previously discussed, that the inclusion of an initial amount of latanoprost (2 mg) to the formulations without and with vitamin E resulted in statistically similar encapsulation efficiency values for all active substances, the formulations prepared with vitamin E were selected for the *in vitro* release assay.

Finally, the possibility of increasing the amount of latanoprost in the microspheres was also evaluated, and for this, 4 mg latanoprost was used (KML4VE). In order to compare both formulations (KML2VE and KML4VE) the corresponding release studies were carried out for 70 days (10 weeks) (Figures 6 and 7).

According to f2 values the release of both ketorolac and melatonin was not affected by the increase in latanoprost in the formulation. For KML4VE the f2 values compared with KMVE were 87.95 for ketorolac and 82.01 for melatonin. In the case of KML2VE f2 values were 62.59 and 76.59 for ketorolac and melatonin respectively compared with

KMVE. These two substances (ketorolac and melatonin) showed a release of approximately 100% after 70 days of *in vitro* release.

In the case of latanoprost, only 50-60% of the encapsulated drug had been released by 70 days in KML2VE and KML4VE MSs, indicating a controlled release that could last for several months (Figure 9). A slightly difference was observed in the percentage of latanoprost release after 70 days, being 51.99 ± 0.35% for KML2VE and 62.71 ± 0.40% for KML4VE. However, latanoprost release from both formulations resulted similar according to similarity factor results (f2= 63.75).

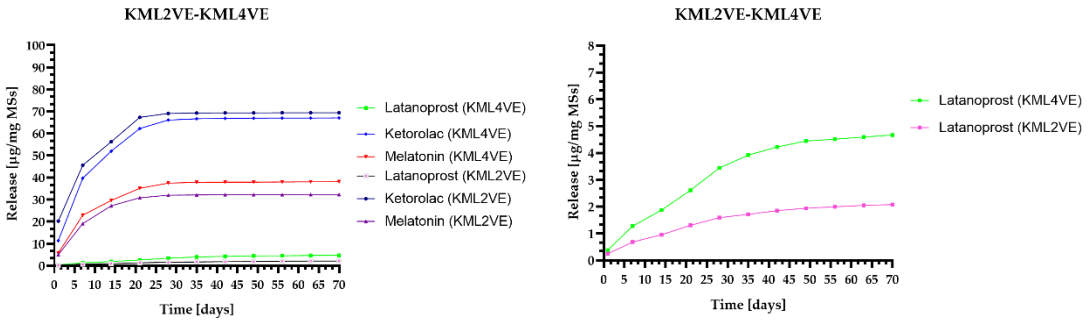

Figure 6. *In vitro* release in µg/mg MSs of melatonin, ketorolac and latanoprost in KML2VE MSs and KML4VE MSs prepared with 80 mg melatonin, 60 mg ketorolac and 2/4 mg latanoprost with vitamin E during 70 days.

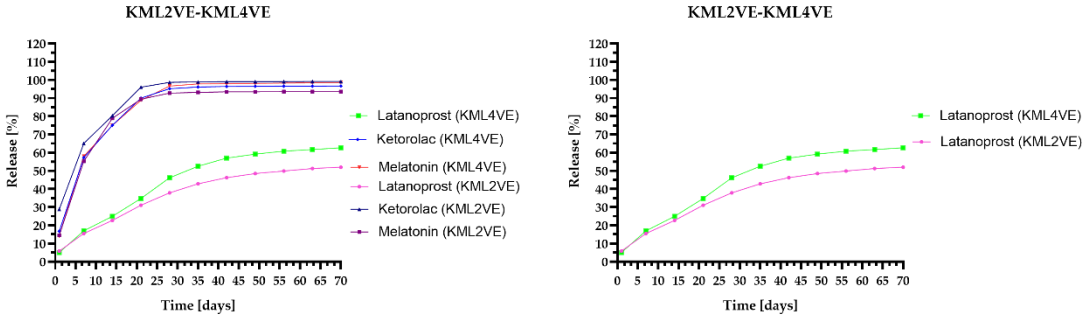

Figure 7. *In vitro* release (expressed in %) of melatonin, ketorolac and latanoprost in KML2VE MSs and KML4VE MSs prepared with 80 mg melatonin, 60 mg ketorolac and 2/4 mg latanoprost with vitamin E for 70 days.

According to the previous *in vitro* characterization, KML4VE formulation was selected for the *in vivo* studies, due to the higher encapsulation of latanoprost, without affecting the controlled release of the other active substances. In addition, to check the homogeneity between batches, the release profiles of 4 different batches (KML4VE-1, KML4VE-2, KML4VE-3, and KML4VE-4) were studied. Then, the batches were mixed to form a pool, whose sustained release was also studied and compared with the separated batches KML4VE1-4 (Figure 8). The results showed that the batches were equivalent in the release of melatonin, ketorolac and latanoprost (f2>50 in all cases).

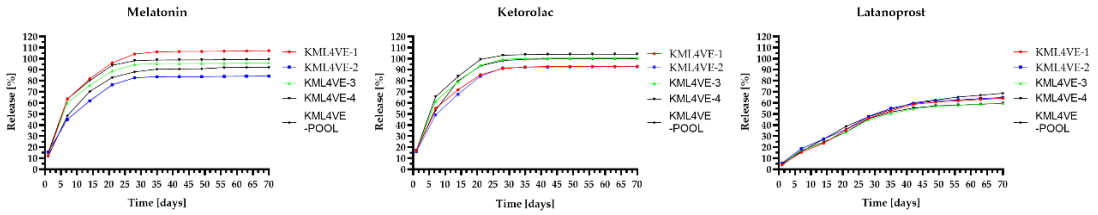

Figure 8. *In vitro* release in % of melatonin, ketorolac and latanoprost in KML4VE1-4 MSs prepared with 80 mg melatonin, 60 mg ketorolac and 2/4 mg latanoprost with vitamin E for 70 days.

3.2.3 *In vitro* cell assays

3.2.3.1 Cytotoxicity assay

The cell viability of all microspheres was above 90%, showing good tolerance in retinal cells (Figure 9). Regarding statistical analysis, none of the microspheres showed statistically significant differences with the other microspheres. However, all showed a statistically significant difference with the positive control (10% DMSO), which reduced cell viability to 29.63 ± 3.18 %. Specifically, the cell viability results for the microspheres were 94.63 ± 6.21 for MSs B, 91.36 ± 3.64 % for MSs B VE, 90.46 ± 2.92 % for MSs-Ketorolac, 93.76 ± 2.34 % MSs-Melatonin and 99.42 ± 7.36 % for MSs-Latanoprost. When ketorolac and melatonin were combined, the results were 90.77 ± 3.71 % and 92.71± 0.84 % cell viability for KM and KMVE respectively. In the case of the tri-loaded MSs with different amounts of latanoprost the cell viability was 96.21 5.03% for KML2VE and 96.04 ± 0.97% for KML4VE.

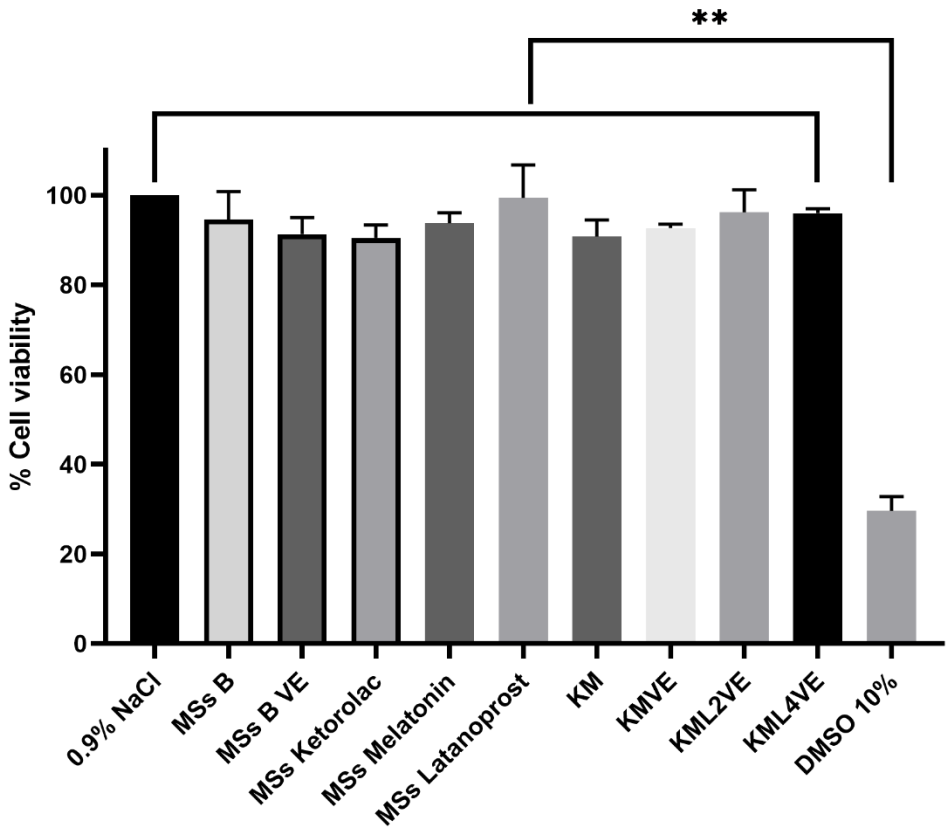

Figure 9. Cell viability evaluation of PLGA 85:15 microspheres formulations containing different active substances. ** p<0.001

4 Discussion

Since Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative disease, an interesting strategy consists of the treatment combining neuroprotective active substances with different mechanisms of action and capable of approaching the treatment from different pathways involved in its pathophysiology. As the retina is the target site of neuroprotective drugs in glaucoma, intravitreal administration allows to effectively reach intraocular tissues. However, frequent injections are needed to maintain therapeutic concentrations in the posterior ocular tissues. If the combined medication is formulated in an IODDS, the adverse effects associated with repeated intravitreal injections would be reduced.

In this sense, in recent years, authors have studied the inclusion of different kind of neuroprotective substances in PLGA microspheres intended for glaucoma treatment by

intraocular administration [32,33]. Among the drugs with neuroprotective potential, we highlight two compounds: melatonin and ketorolac. Melatonin is an antioxidant active substance with demonstrated neuroprotective activity [14–16], which also has shown an effect on lowering intraocular pressure in other studies [18,34]. On the other hand, the inclusion of anti-inflammatory drugs in controlled release systems based on PLGA microspheres for glaucoma treatment is increasingly being investigated [35,36]. PLGA microspheres have been studied to encapsulate anti-inflammatory drugs in numerous studies [11]. Among the most frequently used anti-inflammatories in intraocular controlled release systems are, for example, dexamethasone [24,37] and the employed in this work ketorolac, which has managed to be released for 50 days when encapsulated in PLGA microspheres [22]. Moreover, ketorolac has also been shown in previous studies to enhance IOP reduction in combination with latanoprost [23].

Furthermore, the study of the inclusion of active substances capable of reducing IOP in controlled-release systems is also increasing. This is the case of DURYSTA, an intracameral implant of the hypotensive bimatoprost, which has recently received FDA approval [38,39].

For all these reasons, in this work it was decided to combine different drugs in PLGA microspheres to address glaucoma from intraocular hypotension and neuroprotection (anti-inflammation and antioxidation). For this purpose, the hypotensive latanoprost, anti-inflammatory ketorolac and the antioxidant melatonin were selected.

Initial studies of technological development consisted of the selection of the most appropriate type of PLGA to develop the formulation. The MSs initially included only melatonin and ketorolac, to later study the addition of vitamin E and latanoprost. Within the PLGAs studied, two had a L-G ratio of 50:50 (503 and 503H), two of 75:25 (753S and 753H) and one of 85:15. Also, two of them had a terminal carboxylic group (503H and 753H). In all cases, the resulting MSs had a similar size (around 30 μm) and were spherical when visualized by SEM. Our results also agree with previously developed studies with PLGA of different ratios, showing that when the PLGA ratio has a higher proportion of lactic acid, the release is more sustained [40]. In addition, it can be observed how the presence of carboxylic terminal groups in the PLGA produces an increase in the initial burst. This is in concordance with several studies carried out with PLGA, and is

due to the fact that the presence of these carboxylic groups accelerates the hydrolysis of PLGA [28,40].

According to the results, although PLGA 85:15 was not the one that managed to encapsulate the higher amount of melatonin and ketorolac (39.55 ± 3.15 µg/mg MSs and 67.24 ± 5.32 µg/mg MSs for melatonin and ketorolac respectively), it was the one that obtained the best sustained release results, having a significantly lower initial burst than the other PLGAs ($p<0.05$) and being the only one that continued to release ketorolac and melatonin after two weeks of *in vitro* release (Figure 2). According to the PLGA manufacturer Evonik®, the inherent viscosity of PLGA 503, 503H, 735S and 735 H is 0.32 - 0.44 dl/g. However, the inherent viscosity of PLGA 85:15 is 0.55 - 0.75 dl/g, due to its higher molecular weight, which may be one of the causes of a slower release [41].

The next step in technological development was the addition of vitamin E to the formulation. The interest in the inclusion of vitamin E in the MSs was due to its demonstrated antioxidant effect and also to facilitate encapsulating proteins in its solid state in PLGA MSs reported by other authors of our research group [30,31,42], which could be useful for future studies. When the addition of vitamin E to the MSs with PLGA 85:15 was studied, similar release profiles ($f2>50$) and encapsulation efficiencies without statistically significant differences ($p<0.05$) for the two drugs were obtained. The *in vitro* release time studied for the two formulations (KM and KMVE) was 42 days, still showing a release of melatonin and ketorolac at the end of the study. The particle sizes obtained were around 30 µm, ideal for intravitreal injection in suspension. They resulted spherical, with the only peculiarity that small pores were seen on the surface of the MSs containing vitamin E, coinciding with the results presented previously [32,43] and explained as a consequence of the concentration of the vitamin in the vicinity of the surface of the microspheres during their maturation process, which would promote a slow diffusion of the organic solvent, forming the small pores observed on the surface of the MSs [43].

The last step of technological development was the study of the inclusion of latanoprost in different amounts. For this study, MSs of PLGA 85:15 with and without vitamin E, and with 2 mg or 4 mg of latanoprost were prepared. Again, the MSs obtained were all spherical with a suitable particle size for intravitreal administration in suspension. As expected, the MSs containing vitamin E in their composition presented also small pores on the surface.

The EE (%) of all the formulations were compared, achieving an EE of approximately 100% of latanoprost in all cases (KML2, KML4, KML2VE and KML4VE), which is associated to its lipophilic nature [29]. In addition, the encapsulation efficiencies of melatonin and ketorolac did not differ significantly between the formulations (Table 8). Based on these results, extended *in vitro* release studies were performed with the formulations containing vitamin E (KML2VE and KML4VE), due to the previously described advantages. A sustained release of 70 days for ketorolac and melatonin was observed in the *in vitro* release studies. These results are promising, since they manage to extend the release for a longer time than previously studies with these two drugs [22,24]. Regarding latanoprost, only approximately 50-60% was released in 70 days, indicating a potential release for several months, which could lead to a reduction in IOP for months after a single injection. Particularly, KML4VE MSs were able to encapsulate more latanoprost (8.12 ± 1.13 µg/mg MSs) without altering the release of latanoprost or any of the other active substances, reaching only 62.71 ± 0.40 % latanoprost release at 70 days.

The comparison of the KML2VE and KML4VE formulations in terms of *in vitro* controlled release of melatonin, ketorolac and latanoprost showed similar release of the tree substances ($f2>50$).

The KML4VE MSs were selected as the final formulation because it was able to encapsulate a greater amount of latanoprost without affecting the controlled release or the *in vitro* cell viability. In addition, similarity of the release profile between different batches of this formulation (KML4VE 1-4) was demonstrated ($f2>50$ in all cases), which indicates good reproducibility in the MSs preparation.

Regarding the *in vitro* cytotoxicity studies, the microspheres were not toxic after a 24-hour exposure to RPE-1 cells, with cell viability greater than 90% being observed in all cases (unloaded and loaded with the drugs individually or as a combination). This is a good indicative of the high ocular tolerance of the microspheres, in agreement with the findings of different authors about the tolerance of PLGA microspheres [44,45].

5 Conclusion

It has been possible to successfully encapsulate in the same microsphere anti-inflammatory, antioxidant and hypotensive drugs (ketorolac, melatonin and latanoprost) and subsequently release them in sustained manner for more than two months. This tri-delivery IODDS is a potential platform for the multifactorial treatment of glaucoma.

Funding

This research was funded by Grant MAT2017-83858-C2-1 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and by "ERDF A way of making Europe", Grants PID2020-113281RB-C21 and PID2020-113281RB-C22 funded by MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033, UCM 920415 Research Group "Innovation, Therapy and Pharmaceutical Development in Ophthalmology (InnOftal)" and the ISCII-FEDER RETICS (OFTARED) RD16/0008/0009.

Acknowledgments

M.A.G.-C. thanks for the PhD Spanish MECD fellowship (Reference FPU18/03445). Thanks to the technical SEM assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI).

6 References

1. Meier-gibbons, F.; Marc, T. Influence of Cost of Care and Adherence in Glaucoma Management : An Update. J. ofOphthalmology 2020.

2. Tanito, M.; Sugihara, K.; Hara, K.; Takai, Y. Different Glaucoma Types and Glaucoma Surgeries among Different Age Groups. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2018, 256, 2013–2014, doi:10.1007/s00417-018-4058-x.

3. Alm, A. Latanoprost in the Treatment of Glaucoma. Clin. Ophthalmol. 2014, 1967–1985.

4. Actis, A.G.; Rolle, T. Ocular Surface Alterations and Topical Antiglaucomatous Therapy : A Review. Open Ophthalmol. J. 2014, 67–72.

5. Davies, N.M. Biopharmaceutical Considerations in Topical Ocular Drug Delivery. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2000, 27, 558–562.

6. Review, C. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma A Review. Clin. Rev. Educ. 2014, 311, 1901–1911, doi:10.1001/jama.2014.3192.

7. Chidlow, G.; Wood, J.P.M.; Casson, R.J. Pharmacological Neuroprotection for Glaucoma. Drugs 2007, 67, 725–759.

8. Bhanu, M.; Harsha, K.; Anupam, P. Ocular Drug Delivery Systems. Nat. Polym. drug Deliv. 2017, 160–170, doi:10.1079/9781780644479.0160.

9. Alhalafi, A.M. Applications of Polymers in Intraocular Drug Delivery Systems. Oman Ophthalmic Soc. 2017, 3–8, doi:10.4103/0974-620X.200692.

10. Wang, Y.; Qin, B.; Xia, G.; Choi, S.H. FDA's Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Research Program and Regulatory Outcomes. AAPS J. 2021, 23, 1–7, doi:10.1208/s12248-021-00611-y.

11. Bravo-osuna, I.; Andrés-guerrero, V.; Arranz-romera, A.; Esteban-pérez, S.; Molina-martínez, I.T.; Herrero-vanrell, R. Microspheres as Intraocular Therapeutic Tools

in Chronic Diseases of the Optic Nerve and Retina. Adv. Drug Deliv. Rev. 2018, 126, 127–144, doi:10.1016/j.addr.2018.01.007.

12. Doucette, L.P.; Walter, M.A. Prostaglandins in the Eye : Function , Expression , and Roles in Glaucoma Prostaglandins in the Eye : Function , Expression , and Roles in Glaucoma. Ophthalmic Genet. 2017, 38, 108–116, doi:10.3109/13816810.2016.1164193.

13. Ye, D.; Xu, Y.; Shi, Y.; Fan, M.; Lu, P.; Bai, X. Anti - PANoptosis Is Involved in Neuroprotective Effects of Melatonin in Acute Ocular Hypertension Model. J. Pineal Res. 2022, doi:10.1111/jpi.12828.

14. Aspects, C.; Sande, H. Melatonin : A Novel Neuroprotectant for the Treatment of Glaucoma. J. Pineal Res. 2010, 48, 353–364, doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00762.x.

15. Reiter, R.J.; Mayo, J.C.; Tan, D.X.; Sainz, R.M.; Alatorre-Jimenez, M.; Qin, L. Melatonin as an Antioxidant: Under Promises but over Delivers. J. Pineal Res. 2016, 253–278, doi:10.1111/jpi.12360.

16. Bessone, V.; Diaz, H.; Edit, G.; Barboza, D. De; Graciela, N.; Talamoni, T. De; Alberto, D.; Rita, A.; Alejandra, D. Protective Role of Melatonin on Retinal Ganglionar Cell : In Vitro an in Vivo Evidences. Life Sci. 2019, 218, 233–240, doi:10.1016/j.lfs.2018.12.053.

17. Bessone, C.D. V; Martinez, S.M.; Luna, D.; Marquez, M.A.; Ramírez, M.L.; Allemandi, D.A.; Carpentieri, A.R.; Quinteros, D.A. Neuroprotective Effect of Melatonin Loaded in Ethylcellulose Nanoparticles Applied Topically in a Retinal Degeneration Model in Rabbits. Exp. Eye Res. 2020, 200, doi:10.1016/j.exer.2020.108222.

18. Saniples, J.R.; Krause, G.; Lewy, A.J. Effect of Melatonin on Intraocular Pressure. Curr. Eye Res. 2000, 7, 649–653.

19. Kanamori, A.; Naka, M.; Fukuda, M.; Nakamura, M.; Negi, A. Latanoprost Protects Rat Retinal Ganglion Cells from Apoptosis in Vitro and in Vivo. Exp. Eye Res. 2009, 88, 535–541, doi:10.1016/j.exer.2008.11.012.

20. Kudo, H.; Nakazawa, T.; Shimura, M.; Takahashi, H.; Fuse, N.; Kashiwagi, K.; Tamai, M. Neuroprotective Effect of Latanoprost on Rat Retinal Ganglion Cells. 2006, 1003–1009, doi:10.1007/s00417-005-0215-0.

21. Maranha, R.C. Nanotechnology for Medical and Surgical Glaucoma Therapy — A Review. Adv Ther 2020, 37, 155–199, doi:10.1007/s12325-019-01163-6.

22. Nadal-Nicolás, F.M.; Rodriguez-Villagra, E.; Bravo-Osuna, I.; Sobrado-Calvo, P.; Molina-Martínez, I.; Villegas-Pérez, M.P.; Vidal-Sanz, M.; Agudo-Barriuso, M.; Herrero-Vanrell, R. Ketorolac Administration Attenuates Retinal Ganglion Cell Death after Axonal Injury. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016, 57, 1183–1192, doi:10.1167/iovs.15-18213.

23. Banu, E.T.; Acar, T.S. Effect of Ketorolac Add-On Treatment on Intra-Ocular Pressure in Glaucoma Patients Receiving Prostaglandin Analogues. Ophthalmologica 2012, 227, 205–209, doi:10.1159/000333822.

24. Brugnera, M.; Vicario-De-la-torre, M.; Andrés-Guerrero, V.; Bravo-Osuna, I.; Molina-Martínez, I.T.; Herrero-Vanrell, R. Validation of a Rapid and Easy-to-Apply Method to Simultaneously Quantify Co-Loaded Dexamethasone and Melatonin PLGA Microspheres by HPLC-UV: Encapsulation Efficiency and In Vitro Release. Pharmaceutics 2022, 14, doi:10.3390/pharmaceutics14020288.

25. Mansoor, S.; Tas, C. Simple, Fast, and Sensitive Isocratic High-Performance Liquid Chromatography Method for the Quantification of Latanoprost. Acta Chromatogr. 2014, 26, 191–202, doi:10.1556/AChrom.26.2014.2.1.

26. Javier, L.; Sigen, A.; Andr, V.; Tai, H.; Bravo-osuna, I.; Teresa, I.; Wang, W.; Herrero-vanrell, R. Thermo-Responsive PLGA-PEG-PLGA Hydrogels as Novel Injectable Platforms for Neuroprotective Combined Therapies in the Treatment of Retinal Degenerative Diseases. Pharmaceutics 2021.

27. Nieto, K.; Mallery, S.R.; Schwendeman, S.P. Microencapsulation of Amorphous Solid Dispersions of Fenretinide Enhances Drug Solubility and Release from PLGA in Vitro and in Vivo. Int. J. Pharm. 2020, 586, 119475, doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119475.

28. Park, C.W.; Lee, H.J.; Oh, D.W.; Kang, J.H.; Han, C.S.; Kim, D.W. Preparation and in Vitro/in Vivo Evaluation of PLGA Microspheres Containing Norquetiapine for Long-Acting Injection. Drug Des. Devel. Ther. 2018, 12, 711–719, doi:10.2147/DDDT.S151437.

29. Horne, R.R.; Judd, K.E.; Pitt, W.G. Rapid Loading and Prolonged Release of Latanoprost from a Silicone Hydrogel Contact Lens. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2017, 41, 410–418, doi:10.1016/j.jddst.2017.08.011.

30. Traber, M.G.; Atkinson, J. Vitamin E , Antioxidant and Nothing More. Free Radic. Biol. Med. 2007, 43, 4–15, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024.

31. García-Caballero, C.; Lieppman, B.; Arranz-Romera, A.; Molina-Martínez, I.T.; Bravo-Osuna, I.; Young, M.; Baranov, P.; Herrero-Vanrell, R. Photoreceptor Preservation Induced by Intravitreal Controlled Delivery of Gdnf and Gdnf/Melatonin in Rhodopsin Knockout Mice. Mol. Vis. 2018, 24, 733–745.

32. Arranz-Romera, A.; Esteban-Pérez, S.; Molina-Martínez, I.T.; Bravo-Osuna, I.; Herrero-Vanrell, R. Co-Delivery of Glial Cell–Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and Tauroursodeoxycholic Acid (TUDCA) from PLGA Microspheres: Potential Combination Therapy for Retinal Diseases. Drug Deliv. Transl. Res. 2021, 11, 566–580, doi:10.1007/s13346-021-00930-9.

33. Arranz-romera, A.; Davis, B.M.; Bravo-osuna, I.; Esteban-pérez, S.; Molina-martínez, I.T. Simultaneous Co-Delivery of Neuroprotective Drugs from Multi-Loaded PLGA Microspheres for the Treatment of Glaucoma. J. Control. Release 2019, 297, 26–38, doi:10.1016/j.jconrel.2019.01.012.

34. Lee, A.J.; Goldberg, I. Emerging Drugs for Ocular Hypertension. Expert Opin. Emerg. Drugs 2011, 16, 137–161, doi:10.1517/14728214.2011.521631.

35. Mietzner, R.; Kade, C.; Froemel, F.; Pauly, D.; Stamer, W.D.; Ohlmann, A.; Wegener, J.; Fuchshofer, R.; Breunig, M. Fasudil Loaded PLGA Microspheres as Potential Intravitreal Depot Formulation for Glaucoma Therapy. Pharmaceutics 2020, 12.

36. Jiang, C.; Moore, M.J.; Zhang, X.; Klassen, H.; Langer, R.; Young, M. Intravitreal Injections of GDNF-Loaded Biodegradable Microspheres Are Neuroprotective in a Rat Model of Glaucoma. Mol. Vis. 2007, 13, 1783–1792.

37. Pan, X.; Liu, X.; Zhuang, X.; Liu, Y.; Li, S. Co-Delivery of Dexamethasone and Melatonin by Drugs Laden PLGA Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2020, 60, 102086, doi:10.1016/j.jddst.2020.102086.

38. Sirinek, P.E.; Lin, M.M.; Sirinek, P.E.; Lin, M.M. Seminars in Ophthalmology Intracameral Sustained Release Bimatoprost Implants (Durysta) Intracameral Sustained Release Bimatoprost Implants (Durysta) ABSTRACT. Semin. Ophthalmol. 2022, 37, 385–390, doi:10.1080/08820538.2021.1985145.

39. Shirley, M. Bimatoprost Implant: First Approval. Drugs and Aging 2020, 37, 457–462, doi:10.1007/s40266-020-00769-8.

40. Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers (Basel). 2011, 3, 1377–1397, doi:10.3390/polym3031377.

41. Arrighi, A.; Marquette, S.; Peerboom, C.; Denis, L.; Goole, J.; Amighi, K. Development of PLGA Microparticles with High Immunoglobulin G-Loaded Levels and Sustained-Release Properties Obtained by Spray-Drying a Water-in-Oil Emulsion. Int. J. Pharm. 2019, 566, 291–298, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.070.

42. García-caballero, C.; Prieto-calvo, E.; Checa-casalengua, P.; García-martín, E. European Journal of Pharmaceutical Sciences Six Month Delivery of GDNF from PLGA / Vitamin E Biodegradable Microspheres after Intravitreal Injection in Rabbits. Eur. J. Pharm. Sci. 2017, 103, 19–26, doi:10.1016/j.ejps.2017.02.037.

43. Checa-Casalengua, P.; Jiang, C.; Bravo-Osuna, I.; Tucker, B.A.; Molina-Martínez, I.T.; Young, M.J.; Herrero-Vanrell, R. Retinal Ganglion Cells Survival in a Glaucoma Model by GDNF/Vit e PLGA Microspheres Prepared According to a Novel Microencapsulation Procedure. J. Control. Release 2011, 156, 92–100, doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.023.

44. Herrero-Vanrell, R.; Bravo-Osuna, I.; Andrés-Guerrero, V.; Vicario-de-la-Torre, M.; Molina-Martínez, I.T. The Potential of Using Biodegradable Microspheres in Retinal Diseases and Other Intraocular Pathologies. Prog. Retin. Eye Res. 2014, 42, 27–43, doi:10.1016/j.preteyeres.2014.04.002.

45. Zhao, M.; Rodríguez-Villagra, E.; Kowalczuk, L.; Le Normand, M.; Berdugo, M.; Levy-Boukris, R.; El Zaoui, I.; Kaufmann, B.; Gurny, R.; Bravo-Osuna, I.; et al. Tolerance of High and Low Amounts of PLGA Microspheres Loaded with Mineralocorticoid Receptor Antagonist in Retinal Target Site. J. Control. Release 2017, 266, 187–197, doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.029.

CAPÍTULO III – CHAPTER III

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de esta tesis doctoral es el desarrollo de nuevos tratamientos efectivos para el tratamiento de la enfermedad del glaucoma teniendo en cuenta su carácter multifactorial. Para llevar a cabo este objetivo se han utilizado sistemas basados en la micro y la nanotecnología. El uso de micro y nanotecnología en formulaciones farmacéuticas se encuentra en auge y es un recurso que ha cobrado gran importancia para aumentar la biodisponibilidad de fármacos. En el caso de la administración ocular, y particularmente del tratamiento tópico e intraocular del glaucoma, este planteamiento resulta de especial importancia debido al gran número de problemas relacionados con la baja biodisponibilidad ocular y la necesidad de administraciones repetidas derivada del carácter crónico de esta patología.

Los nanosistemas se han estudiado extensamente para el tratamiento tópico de patologías oculares y en general para la vehiculización de fármacos por vía tópica ocular [189–191]. De hecho, hay una gran variedad de estudios llevados a cabo con nanosistemas para el tratamiento de patologías que afectan al segmento anterior del ojo, como neovascularización corneal, inflamación e infecciones, entre otras. Además, el empleo de nanosistemas por vía tópica es utilizado también con frecuencia en combinación con otras estrategias como la adición de polímeros mucoadhesivos que incrementan el tiempo de residencia de la formulación en la superficie ocular, produciéndose así también un aumento de la biodisponibilidad de los fármacos administrados [2,191]. Dentro de las ventajas más interesantes de los nanosistemas de composición lipídica en su administración tópica se encuentra su capacidad no solo de aumentar la biodisponibilidad ocular de fármacos, sino también de suplementar la capa lipídica de la película lagrimal, mejorando así el estado de la superficie ocular y contribuyendo al mantenimiento de su homeostasis [57].

Existe una relación importante entre el tratamiento antiglaucomatoso tópico y el desarrollo de alteraciones en la superficie ocular y de la EOS que merece ser destacada. La aplicación de gotas antiglaucomatosas oculares durante periodos prolongados de tiempo se asocia a alteraciones en la superficie ocular debido por un lado al uso de conservantes como el cloruro de benzalconio (conocido también por las siglas BAK) y por otro lado a los propios principios activos antiglaucomatosos [60,192]. El BAK es el

conservante más frecuentemente utilizado en las gotas oculares. Numerosos estudios realizados con este compuesto han demostrado su toxicidad en la superficie ocular. Por ejemplo, uno de los estudios realizados indicó un aumento de la toxicidad corneal en conejos tras la instilación de BAK al 0,01%, siendo aun mayor cuando la formulación contenía el polímero hidroxietilcelulosa que aumentaba el tiempo de residencia [193]. Posteriormente, en numerosos estudios se han visto alteraciones en las células del epitelio corneal y conjuntival con el uso de este conservante [194,195]. Estos hallazgos han contribuido a la retirada de los conservantes en un gran número de formulaciones antiglaucomatosas. En el caso concreto de las prostaglandinas, la retirada del BAK en formulaciones de travoprost demostraron una disminución considerable de la toxicidad corneal [196]. La retirada de conservantes de las formulaciones también mejoró la tolerancia en formulaciones antiglaucomatosas de latanoprost, aunque no se consiguió una desaparición completa de la toxicidad [197]. En definitiva, el uso de formulaciones antiglaucomatosas sin conservantes o con conservantes menos dañinos es fundamental. Además, hay que tener en cuenta que los propios principios activos antiglaucomatosos también generan daño en la superficie ocular. Todo ello origina un aumento de la EOS en pacientes con glaucoma o un empeoramiento de los síntomas de la enfermedad, generando importantes molestias y una disminución aún más elevada del cumplimiento terapéutico [61].

De la relación entre el tratamiento tópico hipotensor del glaucoma y el desarrollo de EOS surge la necesidad de desarrollar formulaciones protectoras para la superficie ocular de estos pacientes, que posteriormente pueda aplicarse también para la vehiculización de principios activos antiglaucomatosos. En el **capítulo I "A novel osmoprotective liposomal formulation from synthetic phospholipids to reduce in vitro hyperosmolar stress in dry eye treatments"** se desarrolla una lágrima artificial liposomal capaz de reducir el daño hiperosmolar derivado de la EOS y de suplementar la capa lipídica de la película lagrimal.

El tratamiento de los síntomas de la EOS ha estado enfocado durante muchos años al uso de lágrimas artificiales [39,198]. Dentro de las lágrimas artificiales comercializadas para el tratamiento de la EOS podemos encontrar una variedad de componentes con función protectora ante el estrés hiperosmolar. Por ejemplo, la lágrima artificial Thealoz® con trehalosa, un potente osmoprotector en la superficie ocular u Optive Plus®, con los osmoprotectores levocarnitina y eritritol [199]. También son numerosas las lágrimas

artificiales comercializadas que contienen polímeros mucoadhesivos que aumentan el tiempo de residencia en la superficie ocular como Systane® Ultra y Systane® Ultra Plus [200], Aquoral® y Aquoral forte® con ácido hialurónico etc. Además de la inclusión de polímeros y osmoprotectores, la inclusión en las lágrimas artificiales de componentes lipídicos supone un valor añadido, debido a la mayor mimetización de la película lagrimal, y a la capacidad de fortalecer la capa lipídica, aumentando su estabilidad y evitando la evaporación de la lágrima. Actualmente hay varias lágrimas artificiales comercializadas con componentes lipídicos. Dentro de los componentes lipídicos, el uso de liposomas está muy extendido debido a su composición a base de fosfatidilcolina, un componente lipídico mayoritario en la capa lipídica de la película lagrimal. Hay lágrimas artificiales liposomales en el mercado, como Aquoral Lipo® (Esteve, Farmigea, Pisa, Italia) y Lacrisek® Ofta (Bioos Italia, Italia), que han mostrado beneficios sobre las lágrimas artificiales convencionales [57]. Los liposomas son biodegradables y biocompatibles, y han mostrado ser bien tolerados en la superficie ocular. Tradicionalmente los liposomas se han preparado con fosfatidilcolina de origen natural, como fosfatidilcolina de huevo o de soja [2,45]. El inconveniente del uso de fosfatidilcolina natural es que su composición exacta es desconocida, lo que significa que entre diferentes lotes esta composición puede variar ligeramente, de forma que las formulaciones desarrolladas a partir de ella no estarán completamente estandarizadas, pudiendo dar lugar a variaciones entre lotes [201]. Por este motivo, en el capítulo I se desarrolló una formulación liposomal compuesta por fosfolípidos sintéticos derivados de la fosfatidilcolina como la 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine conocida por las siglas DOPC y la 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine conocida por las siglas DMPC, con el objetivo de suplementar la película lagrimal y ser fácilmente estandarizables, además de ser capaces de encapsular principios activos de diferente composición. La selección de los componentes se realizó en base a la composición de liposomas de fosfatidilcolina natural previamente desarrollados por nuestro grupo, estableciendo una proporción en ratio en masa de 8:1 de fosfolípidos y colesterol [95,140]. Para la selección de fosfolípidos sintéticos se tuvieron en cuenta las temperaturas de transición. En este sentido, se seleccionó el DOPC debido a que su temperatura de transición era similar a la de la fosfatidilcolina de origen natural. Por otro lado, la decisión de incluir el fosfolípido sintético DMPC fue debida a que su temperatura de transición era superior (aproximadamente 22,5ºC), lo que resultó interesante como recurso para aumentar la temperatura de transición de los liposomas, y de esta forma

aumentar su rigidez [202,203]. Por otro lado, fue considerado de vital importancia el mantenimiento de la buena tolerancia mostrada por los liposomas de fosfatidilcolina de soja en la superficie ocular [204], otro motivo por el que fueron seleccionados los fosfolípidos DOPC y DMPC, ya que ambos se han probado anteriormente en formulaciones destinadas a la aplicación en la superficie ocular [205,206]. Los estudios *in vitro* en células epiteliales de córnea humana confirmaron este hecho, mostrando una buena tolerancia tras la aplicación de los liposomas formados únicamente por DOPC y los formados por la combinación de DOPC + DMPC en una proporción 3:1 (ratio en masa). Por ello, se decidió desarrollar formulaciones utilizando solo DOPC, y formulaciones utilizando ambos fosfolípidos para su posterior estudio. Para complementar la fase oleosa de los liposomas se añadió vitamina E, una vitamina con actividad antioxidante utilizada previamente en liposomas, capaz de evitar la peroxidación lipídica manteniendo estable la formulación [140]. Adicionalmente, se decidió incluir el antioxidante ubiquinol a la formulación con el objetivo de combatir el estrés oxidativo en la superficie ocular [207,208]. Como fase de dispersión se utilizó un tampón boratos, seleccionado debido a su capacidad para mantener un pH fisiológico en la formulación, y a su ligera actividad antimicrobiana [44]. Para conferir a la formulación actividad osmoprotectora, sumamente importante en el manejo de pacientes con EOS, se seleccionaron compuestos osmoprotectores y se incluyeron en la fase de dispersión. El primer osmoprotector seleccionado fue la taurina, un aminoácido con actividad osmoprotectora demostrada, que fue ensayado previamente en un modelo de estrés hiperosmolar obteniéndose resultados prometedores. La taurina también ha sido utilizada por otros autores para disminuir la actividad de la metaloproteasa-9 y conferir un efecto antioxidante al preparado [45,53,209]. El segundo osmoprotector seleccionado fue el ribitol, un azúcar con actividad crioprotectora [210]. La selección de las concentraciones fue realizada en función de la osmolaridad elegida para la fase acuosa, diseñando una formulación ligeramente hipotónica (~220 mOsm/L), ya que se ha visto que este tipo de preparados mejoran la sintomatología de la EOS al disminuir la hipertonicidad de la lágrima. También se tuvieron en cuenta estudios previos de osmoprotección *in vitro* y de tolerancia *in vitro* en células de córnea humana, los cuales mostraron que todos los componentes añadidos por separado a los liposomas fueron bien tolerados. A las dos formulaciones diseñadas (F1: DOPC y F3: DOPC+DMPC) se les añadió también el polímero HPMC (F2 y F4) por dos motivos, el primero fue aumentar el tiempo de residencia en la superficie ocular, y el segundo fue debido a su buena tolerancia en la

superficie ocular y los efectos osmoprotectores mostrados en investigaciones anteriores [50,211,212].

El método de fabricación de los liposomas fue el método de hidratación de la bicapa lipídica, descrito por Bangham, con diferentes modificaciones. El método fue seleccionado debido a que previamente había sido estudiado por nuestro grupo de investigación el mantenimiento de la fracción lipídica deseada, demostrando que la concentración de fosfolípidos se mantenía tras la elaboración [113]. Debido a que los liposomas de fosfolípidos sintéticos eran de nuevo desarrollo, la formación de las bicapas lipídicas se confirmó mediante Cryo-TEM [213]. Posteriormente, se comprobó la adecuación de las formulaciones para su administración en la superficie ocular mediante su caracterización fisicoquímica. En todas las formulaciones (F1, F2, F3 y F4) la caracterización fisicoquímica dio lugar a resultados óptimos. Los tamaños medios de las vesículas lipídicas en todas ellas fueron de aproximadamente 200 nm, lo cual ha sido descrito como adecuado para la evasión de la fagocitosis por parte de los liposomas y para el aumento de la captación de los mismos por las células de la superficie ocular [140]. Además, todas las formulaciones presentaron pH neutro, osmolaridad ligeramente hipotónica y una tensión superficial y viscosidad adecuadas para la correcta extensibilidad en la superficie ocular. La adición del polímero HPMC a las formulaciones (F2 y F4) produjo un ligero aumento de tamaño de vesícula, probablemente debido al recubrimiento de las vesículas, así como un aumento en la viscosidad, beneficioso para aumentar el tiempo de residencia en la superficie ocular [214].

Los estudios *in vitro* de las formulaciones en células epiteliales de la superficie ocular (córnea y conjuntiva) mostraron buenos resultados tras 1 y 4 horas de exposición, siendo un buen indicativo de la buena tolerancia de dichas formulaciones. En el caso de las células epiteliales de córnea, una línea celular de alta sensibilidad, la única excepción fue la formulación F1 que no superó el 80% de viabilidad celular a las 4 horas de exposición, la cual contenía liposomas formados únicamente por DOPC, y sin inclusión de HPMC. Sin embargo, tras la adición a dicha formulación del polímero HPMC (F2) la viabilidad celular superó el 80% establecido por la OECD como el valor a partir del cual la tolerancia es adecuada [215]. Este aumento de la viabilidad celular debido a la inclusión en las formulaciones de HPMC coincide con los hallazgos de otros autores [216]. En el caso de los ensayos realizados en células de conjuntiva, tras la exposición de todas las formulaciones los resultados de viabilidad celular fueron superiores al 90%. Tras la

realización de los estudios preliminares en células de la superficie ocular, las formulaciones pudieron ser testadas en términos de tolerancia aguda *in vivo* utilizando conejos neozelandeses albinos. Estos estudios mostraron una ausencia de molestias y alteraciones en la córnea, la conjuntiva o los párpados, así como ausencia de secreciones, confirmando así la buena tolerancia de las formulaciones liposomales desarrolladas.

Otro punto importante fue la realización de estudios de osmoprotección *in vitro* en un modelo de estrés hiperosmolar desarrollado previamente por nuestro grupo de investigación [53]. La actividad osmoprotectora es de elevada importancia en el desarrollo de una formulación para el tratamiento del ojo seco, debido a que la hiperosmolaridad de la lágrima está implicada en el círculo vicioso de la EOS, causando inflamación y daño en las células de la superficie y retroalimentando de esta manera la hiperosmolaridad [38,217]. Por este motivo, los buenos resultados de dichos estudios, que demostraron una elevada protección conferida por estos preparados ante un estrés hiperosmolar, convierten a las formulaciones en prometedoras para el tratamiento de la EOS. Concretamente, la realización de una exposición de 4 horas con nuestras formulaciones a las células epiteliales de córnea humana previo a la creación de un ambiente de estrés hiperosmolar de 16 horas de duración produjo un aumento de entre el 33 y el 47% de la supervivencia celular con respecto al control (sin tratamiento). Estos datos manifiestan el elevado potencial osmoprotector, que fue mayor en la formulación liposomal de DOPC y DMPC que contenía el polímero HPMC (F4).

Además del daño en la superficie ocular, otro inconveniente del tratamiento tópico del glaucoma, derivado de la necesidad de realizar numerosas administraciones durante un tiempo prolongado, es el reducido cumplimiento terapéutico por parte del paciente, lo que deriva en una disminución de la efectividad del tratamiento y un aumento de los efectos adversos [218]. Es por ello que, a partir de las formulaciones desarrolladas en el capítulo anterior, se desarrollaron formulaciones antiglaucomatosas utilizando un principio activo oleoso (travoprost) y otro acuoso (brimonidina), con el objetivo de proteger la superficie ocular y de forma simultánea conseguir un mayor y más prolongado efecto hipotensor al aplicarlas de forma tópica ocular, reduciendo así la frecuencia de administración y los efectos adversos del tratamiento. Para el desarrollo de las formulaciones se partió de la formulación liposomal osmoprotectora compuesta por la combinación de fosfolípidos sintéticos DOPC y DMPC, evaluándose con la adición de HPMC y sin ella. La selección de la formulación combinada de DOPC y DMPC se llevó a cabo, en primer lugar, debido

a los datos de viabilidad celular *in vitro* en células de córnea humana, que mostraron un descenso en la viabilidad celular ligeramente mayor cuando la formulación contenía únicamente el fosfolípido DOPC. Por otro lado, se tuvieron en cuenta los valores de osmoprotección *in vitro*, resultando también ligeramente superior en el caso de la combinación de DOPC y DMPC, a pesar de que las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$). También se consideró más completa la formulación que combinaba dos tipos de fosfolípidos sintéticos, ya que presentaba una mayor variedad de ácidos grasos, lo que podría resultar favorable para la suplementación de la película lagrimal.

Por lo tanto, a partir de las formulaciones desarrolladas previamente, y teniendo en cuenta los resultados de caracterización fisicoquímica, tolerancia *in vitro* e *in vivo*, y eficacia osmoprotectora *in vitro*, en el **capítulo II "Novel Osmoprotective DOPC-DMPC Liposomes Loaded with Antihypertensive Drugs as Potential Strategy for Glaucoma Treatment"** se desarrollaron 4 formulaciones diferentes utilizando los fosfolípidos sintéticos DOPC y DMPC que incluyeron los principios activos antiglaucomatosos. El objetivo de este capítulo fue desarrollar una formulación efectiva en la reducción de la PIO para el tratamiento del glaucoma partiendo de una lágrima artificial capaz de reducir los signos y síntomas de la EOS. De esta forma se lograría un tratamiento tópico efectivo del glaucoma que previniera la aparición de EOS a largo plazo. Otro problema relacionado con la administración tópica ocular, que se ha mencionado previamente, es la baja biodisponibilidad que se consigue por esta vía, ya que aproximadamente el 95% del principio activo se pierde debido al bajo volumen que admite el saco conjuntival (25-30 µL), a la rápida restauración de la lágrima, al drenaje etc. [219,220]. Todo ello hace necesario el uso de nuevas estrategias para conseguir aumentar la biodisponibilidad ocular de los principios activos [28]. Entre estas estrategias destacan el uso de polímeros bioadhesivos, que al aumentar el tiempo de residencia en la superficie ocular, van a aumentar la cantidad de fármaco que alcanzará el tejido diana [112,204]. Por otro lado, destacamos el uso de la nanotecnología, que permite aumentar la biodisponibilidad ocular al incrementar la penetración de fármacos. En este capítulo se intenta combinar distintas estrategias como el uso del polímero bioadhesivo HPMC capaz de aumentar el tiempo de residencia de las formulaciones en la superficie ocular, la adición de sustancias osmoprotectoras (ribitol y taurina) para proteger la superficie ocular del estrés

hiperosmolar, y el empleo de liposomas como estrategia nanotecnológica para aumentar la biodisponibilidad de principios activos [2].

Dos de las formulaciones liposomales incluyeron el hipotensor travoprost de naturaleza oleosa en la bicapa lipídica, una de ellas sin el empleo de polímero bioadhesivo (FL-T) y otra con la inclusión del polímero HPMC (FLP-T). Las otras dos formulaciones incluyeron el hipotensor brimonidina, de naturaleza acuosa, en la fase de dispersión y en el núcleo acuoso de las vesículas, estudiándose también sin polímero (FL-B) y con la adición de HPMC (FLP-B). El desarrollo de estas 4 formulaciones nos permitió, por un lado, estudiar el efecto de un polímero bioadhesivo en las características fisicoquímicas, en la tolerancia *in vitro*, en el efecto osmoprotector *in vitro*, y en el efecto hipotensor *in vivo*. Por otro lado, nos permitió evaluar el efecto en la reducción de la PIO de la inclusión de principios activos de diferente naturaleza (acuosa y oleosa) en los liposomas sintéticos.

Las formulaciones desarrolladas en este capítulo mantuvieron unas características fisicoquímicas adecuadas para la administración en la superficie ocular en todos los casos: pH neutro, tensión superficial adecuada para la extensibilidad en la superficie ocular, osmolaridad hipotónica y tamaño de vesícula aproximado de 200 nm. Por otro lado, como era de esperar, las formulaciones que incluyeron HPMC (FLP-B y FLP-T) tuvieron valores mayores de viscosidad, lo cual resulta favorable para el aumento del tiempo de residencia de la formulación en la superficie ocular [221]. Tras la inclusión del travoprost se obtuvieron valores de eficacia de encapsulación cercanos al 100% (≥99,01%), lo que concuerda con sus características, ya que su alta lipofilia le confiere solubilidad total en las bicapas lipídicas. En cuanto a la brimonidina, en este caso la eficacia de encapsulación dentro de las vesículas lipídicas fue tan solo 24,78 ± 0,32%, debido a que gran parte de la brimonidina quedaba disuelta en la fase de dispersión que rodea los liposomas.

Las 4 formulaciones desarrolladas mantuvieron la buena tolerancia *in vitro* en células de córnea (>80% de viabilidad celular), además de una excelente tolerancia en células de conjuntiva (>89%), coincidiendo con los buenos resultados descritos por otros autores [222]. También cabe destacar que tanto las formulaciones de brimonidina como las de travoprost fueron comparadas con los preparados comerciales de referencia, observándose una tolerancia significativamente mayor en células de córnea para las formulaciones liposomales en ambos principios activos. En el caso de las células de conjuntiva las formulaciones liposomales con brimonidina también presentaron mejoras

estadísticamente significativas en la viabilidad celular, mientras que en las formulaciones con travoprost, a pesar de presentar una mejor viabilidad celular, las diferencias no fueron significativas. Los resultados obtenidos con el preparado comercial de brimonidina probablemente estén relacionados con el uso de conservantes en la formulación [58,60]. La formulación comercial de travoprost, a pesar de no tener conservantes, mostró una peor tolerancia con respecto a nuestras formulaciones liposomales en células de córnea (aunque no en conjuntiva), siendo un buen indicador de la inocuidad de nuestras formulaciones en la superficie ocular.

Cuando se estudió el efecto osmoprotector *in vitro* de las formulaciones liposomales de brimonidina y travoprost se observó, en todos los casos, un aumento de la supervivencia celular frente al daño hiperosmolar significativamente mayor que el control, coincidiendo con los resultados obtenidos en el capítulo anterior.

Una vez confirmado que las formulaciones tenían buenas características para la administración ocular se procedió al estudio de su efectividad en conejos albinos neozelandeses normotensos. Las formulaciones liposomales fueron comparadas con los preparados comerciales de referencia, así como con liposomas no cargados con ningún principio activo, en lo referente a la reducción de la PIO tras la administración tópica ocular. Los resultados fueron bastante prometedores con ambos principios activos, aunque hubo varias diferencias entre ellos. Por un lado, las formulaciones liposomales cargadas con brimonidina consiguieron un inicio de acción más rápido que la formulación comercial. En concreto, las dos formulaciones liposomales de brimonidina tuvieron un comienzo de acción tras 1 hora de administración, mientras que en el caso de la formulación comercial no fue hasta 2 horas después cuando los efectos en la reducción de la presión intraocular comenzaron a ser significativos. Además, la duración del efecto se modificó, aumentando de 7 horas (formulación comercial) a 10 horas (formulaciones liposomales). Cabe destacar que la formulación que contenía HPMC (FLP-B) obtuvo mejores resultados en la reducción de la presión intraocular que la formulación que solo contenía brimonidina (FL-B), de forma que el $AUC_{0–10h}$ de la formulación FL-B fue 1,3 veces mayor que la formulación comercial, mientras que el $AUC_{0–10h}$ de la formulación FLP-B fue 1,5 veces superior a la formulación comercial. Además, solo la formulación FLP-B tuvo una reducción máxima de la PIO significativamente superior que la formulación comercial (ΔPIO max).

Cuando el efecto en la reducción de la PIO fue estudiado con los liposomas de travoprost se obtuvieron resultados diferentes. En este caso, las reducciones en la PIO fueron menos acentuadas en todos los casos, pero más duraderas, coincidiendo con la bibliografía a cerca del mecanismo de acción de las prostaglandinas [132]. A pesar de que el perfil fue diferente, los resultados fueron prometedores, ya que, además de tener un mecanismo de acción más rápido que la formulación comercial (1 hora vs 2 horas), su duración fue mucho mayor, de forma que las formulaciones liposomales de travoprost mostraron una reducción significativa en la PIO durante más de 32 horas, mientras que la formulación comercial dejó de hacer efecto a las 24 horas tras la instilación. Por otro lado, tanto la formulación sin polímero (FL-T) como la formulación con polímero (FLP-T) mostraron un área bajo la curva (AUC_{0-48h}) significativamente mayor que la formulación comercial, siendo 1,5 y 1,7 veces mayor, respectivamente.

Estos resultados fueron coherentes con los resultados encontrados por otros autores sobre el efecto de la brimonidina y el travoprost en la PIO [134,139]. La mejora en el efecto hipotensor puede estar relacionada con la capacidad de los liposomas de interaccionar por diferentes mecanismos con las células de la superficie ocular, favoreciendo la internalización de los fármacos en el interior de las células [2,223]. Además, el aumento de la biodisponibilidad gracias al uso de liposomas de fármacos tópicos para el tratamiento del glaucoma también ha sido demostrada por otros autores [224,225]. Por otro lado, la mejora en las formulaciones cuando se incluyó HPMC coincide con investigaciones previas, donde también se observa un mayor efecto al usar este polímero [140,226].

El efecto que consiguieron nuestras formulaciones liposomales en comparación con los preparados comerciales es importante también por la composición de las mismas, ya que, por ejemplo, en el caso de la formulación comercial de brimonidina, como se ha demostrado previamente en diferentes estudios, la presencia del conservante BAK puede aumentar la penetración de los principios activos [227,228]. Esto supone que el aumento de biodisponibilidad ocular por parte de nuestra formulación sería todavía mayor.

A nivel terapéutico estos resultados son prometedores, especialmente teniendo en cuenta el carácter crónico de la enfermedad del glaucoma, ya que posibilitarían una disminución de la frecuencia de administración de los antiglaucomatosos tópicos, lo que supone ventajas tanto a nivel del cumplimiento terapéutico y comodidad del paciente, que supone

un problema desde hace años, como en cuanto a la manifestación de efectos adversos [229].

Por tanto, basándonos en los resultados obtenidos en los capítulos I y II de la tesis doctoral podemos indicar que las formulaciones desarrolladas suponen un gran avance potencial en el tratamiento del glaucoma, siendo buenas candidatas para el tratamiento tópico de esta enfermedad. Por un lado, manteniendo la salud de la superficie ocular y protegiendo frente a la EOS mediante el efecto osmoprotector en la superficie ocular, y por otro lado gracias al aumento de la biodisponibilidad de los principios activos requieren una menor frecuencia de administración.

Sin embargo, como se ha expuesto en numerosas ocasiones en la presente tesis doctoral, la disminución de la PIO no es la única estrategia para el tratamiento del glaucoma, y además no es efectiva en todos los casos [230]. Esto ha impulsado la investigación dirigida al tratamiento multifactorial del glaucoma, y a la búsqueda de estrategias complementarias que actúen sobre la degeneración de las CGR característica del glaucoma, cobrando especial importancia el tratamiento neuroprotector [231]. Cuando la estrategia se centra en la neuroprotección, la diana terapéutica cambia del segmento anterior del ojo al segmento posterior, y con ello aumentan las dificultades a la hora de conseguir una adecuada biodisponibilidad ocular, ya que la diana terapéutica es todavía más inaccesible cuando se emplea la vía tópica [232].

Cuando la diana terapéutica es la retina y el objetivo es mantener concentraciones efectivas durante largos periodos de tiempo, es necesario cambiar de estrategia y recurrir a la vía intraocular [233]. Cuando se emplea la vía intravítrea se deposita el fármaco directamente en el segmento posterior, facilitándose así alcanzar concentraciones eficaces en dicha zona. De hecho, se recurre a las inyecciones intravítreas en la práctica clínica en el tratamiento de patologías que afectan a esta zona [234]. Sin embargo, en este caso el problema gira alrededor de su mayor invasividad, especialmente importante cuando se trata de tratamientos crónicos que requieren numerosas administraciones y que se asocian a efectos secundarios como cataratas, hemorragias vítreas y desprendimiento de retina, entre otros [235]. Además, la probabilidad de aparición de efectos adversos aumenta con el número de inyecciones. Como consecuencia, surge la necesidad de utilizar la nano y microtecnología para conseguir liberaciones prolongadas y sostenidas tras la administración intravítrea, reduciendo así el número de inyecciones necesarias. Todo ello

llevó a dar un paso más en la presente tesis doctoral desarrollando en el **capítulo III "Tri-loaded PLGA microspheres with neuroprotective and hypotensive drugs for glaucoma treatment"** un sistema de liberación controlada de administración intravítrea a base de microesferas biodegradables de PLGA multicargadas con principios activos con diferente mecanismo de acción para abordar el tratamiento multifactorial del glaucoma.

Como primer paso, en el capítulo III se llevó a cabo el desarrollo de microesferas cargadas con agentes neuroprotectores entre los que se seleccionaron un principio activo antiinflamatorio (ketorolaco) y un principio activo antioxidante (melatonina), para posteriormente estudiar la inclusión del agente hipotensor latanoprost. La decisión de utilizar estos principios activos se basó en las propiedades de los mismos descritas en la bibliografía. Por un lado, la melatonina es un antioxidante que ha demostrado previamente un efecto neuroprotector en células ganglionares de retina, además de contribuir en la reducción de la PIO [236,237]. Además, la melatonina ha sido previamente encapsulada de forma satisfactoria en microesferas, aunque no se han conseguido alcanzar periodos prolongados de liberación, convirtiéndose en uno de los objetivos de este capítulo. Por otro lado, entre los antiinflamatorios estudiados para el tratamiento del glaucoma se encuentra el ketorolaco, que no solo ha mostrado disminuir la muerte de las células ganglionares de la retina [131], sino que también ha sido descrita su posible implicación en la reducción de la PIO al combinarlo de forma tópica con el latanoprost [130].

La melatonina, encapsulada previamente en otros estudios utilizando microesferas de PLGA 503 elaboradas en una proporción 1:10 (melatonina:PLGA), mostró una baja eficacia de encapsulación (aproximadamente el 20%, 17 µg/mg MSs) [238], por este motivo, se decidió aumentar la proporción al doble (2:10), con el objetivo de lograr una mayor encapsulación. Por otro lado, la proporción de ketorolaco:PLGA seleccionada para la formulación (1,5:10) fue elegida en función de estudios previos realizados por nuestro grupo, donde se consiguieron cesiones de hasta 50 días [131].

Para realizar el estudio se emplearon varios tipos de PLGA con diferentes ratios de ácido láctico – ácido glicólico con el fin de conseguir una liberación sostenida lo más prolongada posible. La decisión de utilizar el polímero PLGA se basó en su buena tolerancia, siendo un polímero biodegradable que ha obtenido la aprobación por parte de la FDA para administración intraocular [239]. Se seleccionaron dos PLGA de proporción

láctico-glicólico 50:50 (503 y 503H), dos de proporción 75:25 (735S y 735H) y uno de proporción 85:15 (85:15) y se elaboraron las microesferas cargadas con ketorolaco y melatonina con todos ellos.

Todas las microesferas resultantes mostraron forma esférica y un tamaño de partícula de aproximadamente 30 µm. Varios autores han establecido una relación entre la presencia de grupos carboxílicos terminales en el PLGA, como es el caso del PLGA 503H y 735H y una mayor liberación, debido a la acidificación del medio que favorece a su vez la hidrolisis del PLGA. Además, también se ha sido previamente descrita la relación entre la mayor proporción de ácido láctico y una liberación más sostenida de principios activos [182,240]. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con la literatura, de forma que la velocidad de liberación de principios activos resultante fue la siguiente: 503H>503>735H>735S>85:15.

Tras comparar las eficacias de encapsulación y la liberación de principios activos mediante una cesión *in vitro* de dos semanas de duración, se seleccionó el PLGA 85:15 como el polímero con mejores resultados, ya que, a pesar de no ser el que más EE consiguió (con una encapsulación del 25 % de melatonina y 60 % de ketorolaco aproximadamente), fue el único que continuó cediendo ketorolaco y melatonina tras 14 días de cesión. Posteriormente, se planteó la inclusión de vitamina E en la formulación, debido por un lado a su alta capacidad antioxidante, y por otro lado a la facilidad que aporta para la futura inclusión de proteínas en las microesferas [241,242]. Los resultados mostraron un tamaño de partícula similar y un mantenimiento de la forma esférica. La única diferencia de morfología que presentaron las microesferas con vitamina E fue la aparición de pequeños poros superficiales, cuya presencia debido a la adición de vitamina E ha sido descrita en otros estudios [242]. La eficacia de encapsulación de melatonina y ketorolaco tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas tras la adición de vitamina E a la formulación. Para comprobar que la adición de vitamina E no afectaba a la liberación sostenida se realizó un ensayo de cesión *in vivo* durante 42 días, cuyos resultados mostraron que ambos principios activos continuaban liberándose. La equivalencia de las dos formulaciones se confirmó utilizando el factor de similitud f_2 [175].

Como paso final, se estudió la inclusión del principio activo hipotensor latanoprost en las microesferas ya cargadas con el agente antioxidante y el antiinflamatorio, con el objetivo

de combinar las terapias neuroprotectora e hipotensora en el tratamiento del glaucoma. La combinación de estos tres principios activos es prometedora, ya que permitiría abordar el glaucoma por doble vía: frenando la degeneración de la retina y a la vez neutralizando la PIO elevada, su principal factor de riesgo [127]. Esto supondría una ventaja también para los pacientes que presentan glaucoma normotensivo, los cuales, además de requerir un tratamiento enfocado a la degeneración de la retina, también se ven beneficiados por la disminución de la PIO, a pesar de no tenerla elevada [243]. Las microesferas que contenían los tres principios activos mantuvieron el tamaño y la forma y lograron eficacias de encapsulación del 25% para la melatonina, 60% para el ketorolaco y 100% para el latanoprost. Además, mostraron un mantenimiento de la liberación de melatonina y ketorolaco durante 70 días que no se vio alterada por la presencia de latanoprost. En cuanto al latanoprost, a los 70 días las microesferas también habían cedido un 50-65 % de principio activo, tanto en las MSs cargadas con 2 mg de latanoprost como en las MSs cargadas con 4 mg de latanoprost, lo que nos indica una potencial liberación sostenida de varios meses de duración de este principio activo. Esto podría suponer una mejora en la terapia antiglaucomatosa actual, ya que permitiría conseguir una disminución de la PIO durante varios meses con tan solo una inyección, y a la vez evitar el avance en la degeneración de la retina gracias al efecto neuroprotector. Además, la liberación de ketorolaco también podría reducir la inflamación producida no solo por la progresión de la enfermedad del glaucoma, sino también por la propia inyección intravítrea, reduciendo así los efectos adversos [244].

Las microesferas además mostraron una buena tolerancia *in vitro* en células humanas de retina (RPE-1), con valores de más del 90% de viabilidad celular en todos los casos tras su exposición durante 24 horas. No hubo diferencias entre las MSs blanco, las MSs blanco con vitamina E, ni las MSs con los principios activos (ni en conjunto, ni con los principios activos por separado), lo que resultó un buen pronóstico respecto a su buena tolerancia en la retina. Estos resultados confirman la buena tolerancia en la retina de las microesferas de PLGA descrita por varios autores [245,246]. Por todo ello, la formulación desarrollada tiene unas características idóneas para su administración por vía intraocular en el tratamiento del glaucoma.

CONCLUSIONES – CONCLUSIONS

CONCLUSIONES - CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. Las formulaciones liposomales de administración tópica desarrolladas en esta tesis doctoral presentan unas características adecuadas para su administración en la superficie ocular. Dichos nanosistemas pueden emplearse como lágrimas artificiales para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco asociada al glaucoma y como vehículos de principios activos antiglaucomatosos con actividad hipotensora.
2. El empleo de fosfolípidos sintéticos derivados de la fosfatidilcolina de composición conocida como la 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfocolina y la mezcla de 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfocolina y 1,2-dimyristoyl-sn-glicero-3-fosfocolina permite obtener formulaciones liposomales más estandarizables manteniendo las propiedades y la buena tolerancia de los liposomas de fosfatidilcolina de origen natural.
3. Los liposomas elaborados a partir de 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfocolina y 1,2-dimyristoyl-sn-glicero-3-fosfocolina en proporción 3:1 fueron capaces de encapsular principios activos hidrosolubles como la brimonidina y liposolubles como el travoprost, y presentaron un efecto hipotensor superior a las formulaciones de referencia.
4. El uso de los nanosistemas lipídicos obtenidos a partir de derivados sintéticos de la fosfatidilcolina permite aportar componentes esenciales a la película precorneal y, por tanto, disminuir los efectos adversos asociados a la enfermedad de ojo seco.
5. La inclusión de los agentes osmoprotectores taurina y ribitol aporta a la formulación liposomal desarrollada un efecto protector de la superficie ocular, tal y como se demuestra en el modelo de osmoprotección *in vitro* en células corneales.
6. La adición de hidroxipropilmetilcelulosa en los nanosistemas liposomales desarrollados produce un aumento de la biodisponibilidad de los agentes hipotensores travoprost y brimonidina en conejos.
7. El sistema microparticular de ácido poli (láctico-co-glicólico) cargado con ketorolaco, melatonina y latanoprost permite la liberación simultánea de las tres sustancias activas, de forma controlada, durante más de 70 días. La

adición de vitamina E en la formulación no modifica el perfil de liberación de los fármacos encapsulados.

8. Las microesferas multicargadas desarrolladas que encapsulan agentes con actividad antioxidante (melatonina), antiinflamatoria (ketorolaco) e hipotensora (latanoprost) se pueden considerar como una plataforma terapéutica multidiana del glaucoma, disminuyendo el número de inyecciones en el tratamiento.

CONCLUSIONS

1. The liposomal formulations for topical administration developed in this Doctoral Thesis present suitable characteristics for administration to the ocular surface. These nanosystems can be used as artificial tears for the treatment of dry eye disease associated with glaucoma and as vehicles of antiglaucomatous active substances with hypotensive activity.
2. The use of synthetic phospholipids derived from phosphatidylcholine of known composition such as 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and the mixture of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine enables to obtain more standardizable liposomal formulations while maintaining the properties and good tolerance of phosphatidylcholine liposomes of natural origin.
3. Liposomes made of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in a 3:1 ratio were able to encapsulate water-soluble active principles such as brimonidine and liposoluble ones such as travoprost and presented a hypotensive effect superior to the reference formulations.
4. The use of lipid nanosystems obtained from phosphatidylcholine synthetic derivatives makes it possible to provide essential components to the precorneal film and, therefore, to reduce the adverse effects associated with dry eye disease.
5. The inclusion of the osmoprotective agents taurine and ribitol provides the developed liposomal formulation with a protective effect on the ocular surface, as demonstrated in the *in vitro* osmoprotection model in corneal cells.
6. The addition of hydroxypropyl methylcellulose in the liposomal nanosystems developed produces an increase in the bioavailability of the hypotensive agents travoprost and brimonidine in rabbits.
7. The poly (lactic-co-glycolic) acid microparticulate system loaded with ketorolac, melatonin and latanoprost allows the simultaneous release of the three active substances, in a controlled manner, for more than 70 days. The addition of vitamin E in the formulation does not modify the release profile of the encapsulated drugs.

8. The developed multi-loaded microspheres encapsulating agents with antioxidant (melatonin), anti-inflammatory (ketorolac) and hypotensive (latanoprost) activity can be considered as a multi-target therapeutic platform for glaucoma and can be suitable for reducing the number of injections in the treatment of the disease.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Kels, B.D.; Grzybowski, A.; Grant-Kels, J.M. Human Ocular Anatomy. *Clin. Dermatol.* **2015**, *33*, 140–146, doi:10.1016/j.clindermatol.2014.10.006.

2. López-Cano, J.J.; González-Cela-Casamayor, M.A.; Andrés-Guerrero, V.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Liposomes as Vehicles for Topical Ophthalmic Drug Delivery and Ocular Surface Protection. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2021**, *18*, 819–848, doi:10.1080/17425247.2021.1872542.

3. Ansari, M.W.; Nadeem, A. The Eyeball: Some Basic Concepts 2. In; 2016 ISBN 9783319427812.

4. Hayreh, S.S. Structure of the Optic Nerve. In *Ischemic Optic Neuropathies*; 2011; pp. 7–34 ISBN 9783642118524.

5. Cholkar, K.; Dasari, S.R. *Eye: Anatomy, Physiology and Barriers to Drug Delivery*; ISBN 9781908818317.

6. Goel, M.; Picciani, R.G.; Lee, R.K.; Bhattacharya, S.K. Aqueous Humor Dynamics : A Review. *Open Ophthalmol. J.* **2010**, *4*, 52–59.

7. Hildebrand, G.D.; Fielder, A.R. Anatomy and Physiology of the Retina. *Pediatr. Retin.* **2011**, 39–65, doi:10.1007/978-3-642-12041-1_2.

8. Patel, M.; Herzlich, A.A.; Chan, C. Retinal Anatomy and Pathology. **2016**, *55*, 7–17, doi:10.1159/000431128.

9. Willcox, M.D.P.; Argüeso, P.; Georgiev, G.A.; Holopainen, J.M.; Laurie, G.W.; Millar, T.J.; Papas, E.B.; Rolland, J.P.; Schmidt, T.A.; Stahl, U.; et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 366–403, doi:10.1016/j.jtos.2017.03.006.

10. Her, I.V.A.N.C.; Nz, C.H.B.; Rcp, D.O.; Din, F.E.; Phth, F. A New Look at Lubrication of the Ocular Surface : Fluid Mechanics Behind the Blinking Eyelids. *Clin. Sci.* **2008**, *6*, 79–86, doi:10.1016/S1542-0124(12)70271-9.

11. Butovich, I.A.; Millar, T.J.; Ham, B.M. Understanding and Analyzing Meibomian Lipids — A Review. **2008**, 405–420, doi:10.1080/02713680802018419.

12. Tiffany, J.M. The Normal Tear Film. *Surg. dry eye* **2008**, *41*, 1–20.

13. Davidson, H.J.; Kuonen, V.J. The Tear Film and Ocular Mucins. *Vet. Ophthalmol.* **2004**, *7*, 71–77.

14. Gipson, I.K. Distribution of Mucins at the Ocular Surface. *Exp. Eye Res.* **2004**, *78*, 379–388, doi:10.1016/S0014-4835(03)00204-5.

15. Ramos, T.; Scott, D.; Ahmad, S.; Paul, S.; Liverpool, R. An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells : Cornea and Conjunctiva. *Stem Cells Int.* **2015**.

16. Singh, V.; Santhiago, M.R.; Wilson, S.E. The Corneal Epithelial Basement Membrane: Structure, Function, and Disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, doi:10.1167/iovs.13-12547.

17. Wilson, S.E.; Hong, J. Bowman's Layer Structure and Function. *Cornea* **2000**, *19*, 417–420.

18. Meek, K.M.; Boote, C. The Organization of Collagen in the Corneal Stroma. *Exp. Eye Res.* **2004**, *78*, 503–512, doi:10.1016/j.exer.2003.07.003.

19. Eghrari, A.O.; Riazuddin, S.A.; Gottsch, J.D. *Overview of the Cornea : Structure, Function and Development*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2015; Vol. 134;.

20. Joyce, N.C. Proliferative Capacity of the Corneal Endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.* **2003**, *22*, 359–389, doi:10.1016/S1350-9462(02)00065-4.

21. Joyce, N.C. Cell Cycle Status in Human Corneal Endothelium. *Exp. Eye Res.* **2005**, *81*, 629–638, doi:10.1016/j.exer.2005.06.012.

22. Thiagarajah, J.R. Aquaporin Deletion in Mice Reduces Corneal Water Permeability and Delays Restoration of Transparency after Swelling. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19139–19144, doi:10.1074/jbc.M202071200.

23. Suzuki, T.; Suzuki, T.; Sano, Y.; Kinoshita, S. Conjunctival Inflammation

Induces Langerhans Cell Migration. *Curr. Eye Res.* **2000**, *21*, 550–553.

24. Knop, N.; Knop, E. Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in the Human Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 1270–1279.

25. Thrimawithana, T.R.; Young, S.; Bunt, C.R.; Green, C.; Alany, R.G. Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye. *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 270–277, doi:10.1016/j.drudis.2010.12.004.

26. Herrero-Vanrell, R., De La Torre, M. V., Andrés-Guerrero, V., Barbosa-Alfaro, D., Molina-Martínez, I. T., & Bravo-Osuna, I. Nano and Microtechnologies for Ophthalmic Administration , an Overview. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2013**, *23*, 75–102, doi:10.1016/S1773-2247(13)50016-5.

27. Kaur, I.P.; Kanwar, M. Ocular Preparations: The Formulation Approach. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 473–493, doi:10.1081/DDC-120003445.

28. Bucolo, C.; Drago, F.; Salomone, S. Ocular Drug Delivery: A Clue from Nanotechnology. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3 OCT*, 2002–2004, doi:10.3389/fphar.2012.00188.

29. Shen; Lu, J.G.W.; Hughes, P. Targeted Ocular Drug Delivery with Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Considerations. *Pharm Res* **2018**, *35*.

30. Ramsay, E.; Ruponen, M.; Picardat, T.; Tengvall, U.; Tuomainen, M.; Auriola, S.; Toropainen, E.; Urtti, A.; Amo, E.M. Impact of Chemical Structure on Conjunctival Drug Permeability: Adopting Porcine Conjunctiva and Cassette Dosing for Construction of in Silico Model. *J. Pharm. Sci.* **2017**, doi:10.1016/j.xphs.2017.04.061.

31. Raghava, S.; Hammond, M.; Kompella, U.B. Periocular Routes for Retinal Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2004**, *1*, 99–114.

32. Gaudana, R.; Jwala, J.; Boddu, S.H.S.; Mitra, A.K. Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 1197–1216, doi:10.1007/s11095-008-9694-0.

33. Moisseiev, E.; Loewenstein, A. Drug Delivery to the Posterior Segment of the

Eye. *Dev. Ophthalmol.* **2017**, *58*, 87–101, doi:10.1159/000455276.

34. Craig, J.P.; Nichols, K.K.; Akpek, E.K.; Caffery, B.; Dua, H.S.; Joo, C.; Liu, Z.; Nelson, J.D.; Nichols, J.J.; Tsubota, K.; et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 276–283, doi:10.1016/j.jtos.2017.05.008.

35. Stapleton, F.; Alves, M.; Bunya, V.Y.; Jalbert, I.; Lekhanont, K.; Malet, F.; Na, K.S.; Schaumberg, D.; Uchino, M.; Vehof, J.; et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 334–365, doi:10.1016/j.jtos.2017.05.003.

36. Wolffsohn, J.S.; Arita, R.; Chalmers, R.; Djalilian, A.; Dogru, M.; Dumbleton, K.; Gupta, P.K.; Karpecki, P.; Lazreg, S.; Pult, H.; et al. TFOS DEWS II Diagnostic Methodology Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 539–574, doi:10.1016/j.jtos.2017.05.001.

37. Qlflyq, D.H.; Fdflyq, F.; Vreuh, L.; Vhfr, R.M.R.; Ghilqlflyq, X.Q.D.; Dgd, D.; Odv, G.H.; Gho, F.; Suhvhqwdurq, V.H.; Plhpeurv, D.O.R. V; et al. Definición y Casificación de La Enfermedad Del Ojo Seco. *Ocul. Surf.* **2007**, *5*, 75–92.

38. Bron, A.J.; de Paiva, C.S.; Chauhan, S.K.; Bonini, S.; Gabison, E.E.; Jain, S.; Knop, E.; Markoulli, M.; Ogawa, Y.; Perez, V.; et al. TFOS DEWS II Pathophysiology Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 438–510, doi:10.1016/j.jtos.2017.05.011.

39. Jones, L.; Downie, L.E.; Korb, D.; Benitez-del-Castillo, J.M.; Dana, R.; Deng, S.X.; Dong, P.N.; Geerling, G.; Hida, R.Y.; Liu, Y.; et al. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 575–628, doi:10.1016/j.jtos.2017.05.006.

40. Greiner, J. V. A Single LipiFlow® Thermal Pulsation System Treatment Improves Meibomian Gland Function and Reduces Dry Eye Symptoms for 9 Months. *Curr. Eye Res.* **2012**, *37*, 272–278, doi:10.3109/02713683.2011.631721.

41. Jones, L.; Downie, L.E.; Korb, D.; Benitez-del-castillo, J.M.; Dana, R.; Deng, S.X.; Dong, P.N.; Geerling, G.; Hida, R.Y.; Liu, Y.; et al. TFOS DEWS II

Management and Therapy Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 575–628, doi:10.1016/j.jtos.2017.05.006.

42. Downie, L.E.; Ng, S.M.; Lindsley, K.B.; Akpek, E.K. Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids for Dry Eye Disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2019**, *2019*, doi:10.1002/14651858.CD011016.pub2.

43. Molina-Leyva, I.; Molina-Leyva, A.; Bueno-Cavanillas, A. Efficacy of Nutritional Supplementation with Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Dry Eye Syndrome: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Acta Ophthalmol.* **2017**, *95*, e677–e685, doi:10.1111/aos.13428.

44. Houlsby, R.D.; Ghajar, M.; Chavez, G. Antimicrobial Activity of Borate-Buffered Solutions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *89*, 803–806.

45. Vicario-de-la-Torre, M.; Caballo-González, M.; Vico, E.; Morales-Fernández, L.; Arriola-Villalobos, P.; Heras, B. de las; Benítez-del-Castillo, J.M.; Guzmán, M.; Millar, T.; Herrero-Vanrell, R.; et al. Novel Nano-Liposome Formulation for Dry Eyes with Components Similar to the Preocular Tear Film. *Polymers (Basel).* **2018**, *10*, 1–13, doi:10.3390/polym10040425.

46. González Cela Casamayor, M.A.; López Cano, J.J.; Andrés Guerrero, V.; Herrero Vanrell, R.; Benítez del Castillo, J.M.; Molina Martínez, I.T. A Novel Osmoprotective Liposomal Formulation from Synthetic Phospholipids to Reduce in Vitro Hyperosmolar Stress in Dry Eye Treatments. *J. Liposome Res.* **2022**, 1–12, doi:10.1080/08982104.2022.2087083.

47. Hotujac Grgurević, M.; Juretić, M.; Hafner, A.; Lovrić, J.; Pepić, I. Tear Fluid-Eye Drops Compatibility Assessment Using Surface Tension. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43*, 275–282, doi:10.1080/03639045.2016.1238924.

48. Davidson, H.J.; Kuonen, V.J. The Tear Film and Ocular Mucins. *Vet. Ophthalmol.* **2004**, *7*, 71–77.

49. McDonald, M.; D'Aversa, G.; Perry, H.D.; Wittpenn, J.R.; Nelinson, D.S. Correlating Patient-Reported Response to Hydroxypropyl Cellulose Ophthalmic Insert (LACRISERT®) Therapy with Clinical Outcomes: Tools for Predicting

Response. *Curr. Eye Res.* **2010**, *35*, 880–887, doi:10.3109/02713683.2010.495811.

50. Wegener, A.R.; Meyer, L.M.; Schönfeld, C.L. Effect of Viscous Agents on Corneal Density in Dry Eye Disease. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2015**, *31*, 504–508, doi:10.1089/jop.2014.0157.

51. Yang, Y.J.; Lee, W.Y.; Kim, Y.J.; Hong, Y.P. A Meta-Analysis of the Efficacy of Hyaluronic Acid Eye Drops for the Treatment of Dry Eye Syndrome. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 1–14, doi:10.3390/ijerph18052383.

52. Grus, N.P.E.J.S.R.D.W.C.M.N.P.F. Thealoz® Duo Eye Drops Protect the Ocular Surface of Dry Eye Patients by Breaking the Inflammatory Vicious Cycle. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2022**, *63*.

53. López-Cano, J.J.; González-Cela-Casamayor, M.A.; Andrés-Guerrero, V.; Herrero-Vanrell, R.; Benítez-Del-Castillo, J.M.; Molina-Martínez, I.T. Combined Hyperosmolarity and Inflammatory Conditions in Stressed Human Corneal Epithelial Cells and Macrophages to Evaluate Osmoprotective Agents as Potential DED Treatments. *Exp. Eye Res.* **2021**, *211*, 108723, doi:10.1016/j.exer.2021.108723.

54. Jee, D.; Park, S.H.; Kim, M.S.; Kim, E.C. Antioxidant and Inflammatory Cytokine in Tears of Patients with Dry Eye Syndrome Treated with Preservative-Free versus Preserved Eye Drops. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 5081–5089, doi:10.1167/iovs.14-14483.

55. Kim, E.C.; Choi, J.S.; Joo, C.K. A Comparison of Vitamin A and Cyclosporine A 0.05% Eye Drops for Treatment of Dry Eye Syndrome. *Am J Ophthalmol* **2009**, *147*, 206–213, doi:10.1016/j.ajo.2008.08.015.

56. Teeravee Hongyok, MD; Jemin J. Chae, DVM; Young Joo Shin, MD; Daero Na, MD; Li Li, MD; Roy S. Chuck, M. Effect of Chitosan-N-Acetylcysteine Conjugate in a Mouse Model of Botulinum Toxin B–Induced Dry Eye. *Arch Ophthalmol* **2009**, *127*, 525–532.

57. Garrigue, J.S.; Amrane, M.; Faure, M.O.; Holopainen, J.M.; Tong, L. Relevance

of Lipid-Based Products in the Management of Dry Eye Disease. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2017**, *33*, 647–661, doi:10.1089/jop.2017.0052.

58. Walsh, K.; Jones, L. The Use of Preservatives in Dry Eye Drops. *Clin. Ophthalmol.* 2019, *13*, 1409–1425.

59. Rathore, M.S.; Majumdar, D.K. Effect of Formulation Factors on in Vitro Transcorneal Permeation of Gatifloxacin from Aqueous Drops. *AAPS PharmSciTech* **2006**, *7*, E12, doi:10.1208/pt070357.

60. Barabino, S.; Antonelli, S.; Cimbolini, N.; Mauro, V.; Bouzin, M. The Effect of Preservatives and Antiglaucoma Treatments on the Ocular Surface of Mice with Dry Eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 6499–6504, doi:10.1167/iovs.14-14548.

61. Actis, A.G.; Rolle, T. Ocular Surface Alterations and Topical Antiglaucomatous Therapy : A Review. *Open Ophthalmol. J.* **2014**, 67–72.

62. Metheetrairut, C.; Ngowyutagon, P.; Tunganuntarat, A.; Khowawisetsut, L.; Kittisares, K.; Prabhasawat, P. Comparison of Epitheliotrophic Factors in Platelet-Rich Plasma versus Autologous Serum and Their Treatment Efficacy in Dry Eye Disease. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1–9, doi:10.1038/s41598-022-12879-x.

63. Shih, K.C.; Lun, C.N.; Jhanji, V.; Thong, B.Y.H.; Tong, L. Systematic Review of Randomized Controlled Trials in the Treatment of Dry Eye Disease in Sjogren Syndrome. *J. Inflamm. (United Kingdom)* **2017**, *14*, 1–11, doi:10.1186/s12950-017-0174-3.

64. Watanabe, H. Medical Treatment for Dry Eye in Japan. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, DES116–DES120, doi:10.1167/iovs.18-24130.

65. Park, J.H.; Moon, S.H.; Kang, D.H.; Um, H.J.; Kang, S.S.; Kim, J.Y.; Tchah, H. Diquafosol Sodium Inhibits Apoptosis and Inflammation of Corneal Epithelial Cells via Activation of Erk1/2 and RSK: In Vitro and in Vivo Dry Eye Model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 5108–5115, doi:10.1167/iovs.17-22925.

66. Shamloo, K.; Barbarino, A.; Alfuraih, S.; Sharma, A. Graft versus Host Disease-

Associated Dry Eye: Role of Ocular Surface Mucins and the Effect of Rebamipide, a Mucin Secretagogue. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2019**, *60*, 4511–4519, doi:10.1167/iovs.19-27843.

67. Nakamura, T.; Hata, Y.; Nagata, M.; Yokoi, N.; Yamaguchi, S.; Kaku, T.; Kinoshita, S. JBP485 Promotes Tear and Mucin Secretion in Ocular Surface Epithelia. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–11, doi:10.1038/srep10248.

68. He, H.; Ding, H.; Liao, A.; Liu, Q.; Yang, J.; Zhong, X. Effects of Mycophenolate Mofetil on Proliferation and Mucin-5AC Expression in Human Conjunctival Goblet Cells in Vitro. *Mol. Vis.* **2010**, *16*, 1913–1919.

69. Patel, R.; Zhu, M.; Robertson, D.M. Shifting the IGF-Axis: An Age-Related Decline in Human Tear IGF-1 Correlates with Clinical Signs of Dry Eye. *Growth Horm. IGF Res.* **2018**, *40*, 69–73, doi:10.1016/j.ghir.2018.02.001.

70. Ding, J.; Sullivan, D.A. The Effects of Insulin-like Growth Factor 1 and Growth Hormone on Human Meibomian Gland Epithelial Cells. *JAMA Ophthalmol.* **2014**, *132*, 593–599, doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.8295.

71. Foulks, G.N. Pharmacological Management of Dry Eye in the Elderly Patient. *Drugs and Aging* **2008**, *25*, 105–118, doi:10.2165/00002512-200825020-00003.

72. Baba, M.S.G.W.O.G.J.G.P.D.E.M.H.S. Effect of TrueTear™ on Dry Eye Symptoms During Exposure to a Controlled Adverse Environment. *ARVO Annu. Meet. Abstr.* **2018**, *59*.

73. Murube, J.; Murube, E. Treatment of Dry Eye by Blocking the Lacrimal Canaliculi. *Surv. Ophthalmol.* **1996**, *40*, 463–480, doi:10.1016/S0039-6257(96)82013-3.

74. Cutolo, C.A.; Barabino, S.; Bonzano, C.; Traverso, C.E. The Use of Topical Corticosteroids for Treatment of Dry Eye Syndrome. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **2019**, *27*, 266–275, doi:10.1080/09273948.2017.1341988.

75. Stapleton, F.; Alves, M.; Bunya, V.Y.; Jalbert, I.; Lekhanont, K.; Malet, F.; Na, K.; Schaumberg, D.; Uchino, M.; Vehof, J.; et al. TFOS DEWS II Epidemiology

Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 334–365, doi:10.1016/j.jtos.2017.05.003.

76. Truong, S.; Cole, N.; Stapleton, F.; Golebiowski, B. Sex Hormones and the Dry Eye. *Clin. Exp. Optom.* **2014**, *97*, 324–336, doi:10.1111/cxo.12147.

77. Sullivan, D.A.; Rocha, E.M.; Aragona, P.; Clayton, J.A.; Ding, J.; Golebiowski, B.; Hampel, U.; McDermott, A.M.; Schaumberg, D.A.; Srinivasan, S.; et al. TFOS DEWS II Sex, Gender, and Hormones Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 284–333, doi:10.1016/j.jtos.2017.04.001.

78. Gökçe, E.H.; Sandri, G.; Eğrilmez, S.; Bonferoni, M.C.; Güneri, T.; Caramella, C.; Gökçe, E.H.; Sandri, G.; Eğrilmez, S.; Bonferoni, M.C.; et al. Cyclosporine A-Loaded Solid Lipid Nanoparticles : Ocular Tolerance and In Vivo Drug Release in Rabbit Eyes Cyclosporine A-Loaded Solid Lipid Nanoparticles : Ocular Tolerance and In Vivo Drug Release in Rabbit Eyes. **2009**, *3683*, doi:10.3109/02713680903261405.

79. Deshmukh, R.; Ting, D.S.J.; Elsahn, A.; Mohammed, I.; Said, D.G.; Dua, H.S. Real-World Experience of Using Ciclosporin-A 0.1% in the Management of Ocular Surface Inflammatory Diseases. *Br. J. Ophthalmol.* **2022**, *106*, 1087–1092, doi:10.1136/bjophthalmol-2020-317907.

80. Moscovici, B.K.; Holzchuh, R.; Chiacchio, B.B.; Santo, R.M.; Shimazaki, J.; Hida, R.Y. Clinical Treatment of Dry Eye Using 0.03% Tacrolimus Eye Drops. *Cornea* **2012**, *31*, 945–949, doi:10.1097/ICO.0b013e31823f8c9b.

81. Moscovici, B.K.; Holzchuh, R.; Sakassegawa-Naves, F.E.; Hoshino-Ruiz, D.R.; Albers, M.B.V.; Santo, R.M.; Hida, R.Y. Treatment of Sjögren's Syndrome Dry Eye Using 0.03% Tacrolimus Eye Drop: Prospective Double-Blind Randomized Study. *Contact Lens Anterior Eye* **2015**, *38*, 373–378, doi:10.1016/j.clae.2015.04.004.

82. Sawazaki, R.; Ishihara, T.; Usui, S.; Hayashi, E.; Tahara, K.; Hoshino, T.; Higuchi, A.; Nakamura, S.; Tsubota, K.; Mizushima, T. Diclofenac Protects Cultured Human Corneal Epithelial Cells against Hyperosmolarity and Ameliorates Corneal Surface Damage in a Rat Model of Dry Eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 2547–2556, doi:10.1167/iovs.13-13850.

83. Haber, S.L.; Benson, V.; Buckway, C.J.; Gonzales, J.M.; Romanet, D.; Scholes, B. Lifitegrast: A Novel Drug for Patients with Dry Eye Disease. *Ther. Adv. Ophthalmol.* **2019**, *11*, 251584141987036, doi:10.1177/2515841419870366.

84. Eye, D.; Patel, J.; Franko, J. Lifitegrast Ophthalmic Solution. **2018**, 119–121.

85. Sant'Anna, A.E.B.P.P.; Hazarbassanov, R.M.; De Freitas, D.; Gomes, J.Á.P. Minor Salivary Glands and Labial Mucous Membrane Graft in the Treatment of Severe Symblepharon and Dry Eye in Patients with Stevens-Johnson Syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* **2012**, *96*, 234–239, doi:10.1136/bjo.2010.199901.

86. Suri, K.; Kosker, M.; Raber, I.M.; Hammersmith, K.M.; Nagra, P.K.; Ayres, B.D.; Halfpenny, C.P.; Rapuano, C.J. Sutureless Amniotic Membrane ProKera for Ocular Surface Disorders: Short-Term Results. *Eye Contact Lens* **2013**, *39*, 341–347, doi:10.1097/ICL.0b013e3182a2f8fa.

87. Zhou, T.E.; Robert, M.C. Comparing ProKera With Amniotic Membrane Transplantation: Indications, Outcomes, and Costs. *Cornea* **2022**, *41*, 840–844, doi:10.1097/ICO.0000000000002852.

88. Maulvi, F.A.; Shaikh, A.A.; Lakdawala, D.H.; Desai, A.R.; Pandya, M.M.; Singhania, S.S.; Vaidya, R.J.; Ranch, K.M.; Vyas, B.A.; Shah, D.O. Design and Optimization of a Novel Implantation Technology in Contact Lenses for the Treatment of Dry Eye Syndrome: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Acta Biomater.* **2017**, *53*, 211–221, doi:10.1016/j.actbio.2017.01.063.

89. Guzman-Aranguez, A.; Fonseca, B.; Carracedo, G.; Martin-Gil, A.; Martinez-Aguila, A.; Pintor, J. Dry Eye Treatment Based on Contact Lens Drug Delivery: A Review. *Eye Contact Lens* **2016**, *42*, 280–288, doi:10.1097/ICL.0000000000000184.

90. Luchs, J.I.; Nelinson, D.S.; Macy, J.I. Efficacy of Hydroxypropyl Cellulose Ophthalmic Inserts (LACRISERT) in Subsets of Patients with Dry Eye Syndrome: Findings from a Patient Registry. *Cornea* **2010**, *29*, 1417–1427, doi:10.1097/ICO.0b013e3181e3f05b.

91. Wagh, V.D.; Apar, D.U. Cyclosporine a Loaded PLGA Nanoparticles for Dry

Eye Disease: In Vitro Characterization Studies. *J. Nanotechnol.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/683153.

92. Ratay, M.L.; Balmert, S.C.; Acharya, A.P.; Greene, A.C.; Meyyappan, T.; Little, S.R. TRI Microspheres Prevent Key Signs of Dry Eye Disease in a Murine, Inflammatory Model. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–9, doi:10.1038/s41598-017-17869-y.

93. Kasliwal, D.R. Formulation and Evaluation of in Situ Ocular Gel for Dry Eye Syndrome. *World J. Pharm. Res.* **2017**, *6*, 1077–1105, doi:10.20959/wjpr20175-8404.

94. Fernández-Ferreiro, A.; González Barcia, M.; Gil-Martínez, M.; Vieites-Prado, A.; Lema, I.; Argibay, B.; Blanco Méndez, J.; Lamas, M.J.; Otero-Espinar, F.J. In Vitro and in Vivo Ocular Safety and Eye Surface Permanence Determination by Direct and Magnetic Resonance Imaging of Ion-Sensitive Hydrogels Based on Gellan Gum and Kappa-Carrageenan. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *94*, 342–351, doi:10.1016/j.ejpb.2015.06.003.

95. Acar, D.; Molina-Martínez, I.T.; Gómez-Ballesteros, M.; Guzmán-Navarro, M.; Benítez-del-Castillo, J.M.; Herrero-Vanrell, R. Novel Liposome-Based and in Situ Gelling Artificial Tear Formulation for Dry Eye Disease Treatment. *Contact Lens Anterior Eye* **2018**, *41*, 93–96, doi:10.1016/j.clae.2017.11.004.

96. Yu, Y.; Chow, D.W.Y.; Lau, C.M.L.; Zhou, G.; Back, W.; Xu, J.; Carim, S.; Chau, Y. A Bioinspired Synthetic Soft Hydrogel for the Treatment of Dry Eye. *Bioeng. Transl. Med.* **2021**, *6*, 1–11, doi:10.1002/btm2.10227.

97. Burgalassi, S.; Fragai, M.; Francesconi, O.; Cerofolini, L.; Monti, D.; Leone, G.; Lamponi, S.; Greco, G.; Magnani, A.; Nativi, C. Functionalized Hyaluronic Acid for " In Situ " Matrix Metalloproteinase Inhibition: A Bioactive Material to Treat the Dry Eye Sydrome . *ACS Macro Lett.* **2022**, 1190–1194, doi:10.1021/acsmacrolett.2c00455.

98. Chauhan, A.; Anton, B.; Singh, M.K. *Dendrimers for Drug Solubilization, Dissolution and Bioavailability*; Elsevier Inc., 2019; ISBN 9780128145272.

99. Lin, H.; Liu, Y.; Kambhampati, S.P.; Hsu, C.C.; Kannan, R.M.; Yiu, S.C.

Subconjunctival Dendrimer-Drug Therapy for the Treatment of Dry Eye in a Rabbit Model of Induced Autoimmune Dacryoadenitis. *Ocul. Surf.* **2018**, *16*, 415–423, doi:10.1016/j.jtos.2018.05.004.

100. Başaran, E.; Demirel, M.; Sirmagül, B.; Yazan, Y. Cyclosporine-A Incorporated Cationic Solid Lipid Nanoparticles for Ocular Delivery. *J. Microencapsul.* **2010**, *27*, 37–47, doi:10.3109/02652040902846883.

101. Niamprem, P.; Teapavarapruk, P.; Srinivas, S.P.; Tiyaboonchai, W. Impact of Nanostructured Lipid Carriers as an Artificial Tear Film in a Rabbit Evaporative Dry Eye Model. *Cornea* **2019**, *38*, 485–491, doi:10.1097/ICO.0000000000001867.

102. Tan, G.; Li, J.; Song, Y.; Yu, Y.; Liu, D.; Pan, W. Phenylboronic Acid-Tethered Chondroitin Sulfate-Based Mucoadhesive Nanostructured Lipid Carriers for the Treatment of Dry Eye Syndrome. *Acta Biomater.* **2019**, *99*, 350–362, doi:10.1016/j.actbio.2019.08.035.

103. Liu, X.; Ma, S.S.; Zhong, J.X. Recent Advances of Exosomes in Immune-Mediated Eye Diseases. *Int. Eye Sci.* **2021**, *21*, 476–479, doi:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.3.20.

104. Zhou, T.; He, C.; Lai, P.; Yang, Z.; Liu, Y.; Xu, H.; Lin, X.; Ni, B.; Ju, R.; Yi, W.; et al. MiR-204-Containing Exosomes Ameliorate GVHD-Associated Dry Eye Disease. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, doi:10.1126/sciadv.abj9617.

105. Wang, G.; Li, H.; Long, H.; Gong, X.; Hu, S.; Gong, C. Exosomes Derived from Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Benzalkonium Chloride-Induced Mouse Dry Eye Model via Inhibiting NLRP3 Inflammasome. *Ophthalmic Res.* **2022**, *65*, 40–51, doi:10.1159/000519458.

106. López-Cano, J.J.; González-Cela-Casamayor, M.A.; Andrés-Guerrero, V.; Vicario -de-la-Torre, M.; Benítez del Castillo, J.M.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Development of an Osmoprotective Microemulsion as a Therapeutic Platform for Ocular Surface Protection. *Int. J. Pharm.* **2022**, *623*, doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121948.

107. Elsana, H.; Olusanya, T.O.B.; Carr-wilkinson, J.; Darby, S.; Faheem, A.; Elkordy, A.A. Evaluation of Novel Cationic Gene Based Liposomes with Cyclodextrin Prepared by Thin Film Hydration and Microfluidic Systems. *Sci. Rep.* **2019**, 1–17, doi:10.1038/s41598-019-51065-4.

108. Vicario-de-la-Torre, M.; Benítez-del-Castillo, J.M.; Vico, E.; Guzmán, M.; de-las-Heras, B.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Design and Characterization of an Ocular Topical Liposomal Preparation to Replenish the Lipids of the Tear Film. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 7839–7847, doi:10.1167/iovs.14-14700.

109. Coatings, O.; Division, P. Preparation of Liposomes by Reverse-Phase Evaporation Using Alternative Organic Solvents. *J. os Microencapsul.* **1999**, *16*, 231–242.

110. Jaafar-Maalej, C.; Diab, R.; Andrieu, V.; Elaissari, A.; Fessi, H. Ethanol Injection Method for Hydrophilic and Lipophilic Drug-Loaded Liposome Preparation. *J. Liposome Res.* **2010**, *20*, 228–243, doi:10.3109/08982100903347923.

111. Yu, B.; Lee, R.J.; Lee, L.J. Microfluidic Methods for Production of Liposomes. *Methods Enzymol.* **2009**, *465*, 129–141, doi:10.1016/S0076-6879(09)65007-2.

112. Grassiri, B.; Zambito, Y.; Bernkop-Schnürch, A. Strategies to Prolong the Residence Time of Drug Delivery Systems on Ocular Surface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *288*, doi:10.1016/j.cis.2020.102342.

113. María Ángela Caballo González Estudio de Formulaciones Liposomales Oftálmicas. Aplicación En La Enfermedad de Ojo Seco., 2020.

114. Meng, T.; Kulkarni, V.; Simmers, R.; Brar, V.; Xu, Q. Therapeutic Implications of Nanomedicine for Ocular Drug Delivery. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1524–1538, doi:10.1016/j.drudis.2019.05.006.

115. Ateeq, R.; Veikko, U.; Daniel, L. Mini Review on Emerging Methods of Preparation of Liposome and Its Application as Liposome Drug Delivery Systems. *Open J. Pharmacol. Pharmacother.* **2018**, *3*, 005–021, doi:10.17352/ojpp.000007.

116. Toh, M.R.; Chiu, G.N.C. Liposomes as Sterile Preparations and Limitations of Sterilisation Techniques in Liposomal Manufacturing. *Asian J. Pharm. Sci.* **2013**, *8*, 88–95, doi:10.1016/j.ajps.2013.07.011.

117. London, A.; Benhar, I.; Schwartz, M. The Retina as a Window to the Brain. *Nat. Rev. Neurol.* **2012**, *9*, 44–53, doi:10.1038/nrneurol.2012.227.

118. Fahmideh, F.; Boschi, F.; Pascale, A.; Barbieri, A. Ocular Neurodegenerative Diseases : Interconnection Between. *Cells* **2021**, *10*.

119. Nita, M.B.; Grzybowski, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**.

120. Barber, A.J. A New View of Diabetic Retinopathy : A Neurodegenerative Disease of the Eye. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2003**, *27*, 283–290, doi:10.1016/S0278-5846(03)00023-X.

121. Lieth, E.; Gardner, T.W.; Barber, A.J.; Antonetti, D.A.; Penn, T.; Retina, S. Viewpoint Retinal Neurodegeneration : Early Pathology in Diabetes. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2000**, *28*, 3–8.

122. Gupta, N.; Yu, Y.H. Glaucoma as a Neurodegenerative Disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2007**, *18*, 110–114.

123. Mirzaei, M.; Gupta, V.K.; Chitranshi, N.; Deng, L.; Wu, Y.; Mckay, M.J.; Salekdeh, G.H.; Gupta, V.B.; Haynes, P.A.; Graham, S.L. Retinal Proteomics of Experimental Glaucoma Model Reveal Intraocular Pressure - Induced Mediators of Neurodegenerative Changes. *J. Cell. Biochem.* **2020**, *121*, 4931–4944, doi:10.1002/jcb.29822.

124. Review, C. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma A Review. *Clin. Rev. Educ.* **2014**, *311*, 1901–1911, doi:10.1001/jama.2014.3192.

125. Mozaffarieh, M.; Grieshaber, M.C.; Flammer, J. Review Oxygen and Blood Flow : Players in the Pathogenesis of Glaucoma. *Mol. Vis.* **2008**, *14*, 224–233.

126. Press, A.I.N. Oxidative Stress in Glaucomatous Neurodegeneration : Mechanisms and Consequences. *Prog. Retin. Eye Res.* **2006**, *25*, 490–513, doi:10.1016/j.preteyeres.2006.07.003.

127. Sheybani, A.; Scott, R.; Samuelson, T.W.; Kahook, M.Y.; Bettis, D.I.; Ike, I.; David, K.A.J. Open-Angle Glaucoma : Burden of Illness , Current Therapies , and the Management of Nocturnal IOP Variation. *Ophthalmol. Ther.* **2021**, 1–14, doi:10.1007/s40123-019-00222-z.

128. Nüßle, S.; Reinhard, T.; Lübke, J. Acute Closed-Angle Glaucoma — An Ophthalmological Emergency. *Contin. Med. Educ.* **2021**, doi:10.3238/arztebl.m2021.0264.

129. Ã, S.S.H. Neovascular Glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* **2007**, *26*, 470–485, doi:10.1016/j.preteyeres.2007.06.001.

130. Banu, E.T.; Acar, T.S. Effect of Ketorolac Add-On Treatment on Intra-Ocular Pressure in Glaucoma Patients Receiving Prostaglandin Analogues. *Ophthalmologica* **2012**, *227*, 205–209, doi:10.1159/000333822.

131. Nadal-Nicolás, F.M.; Rodriguez-Villagra, E.; Bravo-Osuna, I.; Sobrado-Calvo, P.; Molina-Martínez, I.; Villegas-Pérez, M.P.; Vidal-Sanz, M.; Agudo-Barriuso, M.; Herrero-Vanrell, R. Ketorolac Administration Attenuates Retinal Ganglion Cell Death after Axonal Injury. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 1183–1192, doi:10.1167/iovs.15-18213.

132. Toris, C.B.; Gabelt, B.T.; Kaufman, P.L. Update on the Mechanism of Action of Topical Prostaglandins for Intraocular Pressure Reduction. *Surv. Ophthalmol.* **2008**, *53*, doi:10.1016/j.survophthal.2008.08.010.

133. P PELLINEN, Y ESAKI, A.S. Ocular Tolerability of Preservative-Free Prostaglandin Eye Drop. *Acta Ophthalmol.* **2013**, *91*.

134. Whitson, J.T. Travoprost - A New Prostaglandin Analogue for the Treatment of Glaucoma. *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3*, 965–977, doi:10.1517/14656566.3.7.965.

135. Lee, A.J.; Goldberg, I. Emerging Drugs for Ocular Hypertension. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2011**, *16*, 137–161, doi:10.1517/14728214.2011.521631.

136. Shirley, M. Bimatoprost Implant: First Approval. *Drugs and Aging* **2020**, *37*, 457–462, doi:10.1007/s40266-020-00769-8.

137. Conlon, R.; Saheb, H.; Ahmed, I.I.K. Glaucoma Treatment Trends: A Review. *Can. J. Ophthalmol.* **2017**, *52*, 114–124, doi:10.1016/j.jcjo.2016.07.013.

138. Rahman, M.Q.; Ramaesh, K.; Montgomery, D.M. Brimonidine for Glaucoma. *Expert Opin. Drug Saf.* **2010**, *9*, 483–491, doi:10.1517/14740331003709736.

139. Acheampong, A.A.; Small, D.; Baumgarten, V.; Welty, D.; Tang-Liu, D. Formulation Effects on Ocular Absorption of Brimonidine in Rabbit Eyes. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2002**, *18*, 325–337, doi:10.1089/10807680260218498.

140. Gómez-Ballesteros, M.; López-Cano, J.J.; Bravo-Osuna, I.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Osmoprotectants in Hybrid Liposome/HPMC Systems as Potential Glaucoma Treatment. *Polymers (Basel).* **2019**, *11*, doi:10.3390/polym11060929.

141. Qiu, T.G.; Qiu, T.G. Expert Opinion on Investigational Drugs Trabodenoson on Trabecular Meshwork Rejuvenation : A Comprehensive Review of Clinical Data Clinical Data. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2021**, *30*, 227–236, doi:10.1080/13543784.2021.1873276.

142. Liu, P.; Wang, F.; Song, Y.; Wang, M.; Zhang, X. Current Situation and Progress of Drugs for Reducing Intraocular Pressure. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **2022**, *13*, 1–19, doi:10.1177/20406223221140392.

143. Zhong, Y.; Yang, Z.; Huang, W.C.; Luo, X. Adenosine, Adenosine Receptors and Glaucoma: An Updated Overview. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 2882–2890, doi:10.1016/j.bbagen.2013.01.005.

144. Berrino, E.; Supuran, C.T. Expert Opinion on Therapeutic Patents Rho-Kinase Inhibitors in the Management of Glaucoma. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2019**, *00*, 1–11, doi:10.1080/13543776.2019.1670812.

145. Tanna, A.P.; Johnson, M. Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension. *Ophthalmology* **2018**, doi:10.1016/j.ophtha.2018.04.040.

146. Chidlow, G.; Wood, J.P.M.; Casson, R.J. Pharmacological Neuroprotection for Glaucoma. *Drugs* **2007**, *67*, 725–759.

147. Celiker, H.; Yuksel, N.; Solakoglu, S.; Karabas, L. Neuroprotective Effects of Memantine in the Retina of Glaucomatous Rats : An Electron Microscopic Study. *J Ophthalmic Vis Res 2016;* **2016**, *11*, 174–182, doi:10.4103/2008-322X.183934.

148. Ghaffariyeh, A.; Honarpisheh, N.; Heidari, M.H.; Puyan, S.; Abasov, F. Brain-Derived Neurotrophic Factor as a Biomarker in Primary Open-Angle Glaucoma. *Optom. Vis. Sci.* **2011**, *88*, 80–85, doi:10.1097/OPX.0b013e3181fc329f.

149. Johnson, T. V.; Bull, N.D.; Martin, K.R. Neurotrophic Factor Delivery as a Protective Treatment for Glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2011**, *93*, 196–203, doi:10.1016/j.exer.2010.05.016.

150. Garcia-Medina, J.J.; Rubio-Velazquez, E.; Lopez-Bernal, M.D.; Cobo-Martinez, A.; Zanon-Moreno, V.; Pinazo-Duran, M.D.; Del-Rio-Vellosillo, M. Glaucoma and Antioxidants: Review and Update. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–15, doi:10.3390/antiox9111031.

151. Zhang, X.; Feng, Y.; Wang, Y.; Wang, J.; Xiang, D.; Niu, W.; Yuan, F. Resveratrol Ameliorates Disorders of Mitochondrial Biogenesis and Dynamics in a Rat Chronic Ocular Hypertension Model. *Life Sci.* **2018**, *207*, 234–245, doi:10.1016/j.lfs.2018.06.010.

152. Cao, K.; Ishida, T.; Fang, Y.; Shinohara, K.; Li, X.; Nagaoka, N.; Ohno-Matsui, K.; Yoshida, T. Protection of the Retinal Ganglion Cells: Intravitreal Injection of Resveratrol in Mouse Model of Ocular Hypertension. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2020**, *61*, doi:10.1167/iovs.61.3.13.

153. Reiter, R.J.; Mayo, J.C.; Tan, D.X.; Sainz, R.M.; Alatorre-Jimenez, M.; Qin, L. Melatonin as an Antioxidant: Under Promises but over Delivers. *J. Pineal Res.* **2016**, 253–278, doi:10.1111/jpi.12360.

154. Ye, D.; Xu, Y.; Shi, Y.; Fan, M.; Lu, P.; Bai, X. Anti - PANoptosis Is Involved in Neuroprotective Effects of Melatonin in Acute Ocular Hypertension Model. *J. Pineal Res.* **2022**, doi:10.1111/jpi.12828.

155. Caprioli, J.; Ishii, Y.; Kwong, J.M.K.; Gaasterland, D.E. Retinal Ganglion Cell Protection with Geranylgeranylacetone, a Heat Shock Protein Inducer, in a Rat Glaucoma Model. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **2003**, *101*, 39–51.

156. Kitamura, Y.; Bikbova, G.; Baba, T.; Yamamoto, S.; Oshitari, T. In Vivo Effects of Single or Combined Topical Neuroprotective and Regenerative Agents on Degeneration of Retinal Ganglion Cells in Rat Optic Nerve Crush Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–8, doi:10.1038/s41598-018-36473-2.

157. Daruich, A.; Picard, E.; Guégan, J.; Jaworski, T.; Parenti, L.; Delaunay, K.; Naud, M.C.; Berdugo, M.; Boatright, J.H.; Behar-Cohen, F. Comparative Analysis of Urso-and Tauroursodeoxycholic Acid Neuroprotective Effects on Retinal Degeneration Models. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1–11, doi:10.3390/ph15030334.

158. Guymer, C.; Wood, J.P.M.; Chidlow, G.; Casson, R.J. Neuroprotection in Glaucoma: Recent Advances and Clinical Translation. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2019**, *47*, 88–105, doi:10.1111/ceo.13336.

159. Li, H.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Fang, D.; Xu, B.; Zhang, L.; Chen, T.; Ren, K.; Nie, Y.; Yao, S.; et al. Liposomes as a Novel Ocular Delivery System for Brinzolamide: In Vitro and In Vivo Studies. *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17*, 710–717, doi:10.1208/s12249-015-0382-1.

160. Kouchak, M.; Malekahmadi, M.; Bavarsad, N.; Saki Malehi, A.; Andishmand, L. Dorzolamide Nanoliposome as a Long Action Ophthalmic Delivery System in Open Angle Glaucoma and Ocular Hypertension Patients. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2018**, *44*, 1239–1242, doi:10.1080/03639045.2017.1386196.

161. Londhe, V.Y.; Sharma, S. Formulation, Characterization, Optimization and in-Vivo Evaluation of Methazolamide Liposomal in-Situ Gel for Treating Glaucoma. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *67*, 102951, doi:10.1016/j.jddst.2021.102951.

162. Hathout, R.M.; Gad, H.A.; Abdel-Hafez, S.M.; Nasser, N.; Khalil, N.; Ateyya, T.; Amr, A.; Yasser, N.; Nasr, S.; Metwally, A.A. Gelatinized Core Liposomes: A New Trojan Horse for the Development of a Novel Timolol Maleate Glaucoma Medication. *Int. J. Pharm.* **2019**, *556*, 192–199, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.12.015.

163. Natarajan, J. V.; Ang, M.; Darwitan, A.; Chattopadhyay, S.; Wong, T.T.; Venkatraman, S.S. Nanomedicine for Glaucoma: Liposomes Provide Sustained Release of Latanoprost in the Eye. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 123–131, doi:10.2147/ijn.s25468.

164. Alm, A. Latanoprost in the Treatment of Glaucoma. *Clin. Ophthalmol.* **2014**, 1967–1985.

165. Lazzaro, C.; Van Steen, C.; Aptel, F.; Schweitzer, C.; Angelillo, L. Cost-Utility Analysis of STN1013001, a Latanoprost Cationic Emulsion, versus Other Latanoprost Formulations (Latanoprost) in Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension and Ocular Surface Disease in France. *J. Ophthalmol.* **2022**, *2022*, 323–337, doi:10.1155/2022/3837471.

166. McClements, D.J. Nanoemulsions versus Microemulsions: Terminology, Differences, and Similarities. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1719–1729, doi:10.1039/c2sm06903b.

167. Gautam, N.; Kesavan, K. Phase Transition Microemulsion of Brimonidine Tartrate for Glaucoma Therapy: Preparation, Characterization and Pharmacodynamic Study. *Curr. Eye Res.* **2021**, *46*, 1844–1852, doi:10.1080/02713683.2021.1942071.

168. Nayak, K.; Misra, M. PEGylated Microemulsion for Dexamethasone Delivery to Posterior Segment of Eye. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2020**, *31*, 1071–1090, doi:10.1080/09205063.2020.1740964.

169. Lancina, M.G.; Singh, S.; Kompella, U.B.; Husain, S.; Yang, H. Fast Dissolving Dendrimer Nanofiber Mats as Alternative to Eye Drops for More Efficient Antiglaucoma Drug Delivery. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 1861–1868, doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00319.

170. Bravo-Osuna, I.; Vicario-De-La-Torre, M.; Andrés-Guerrero, V.; Sánchez-Nieves, J.; Guzmán-Navarro, M.; De La Mata, F.J.; Gómez, R.; De Las Heras, B.; Argüeso, P.; Ponchel, G.; et al. Novel Water-Soluble Mucoadhesive Carbosilane Dendrimers for Ocular Administration. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 2966–2976, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00182.

171. Iezzi, R.; Guru, B.R.; Glybina, I. V.; Mishra, M.K.; Kennedy, A.; Kannan, R.M. Dendrimer-Based Targeted Intravitreal Therapy for Sustained Attenuation of Neuroinflammation in Retinal Degeneration. *Biomaterials* **2012**, *33*, 979–988, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.010.

172. Fea, A.M.; Novarese, C.; Caselgrandi, P.; Boscia, G. Glaucoma Treatment and Hydrogel: Current Insights and State of the Art. *Gels* **2022**, *8*, doi:10.3390/gels8080510.

173. Cheng, Y.; Tsai, T.; Jhan, Y.; Chiu, A.W.; Tsai, K.; Chien, C.; Chiou, S.; Liu, C.J. Thermosensitive Chitosan-Based Hydrogel as a Topical Ocular Drug Delivery System of Latanoprost for Glaucoma Treatment. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *144*, 390–399, doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.080.

174. Akulo, K.A.; Adali, T.; Talent, M.; Moyo, G. Intravitreal Injectable Hydrogels for Sustained Drug Delivery in Glaucoma Treatment and Therapy. *Polymers (Basel).* **2022**.

175. Javier, L.; Sigen, A.; Andr, V.; Tai, H.; Bravo-osuna, I.; Teresa, I.; Wang, W.; Herrero-vanrell, R. Thermo-Responsive PLGA-PEG-PLGA Hydrogels as Novel Injectable Platforms for Neuroprotective Combined Therapies in the Treatment of Retinal Degenerative Diseases. *Pharmaceutics* **2021**.

176. Press, P. An Evaluation of the Pilocarpine Ocusert. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, 296–299.

177. Castro-Balado, A.; Mondelo-García, C.; Zarra-Ferro, I.; Fernández-Ferreiro, A. New Ophthalmic Drug Delivery Systems. *Farm. Hosp.* **2020**, *44*, 149–157, doi:10.7399/fh.11388.

178. Miller, P.E.; Eaton, J.S. Medical Anti-Glaucoma Therapy : Beyond the Drop.

2021, *24*, 2–15, doi:10.1111/vop.12843.

179. Singh, R.B.; Ichhpujani, P.; Thakur, S.; Jindal, S. Promising Therapeutic Drug Delivery Systems for Glaucoma : A Comprehensive Review. *Ther. Adv. Ophthalmol.* **2020**, 1–17, doi:10.1177/2515841420905740.

180. Lambuk, L.; Azlyna, N.; Suhaimi, A.; Sadikan, M.Z.; Jusnida, A.; Jafri, A.; Ahmad, S.; Alimah, N.; Nasir, A.; Uskoković, V.; et al. Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma - Associated Neuroinflammation. *Eye Vis.* **2022**, 1–29, doi:10.1186/s40662-022-00298-y.

181. Pan, X.; Liu, X.; Zhuang, X.; Liu, Y.; Li, S. Journal of Drug Delivery Science and Technology Co-Delivery of Dexamethasone and Melatonin by Drugs Laden PLGA Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *60*, 102086, doi:10.1016/j.jddst.2020.102086.

182. Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* **2011**, *3*, 1377–1397, doi:10.3390/polym3031377.

183. Abal, P.P. Pharmaceutical Microscale and Nanoscale Approaches for Efficient Treatment of Ocular Diseases. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2016**, doi:10.1007/s13346-016-0336-5.

184. García-caballero, C.; Prieto-calvo, E.; Checa-casalengua, P.; García-martín, E. European Journal of Pharmaceutical Sciences Six Month Delivery of GDNF from PLGA / Vitamin E Biodegradable Microspheres after Intravitreal Injection in Rabbits. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *103*, 19–26, doi:10.1016/j.ejps.2017.02.037.

185. Arranz-Romera, A.; Esteban-Pérez, S.; Molina-Martínez, I.T.; Bravo-Osuna, I.; Herrero-Vanrell, R. Co-Delivery of Glial Cell–Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and Tauroursodeoxycholic Acid (TUDCA) from PLGA Microspheres: Potential Combination Therapy for Retinal Diseases. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**, *11*, 566–580, doi:10.1007/s13346-021-00930-9.

186. García-Caballero, C.; Lieppman, B.; Arranz-Romera, A.; Molina-Martínez, I.T.; Bravo-Osuna, I.; Young, M.; Baranov, P.; Herrero-Vanrell, R. Photoreceptor

Preservation Induced by Intravitreal Controlled Delivery of Gdnf and Gdnf/Melatonin in Rhodopsin Knockout Mice. *Mol. Vis.* **2018**, *24*, 733–745.

187. Arranz-romera, A.; Davis, B.M.; Bravo-osuna, I.; Esteban-pérez, S.; Molina-martínez, I.T. Simultaneous Co-Delivery of Neuroprotective Drugs from Multi-Loaded PLGA Microspheres for the Treatment of Glaucoma. *J. Control. Release* **2019**, *297*, 26–38, doi:10.1016/j.jconrel.2019.01.012.

188. Mietzner, R.; Kade, C.; Froemel, F.; Pauly, D.; Stamer, W.D.; Ohlmann, A.; Wegener, J.; Fuchshofer, R.; Breunig, M. Fasudil Loaded PLGA Microspheres as Potential Intravitreal Depot Formulation for Glaucoma Therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12*.

189. Zhang, C.; Yin, Y.; Zhao, J.; Li, Y.; Wang, Y.; Zhang, Z. An Update on Novel Ocular Nanosystems with Possible Benefits in the Treatment of Corneal Neovascularization An Update on Novel Ocular Nanosystems with Possible Benefits in the Treatment of Corneal Neovascularization. *Int. J. Nanomedicine* **2022**, doi:10.2147/IJN.S375570.

190. Lalu, L.; Tambe, V.; Pradhan, D.; Nayak, K.; Bagchi, S.; Maheshwari, R.; Kalia, K.; Tekade, R.K. Novel Nanosystems for the Treatment of Ocular Inflammation : Current Paradigms and Future Research Directions. *J. Control. Release* **2017**, *268*, 19–39, doi:10.1016/j.jconrel.2017.07.035.

191. Silva, B.; Berta, S.; Delgado, E.; Gonçalves, L. Colloidal Nanosystems with Mucoadhesive Properties Designed for Ocular Topical Delivery. *Int. J. Pharm.* **2021**, *606*, doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120873.

192. Kovačević, S.; Čanović, S.; Pavičić, A.D.; Kolega, M.Š.; Bašić, J.K. Ocular Surface Changes in Glaucoma Patients Related to Topical Medications. *Coll. Antropol* **2015**, *39*, 47–49.

193. Delort, P.; Duprat, P.; Bailly, Y. Corneal Toxicity Studies in Rabbits and Dogs with Hydroxyethyl Cellulose and Benzalkonium Chloride. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1989**, *8*.

194. Vitoux, M.; Kessal, K.; Melik, S.; Claret, M.; Guerin, C.; Baudouin, C.;

Brignole-baudouin, F.; Goazigo, A.R. Benzalkonium Chloride-Induced Direct and Indirect Toxicity on Corneal Epithelial and Trigeminal Neuronal Cells : Proin Fl Ammatory and Apoptotic Responses in Vitro. *Toxicol. Lett.* **2020**, *319*, 74–84, doi:10.1016/j.toxlet.2019.10.014.

195. Liang, H.; Baudouin, C.; Labbe, A.; Riancho, L. Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue (CALT) Reactions to Antiglaucoma Prostaglandins with or without BAK-Preservative in Rabbit Acute Toxicity Study. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–9, doi:10.1371/journal.pone.0033913.

196. Whitson, J.T.; Cavanagh, H.D.; Petroll, W.M. Assessment of Corneal Epithelial Integrity After Acute Exposure to Ocular Hypotensive Agents Preserved With and Without Benzalkonium Chloride. *Adv. Ther.* **2006**, *23*, 663–671.

197. Economou, M.A.; Laukeland, H.K.; Grabska-liberek, I.; Rouland, J. Better Tolerance of Preservative-Free Latanoprost Compared to Preserved Glaucoma Eye Drops : The Better Tolerance of Preservative-Free Latanoprost Compared to Preserved Glaucoma Eye Drops : The 12-Month Real-Life FREE Study. **2022**, doi:10.2147/OPTH.S176605.

198. Doughty, M.J.; Glavin, S. Efficacy of Different Dry Eye Treatments with Artificial Tears or Ocular Lubricants: A Systematic Review. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **2009**, *29*, 573–583, doi:10.1111/j.1475-1313.2009.00683.x.

199. Kaercher, T.; Thelen, U.; Brief, G.; Morgan-Warren, R.J.; Leaback, R. A Prospective, Multicenter, Noninterventional Study of Optive Plus® in the Treatment of Patients with Dry Eye: The Prolipid Study. *Clin. Ophthalmol.* **2014**, *8*, 1147–1155, doi:10.2147/OPTH.S58464.

200. Benelli, U. Systane® Lubricant Eye Drops in the Management of Ocular Dryness. *Clin. Ophthalmol.* **2011**, *5*, 783–790, doi:10.2147/OPTH.S13773.

201. Eibl, H.; Kaufmann-Kolle, P. Medical Application of Synthetic Phospholipids as Liposomes and Drugs. *J. Liposome Res.* **1995**, *5*, 131–148, doi:10.3109/08982109509039914.

202. Attwood, S.J.; Choi, Y.; Leonenko, Z. Preparation of DOPC and DPPC

Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 3514–3539, doi:10.3390/ijms14023514.

203. Chen, W.; Duša, F.; Witos, J.; Ruokonen, S.K.; Wiedmer, S.K. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12, doi:10.1038/s41598-018-33107-5.

204. Quinteros, D.; Vicario-De-La-Torre, M.; Andrés-Guerrero, V.; Palma, S.; Allemandi, D.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T. Hybrid Formulations of Liposomes and Bioadhesive Polymers Improve the Hypotensive Effect of the Melatonin Analogue 5-MCA-NAT in Rabbit Eyes. *PLoS One* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0110344.

205. Stoll, C.; Holovati, J.L.; Acker, J.P.; Wolkers, W.F. Synergistic Effects of Liposomes, Trehalose, and Hydroxyethyl Starch for Cryopreservation of Human Erythrocytes. *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 364–371, doi:10.1002/btpr.1519.

206. Gulsen, D.; Li, C.C.; Chauhan, A. Dispersion of DMPC Liposomes in Contact Lenses for Ophthalmic Drug Delivery. *Curr. Eye Res.* **2005**, *30*, 1071–1080, doi:10.1080/02713680500346633.

207. Schniertshauer, D.; Gebhard, D.; Beek, H. Van; Nöth, V.; Schon, J. The Activity of the DNA Repair Enzyme HOGG1 Can Be Directly Modulated by Ubiquinol. *DNA Repair (Amst).* **2020**, *87*, 102784, doi:10.1016/j.dnarep.2019.102784.

208. Naguib, Y.W.; Saha, S.; Skeie, J.M.; Acri, T.; Ebeid, K.; Abdel-rahman, S.; Kesh, S.; Schmidt, G.A.; Nishimura, D.Y.; Banas, J.A.; et al. Biomaterials Solubilized Ubiquinol for Preserving Corneal Function. *Biomaterials* **2021**, *275*, 120842, doi:10.1016/j.biomaterials.2021.120842.

209. Bucolo, C.; Fidilio, A.; Bianca, C.; Platania, M.; Geraci, F.; Lazzara, F.; Drago, F. Antioxidant and Osmoprotecting Activity of Taurine in Dry Eye Models. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2017**, *34*, 188–194, doi:10.1089/jop.2017.0008.

210. Hájek, J.; Váczi, P.; Barták, M.; Smejkal, L.; Lipavská, H. Cryoproective Role of Ribitol in Xanthoparmelia Somloensis. *Biol. Plant.* **2009**, *53*, 677–684, doi:10.1007/s10535-009-0122-z.

211. McCann, L.C.; Tomlinson, A.; Pearce, E.I.; Papa, V. Effectiveness of Artificial Tears in the Management of Evaporative Dry Eye. *Cornea* **2012**, *31*, 1–5, doi:10.1097/ICO.0b013e31821b71e6.

212. Ye, J.; Zhang, H.; Wu, H.; Wang, C.; Shi, X.; Xie, J.; He, J.; Yang, J. Cytoprotective Effect of Hyaluronic Acid and Hydroxypropyl Methylcellulose against DNA Damage Induced by Thimerosal in Chang Conjunctival Cells. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *250*, 1459–1466, doi:10.1007/s00417-012-2087-4.

213. Damari, S.P.; Shamrakov, D.; Varenik, M.; Koren, E.; Nativ-roth, E.; Barenholz, Y.; Regev, O. Practical Aspects in Size and Morphology Characterization of Drug-Loaded. *Int. J. Pharm.* **2018**, *547*, 648–655, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.037.

214. Article, O. Effect of Viscosity on Tear Drainage and Ocular Residence Time. *Optom. Vis. Sci.* **2008**, *85*, 715–725.

215. *Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4; OECD, 2021; ISBN 9789264185333.

216. Shahraki, K.; Hosseini, S.-R.; Amini Fard, A.; Shademan, H.; Shahraki, K.; Salari, A.M.; Amini Fard, M.-N. Effects of Topical 1% Sodium Hyaluronate and Hydroxypropyl Methylcellulose in Treatment of Corneal Epithelial Defects. *Med. hypothesis, Discov. Innov. Ophthalmol. J.* **2016**, *5*, 136–144.

217. Baudouin, C.; Aragona, P.; Messmer, E.M.; Tomlinson, A.; Calonge, M.; Boboridis, K.G.; Akova, Y.A.; Geerling, G.; Labetoulle, M.; Rolando, M. *Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN Group Meeting*; 2013;

218. Mackean, J.M. Compliance with Treatment of Patients with Chronic Open-Angle Glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* **1983**, *67*, 46–49.

219. Davies, N.M. Biopharmaceutical Considerations in Topical Ocular Drug Delivery. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, *27*, 558–562.

220. Grass, G.M.; Robinson, J.R. Mechanisms of Corneal Drug Penetration I: In Vivo and in Vitro Kinetics. *J. Pharm. Sci.* **1988**, *77*, 3–14, doi:10.1002/jps.2600770103.

221. Tundisi, L.L.; Mostaço, G.B.; Carricondo, P.C.; Petri, D.F.S. Hydroxypropyl Methylcellulose: Physicochemical Properties and Ocular Drug Delivery Formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *159*, 105736, doi:10.1016/j.ejps.2021.105736.

222. Soriano-Romaní, L.; Vicario-de-la-Torre, M.; Crespo-Moral, M.; López-García, A.; Herrero-Vanrell, R.; Molina-Martínez, I.T.; Diebold, Y. Novel Anti-Inflammatory Liposomal Formulation for the Pre-Ocular Tear Film: In Vitro and Ex Vivo Functionality Studies in Corneal Epithelial Cells. *Exp. Eye Res.* **2017**, *154*, 79–87, doi:10.1016/j.exer.2016.11.010.

223. Mishra, G.P.; Bagui, M.; Tamboli, V.; Mitra, A.K. Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery. *J. Drug Deliv.* **2011**, *2011*, 1–14, doi:10.1155/2011/863734.

224. Hathout, R.M.; Mansour, S.; Mortada, N.D.; Guinedi, A.S. Liposomes as an Ocular Delivery System for Acetazolamide: In Vitro and in Vivo Studies. *AAPS PharmSciTech* **2007**, *8*, doi:10.1208/pt0801001.

225. Yu, S.; Wang, Q.M.; Wang, X.; Liu, D.; Zhang, W.; Ye, T.; Yang, X.; Pan, W. Liposome Incorporated Ion Sensitive in Situ Gels for Opthalmic Delivery of Timolol Maleate. *Int. J. Pharm.* **2015**, *480*, 128–136, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.01.032.

226. Liu, Z.; Li, J.; Nie, S.; Liu, H.; Ding, P.; Pan, W. Study of an Alginate/HPMC-Based in Situ Gelling Ophthalmic Delivery System for Gatifloxacin. *Int. J. Pharm.* **2006**, *315*, 12–17, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.01.029.

227. Green, K.; Chapman, J. Benzalkonium Chloride Kinetics in Young and Adult Albino and Pigmented Rabbit Eyes. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **1986**, *5*, 133–142, doi:10.3109/15569528609036297.

228. Madhu, C.; Rix, P.J.; Shackleton, M.J.; Nguyen, T.G.; Tang-Liu, D.D.S. Effect

of Benzalkonium Chloride/EDTA on the Ocular Bioavailability of Ketorolac Tromethamine Following Ocular Instillation to Normal and de-Epithelialized Corneas of Rabbits. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 415–418, doi:10.1021/js9504189.

229. Robin, A.; Grover, D. Compliance and Adherence in Glaucoma Management. *Indian J. Ophthalmol.* **2011**, *59*, 9–12, doi:10.4103/0301-4738.73693.

230. Mckinnon, S.J.; Goldberg, L.D.; Peeples, P.; Walt, J.G.; Bramley, T.J.; Care, M. Current Management of Glaucoma and the Need for Complete Therapy. *Am. J. Manag. Care* **2010**, *14*, 20–27.

231. Tezel, G. Multifactorial Pathogenic Processes of Retinal Ganglion Cell Degeneration in Glaucoma towards Multi-Target Strategies for Broader Treatment Effects. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10061372.

232. Geroski, D.H.; Edelhauser, H.F. Drug Delivery for Posterior Segment Eye Disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 37–48, doi:10.1016/S0169-409X(01)00193-4.

233. Kompella, U.B.; Hartman, R.R.; Patil, M.A. Extraocular , Periocular , and Intraocular Routes for Sustained Drug Delivery for Glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* **2021**, *82*, 100901, doi:10.1016/j.preteyeres.2020.100901.

234. Thakur, S.S.; Barnett, N.L.; Donaldson, M.J. Intravitreal Drug Delivery in Retinal Disease : Are We out of Our Depth ? *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 1–16.

235. Sampat, K.M.; Garg, S.J. Complications of Intravitreal Injections. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2010**, *21*, 178–183, doi:10.1097/ICU.0b013e328338679a.

236. Aspects, C.; Sande, H. Melatonin : A Novel Neuroprotectant for the Treatment of Glaucoma. *J. Pineal Res.* **2010**, *48*, 353–364, doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00762.x.

237. Saniples, J.R.; Krause, G.; Lewy, A.J. Effect of Melatonin on Intraocular Pressure. *Curr. Eye Res.* **2000**, *7*, 649–653.

238. Brugnera, M.; Vicario-De-la-torre, M.; Andrés-Guerrero, V.; Bravo-Osuna, I.;

Molina-Martínez, I.T.; Herrero-Vanrell, R. Validation of a Rapid and Easy-to-Apply Method to Simultaneously Quantify Co-Loaded Dexamethasone and Melatonin PLGA Microspheres by HPLC-UV: Encapsulation Efficiency and In Vitro Release. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14020288.

239. Wang, Y.; Qin, B.; Xia, G.; Choi, S.H. FDA's Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Research Program and Regulatory Outcomes. *AAPS J.* **2021**, *23*, 1–7, doi:10.1208/s12248-021-00611-y.

240. Arrighi, A.; Marquette, S.; Peerboom, C.; Denis, L.; Goole, J.; Amighi, K. Development of PLGA Microparticles with High Immunoglobulin G-Loaded Levels and Sustained-Release Properties Obtained by Spray-Drying a Water-in-Oil Emulsion. *Int. J. Pharm.* **2019**, *566*, 291–298, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.070.

241. Traber, M.G.; Atkinson, J. Vitamin E , Antioxidant and Nothing More. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 4–15, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024.

242. Checa-Casalengua, P.; Jiang, C.; Bravo-Osuna, I.; Tucker, B.A.; Molina-Martínez, I.T.; Young, M.J.; Herrero-Vanrell, R. Retinal Ganglion Cells Survival in a Glaucoma Model by GDNF/Vit e PLGA Microspheres Prepared According to a Novel Microencapsulation Procedure. *J. Control. Release* **2011**, *156*, 92–100, doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.023.

243. Anderson, D.R.; Drance, S.M.; Schulzer, M. The Effectiveness of Intraocular Pressure Reduction in the Treatment of Normal-Tension Glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* **1998**, *126*, 498–505, doi:10.1016/S0002-9394(98)00272-4.

244. Schoenberger, S.D.; Kim, S.J. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Retinal Diiease. *Int. J. Infammation* **2013**, *2013*.

245. Herrero-Vanrell, R.; Bravo-Osuna, I.; Andrés-Guerrero, V.; Vicario-de-la-Torre, M.; Molina-Martínez, I.T. The Potential of Using Biodegradable Microspheres in Retinal Diseases and Other Intraocular Pathologies. *Prog. Retin. Eye Res.* **2014**, *42*, 27–43, doi:10.1016/j.preteyeres.2014.04.002.

246. Zhao, M.; Rodríguez-Villagra, E.; Kowalczuk, L.; Le Normand, M.; Berdugo,

M.; Levy-Boukris, R.; El Zaoui, I.; Kaufmann, B.; Gurny, R.; Bravo-Osuna, I.; et al. Tolerance of High and Low Amounts of PLGA Microspheres Loaded with Mineralocorticoid Receptor Antagonist in Retinal Target Site. *J. Control. Release* **2017**, *266*, 187–197, doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.029.