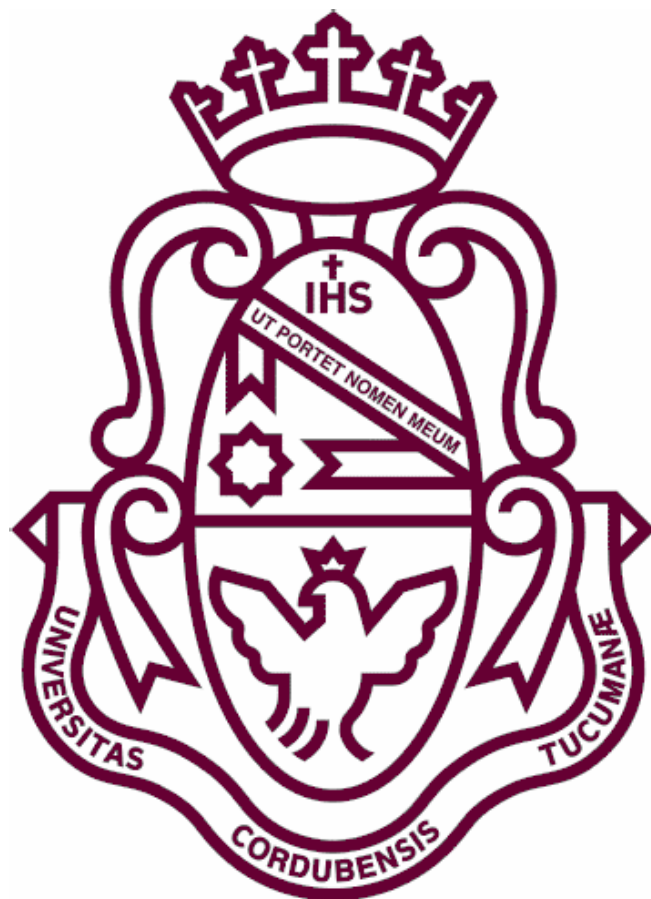


«NANOPARTÍCULAS PROTEÍNICAS
COMO SISTEMAS BIOADHESIVOS DE
ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA DE
FÁRMACOS»



Farm. Carolina Boiero

2017



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas

UNITEFA

CONICET
U N C



Universidad
Nacional
de Córdoba

NANOPARTÍCULAS PROTEÍNICAS COMO SISTEMAS BIOADHESIVOS DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA DE FÁRMACOS

Trabajo de tesis doctoral para acceder al grado de
doctor en Ciencias Químicas de
Carolina Boiero

Director

Prof. Dr. Daniel Allemandi

Comisión Asesora

Prof. Dra. Carla Giacomelli

Prof. Dr. Horacio Serra

Prof. Dr. Santiago Palma

Evaluador Externo

Prof. Dr. Diego Chiapetta

A mis padres,

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que me han acompañado durante este trabajo de tesis:

Al Doc Allemandi porque acepto ser el directo de este proyecto cuando ya estaba a mitad camino. Por su paciencia y su dedicación.

A Juan, el ideólogo de este trabajo. Gracias por confiar en mí desde un principio, por la motivación y la ayuda continua. Imposible este trabajo sin él. Un placer haber podido compartir este trabajo con él.

Al Dr. Santiago Palma, por haber aceptado ser miembro propuesto de la comisión evaluador, por el aguante diario en su laboratorio y por sus conocimientos brindados.

A la comisión evaluadora, Dra. Carla Giacomelli y Dr. Horacio Serra por sus grandes aportes durante el desarrollo de la tesis y siempre la mejor predisposición para ayudar a mi formación. Asimismo, quiero agradecerle al Dr. Diago Chiapetta por haber aceptado ser evaluar externo del presente trabajo.

Al departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional De Córdoba por brindarme el espacio físico donde se desarrolló la presente tesis y a las instituciones y programas que brindaron los medios económicos para llevar a cabo este trabajo: FONCYT, CONICET y SECyT-UNC.

Al Dr. Irache, que me recibió en su laboratorio y me ha ayudado mucho en mi formación. Y a Ines, por todo el trabajo compartido. También porque me acompañó en todo mi momento durante mi estadía.

A la Dra. Marisa Martinelli, por su tiempo y su ayuda desinteresada.

A todos los integrantes del dpto. de Farmacia. En especial a los chicos de la 201.

A la Dani Q, por su ayuda a durante el desarrollo de esta tesis.

A la Lau G, por ser tan buena compañera siempre. ¡Gracias peque por todo tu tiempo!

Al 209 y anexo (Lu, Meli y Franco) por el aguante diario, la buena onda, la ayuda en los ensayos y porque encontrar amigos en el trabajo es lo mejor.

A todo el equipo del 210 porque fue un placer tener tan buenos compañeros.

A mis padres por haberme dado las herramientas para poder crecer con total libertad. Y a mi hermano, porque todo fue más fácil con su gran ayuda y aguante.

A mis primos/primas y mis sobrinos, porque son mi sostén diario, siempre acompañándome y porque la vida es tan linda con ustedes cerca.

A mi familia política, en especial a la Minu, por siempre estar cerca mío en todo.

A mi compañero de ruta, mi querido Juampi, que confió en mí y me acompañó en todo momento para que esto sea posible

Y finalmente mi amada Catalina, la persona que ilumina mis días y me transformo en la persona más afortunada del mundo.

Resumen

El trabajo de investigación realizado en esta tesis doctoral está enmarcado en el área de tecnología farmacéutica. El mismo comprende la preparación y la posterior evaluación de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de las nanopartículas de albumina sérica humana (en adelante NP-ASH). Dichos sistemas se desarrollaron para la vehiculización de fármacos para el tratamiento de patologías oculares. Para tal fin, los fármacos seleccionados fueron: maleato de timolol (fármaco betabloqueante adrenérgico no selectivo, utilizado para el tratamiento del glaucoma), y bevacizumab (anticuerpo monoclonal específico para inhibir el factor de crecimiento endotelial vascular, indicado para el tratamiento de la neovascularización).

Mediante la técnica de coacervación se obtuvieron las NP-ASH en dispersión acuosa. Un paso fundamental para la obtención de estos sistemas fue el agregado de un agente entrecruzante (AE) para lograr la estabilidad coloidal de las NP-ASH formadas. En este contexto, se utilizaron cuatro nuevos AE y el glutaraldehído, el cual fue utilizado como AE de referencia para este tipo de proceso. Se realizaron estudios comparativos entre los AE con el objetivo de analizar nuevas alternativas, a los fines de eliminar o disminuir los efectos adversos característicos del glutaraldehído.

Los sistemas obtenidos fueron monodispersos con tamaño de partícula entre 200 – 300 nm y con un potencial zeta negativo. Las NP-ASH no causaron irritación ni daño en la superficie ocular tras la administración tópica oftálmica en animales de experimentación. Adicionalmente, las NP-ASH modularon la liberación de los fármacos en el tiempo y mostraron ser promotores de la permeación.

Una de las principales ventajas de las NP-ASH fue el prolongado tiempo de permanencia en la superficie ocular luego de la administración tópica. Esto favoreció el efecto farmacológico de maleato de timolol (disminución de la presión intraocular) en conejos normotensos respecto a la formulación comercial, aun en una dosis menor de fármaco instilado.

Por otro lado, en el caso de las NP-ASH con bevacizumab, se observó una disminución del área afectada por neovasos en un modelo de neovascularización corneal en ratas. Dicho efecto terapéutico fue superior en las córneas tratadas con NP-ASH respecto a las córneas tratadas con una solución de Bevacizumab comercial, tras una semana de tratamiento y en una dosis diaria menor de BVZ administrado en las NP-ASH.

Abreviaturas y Símbolos

ABREVIATURA O ACRÓNIMO	SIGNIFICADO
AE	Agente entrecruzante
ASH	Albumina sérica humana
AUC	Área bajo la curva
BVZ	Bevacizumab
CC	Capacidad de carga
°C	Grados centígrados
Cmax	Concentración máxima
CNV	Neovascularización corneal normalizado
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DRX	Difractometría de rayos x
EDU	Eudragit
F	Fármaco
FC	Formulación comercial
G	Gramos
GAAP	Glaucoma de ángulo abierto
Glut	Glutaraldehído
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPMCF	ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa
IA	Área invasiva

ABREVIATURA O ACRÓNIMO	SIGNIFICADO
IP	Índice de Polidispersidad
IR	Espectroscopia Infrarroja
Kg	Kilogramos
MEB	Microscopia electrónica de barrido
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercurio
TMP	Tamaño medio de partícula
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NP	Nanopartículas
NVC	Neovascularización corneal
p/v	Peso en volumen
Papp	Permeabilidad aparente
PBS	Solución amortiguadora fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PIO	Presión intraocular
PZ	Potencial zeta
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RE	Rendimiento de encapsulación
RP	Rendimiento del proceso
SLF	Sistema de liberación de fármacos
SLM	Sistema de liberación modificada
STM	Solución de maleato de timolol

ABREVIATURA O ACRÓNIMO SIGNIFICADO

Tc	Tecnecio
TI	Tiempo de incubación
TM	Maleato de timolol
Tmax	Tiempo de máxima cuantificación
µg	Microgramos
USP	Farmacopea de Estados Unidos
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

INDICE

Capítulo 1. Introducción y objetivos generales

INTRODUCCION GENERAL _____	21
OBJETIVOS GENERALES _____	34

Capítulo 2. Obtención de nanopartículas de albumina sérica humana(ASH)

INTRODUCCIÓN _____	39
MATERIALES _____	42
Albúmina sérica humana (ASH) _____	42
Glutaraldehído (GLUT) _____	44
Gantrez ES-425 (Gantrez) _____	44
Eudragit S100 (EUDS100) _____	45
Hidroxipropilmetilcelulosa-Ftalato(HPMCF) _____	46
Polietilenglicol 35000 (PEG) _____	46
Animales _____	47
METODOLOGIA _____	48
Obtención de nanopartículas de albumina sérica humana _____	48
Tamaño de partícula e índice de polidispersidad y potencial zeta _____	49
Microscopia electrónica de barrido _____	50
Osmolaridad y pH _____	51
Rendimiento del proceso _____	51
Rendimiento de encapsulación _____	51
Técnica Bradford para la cuantificación de ASH _____	52
Análisis por espectroscopia ultra violeta visible _____	53
Estabilidad del sistema coloidal _____	53
Caracterización fisicoquímica del sólido _____	53
Espectroscopia infrarroja (IR) _____	54

Difracción de rayos X (DXR)	54
Ensayo <i>in vivo</i> de irritación ocular	54
Estudios de biodistribución <i>in vivo</i>	57
RESULTADOS	58
Estudios de pre formulación y formulación de NP-ASH	58
Estabilidad del sistema coloidal	62
Rendimiento del proceso y rendimiento de encapsulación	63
Estudios fisicoquímicos del sólido	64
Ensayos <i>in vivo</i> de irritación ocular	68
Ensayo de biodistribución <i>in vivo</i>	69
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES PARCIALES	75

Capítulo 3. Nanopartículas de ASH para la vehiculización maleato de timolol

INTRODUCCIÓN	78
MATERIALES	82
Fármacos: MALEATO DE TIMOLOL	82
Animales	82
METODOLOGIA	83
Obtención de nanopartículas de albumina sérica humana	83
Tamaño de partícula e índice de polidispersidad y potencial zeta	83
Rendimiento del proceso y rendimiento de encapsulación	83
Capacidad de carga	83
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	84
Ensayos de liberación <i>in vitro</i> de maleato de timolol	87
Ensayo <i>ex vivo</i> de permeación trascorneal	89
Estudios <i>in vivo</i> de farmacocinética	91

Ensayos de farmacodinamia: MEDICIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR _____	92
RESULTADOS _____	93
Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta _____	93
Rendimiento del proceso, rendimiento de encapsulación y capacidad de carga ____	96
Ensayos de liberación <i>in vitro</i> de maleato de timolol _____	96
Ensayos <i>ex vivo</i> de permeación tras corneal _____	101
Ensayo de farmacocinética _____	102
Ensayo <i>in vivo</i> de farmacodinamia _____	104
DISCUSIÓN _____	107
CONCLUSIONES PARCIALES _____	110

Capítulo 4. Nanopartículas de ASH para la vehiculización de bevacizumab.

INTRODUCCION _____	114
MATERIALES _____	119
Fármaco: BEVACIZUMAB _____	119
Animales de experimentación _____	119
METODOLOGÍA _____	120
Ensayos de pre formulación para la obtención de nanopartículas de ASH cargadas con BVZ _____	120
Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta _____	120
Rendimiento del proceso de obtención, rendimiento de encapsulación y capacidad de carga _____	120
Liberación <i>in vitro</i> del BVZ _____	121
Integridad del BVZ en las nanopartículas _____	122
Caracterización fisicoquímica del sólido _____	123
Ensayos <i>in vivo</i> en un modelo de neovascularización corneal _____	123
RESULTADOS _____	1209
Ensayos de pre formulación para obtención nanopartículas de ASH cargas con BVZ _____	125

Rendimiento del proceso de obtención, de encapsulación y capacidad de carga	134
Integridad del anticuerpo	133
Estudio fisicoquímico del polvo	130
Ensayos de liberación <i>in vitro</i> de BVZ	131
Ensayos <i>in vivo</i> de eficiencia terapéutica en un modelo de NVC	132
DISCUSIÓN	136
CONCLUSIONES PARCIALES	136
CONCLUSIONES FINALES	139
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	139
ANEXO1	1399

Capítulo 1

INTRODUCCION Y OBJETIVOS GENERALES

1. INTRODUCCION

Durante muchos años la investigación farmacéutica se focalizó en dos grandes aspectos: por un lado, en la búsqueda de nuevas moléculas activas para enfermedades cuyo tratamiento es desconocido o poco eficiente y, por otro lado, en el estudio de modificaciones en la estructura química de fármacos (en adelante F) ya conocidos; esto último con la finalidad de lograr acciones terapéuticas más selectivas, duraderas o con menos efectos adversos.

Sin embargo, con el correr de los años se comenzó a observar que muchos de los problemas relacionados con la baja efectividad terapéutica de algunos F son causados principalmente por el sistema portador (en adelante SPF) o forma farmacéutica (FF) en las cuales el F es vehiculado. Por tal motivo, la investigación en el área de la tecnología, de forma simultánea con la investigación de nuevas moléculas de activas, puso su atención en la búsqueda de soluciones a problemas inherentes a la liberación, dosis administrada y sitio de acción del F.

A través del desarrollo galénico se llevan a cabo trabajos dirigidos a la búsqueda y desarrollo de novedosas formas de administración que, como resultado final, buscan un beneficio para el paciente. A partir de esto surge el concepto de **formas farmacéuticas o sistemas de liberación modificada (en adelante SLM)**. La farmacopea de Estados Unidos (USP₃₃-NF₂₆ según sus siglas en inglés) utiliza el término “liberación modificada” (en inglés, *modified release*) para referirse a formas farmacéuticas en las cuales las características de disolución son moduladas en el tiempo y/o en el espacio, a los fines de cumplir los objetivos terapéuticos que no pueden alcanzarse con formas farmacéuticas convencionales.

De este modo las principales ventajas de los SLM en cuanto a la actividad terapéutica son:

- ✚ Prolongar el efecto terapéutico mediante la liberación sostenida del F.
- ✚ Liberar el F en un sitio específico para protegerlo, mejorar su absorción o lograr un efecto en un tejido, órgano o sitio de acción.

- ✚ Mejorar la pauta posológica buscando una vía de administración más cómoda y la reducción de la dosis diaria (en el intento de conseguir una dosis única).
- ✚ Disminuir o eliminar el riesgo de efectos no deseados (secundarios y tóxicos) de los medicamentos.

Al momento de desarrollar nuevos sistemas portadores de fármacos se deben tener en cuenta numerosos factores relacionados a las características fisicoquímicas y biológicas del F y de los excipientes utilizados, así como también la vía de administración seleccionada. El objetivo fundamental en el diseño de un medicamento es que el mismo vehicule el o los fármacos, en una forma adecuada hasta el sitio de absorción o de acción y lo libere específicamente (control espacio-temporal) para lograr la óptima eficiencia, con máxima seguridad y confiabilidad. Este criterio moderno de calidad farmacéutica da origen a lo que se conoce como “**MEDICAMENTO OPTIMIZADO**” (fig. 1.1) (Banker, 2002).

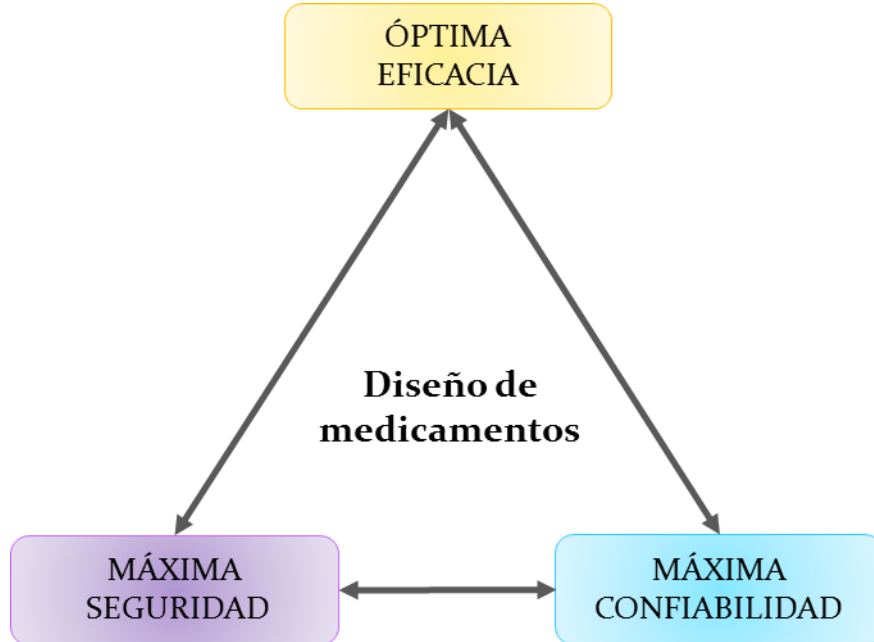


Figura 1.1. Concepto de medicamento optimizado.

En resumen, los atributos deseables para el desarrollo de SLM son:

- ✚ Posibilidad de modificar la velocidad de liberación de fármaco para poder adecuar el sistema a una farmacocinética específica (flexibilidad).
- ✚ Posibilidad de mantener el control preciso de la velocidad de liberación que (precisión).
- ✚ Disminuir la sensibilidad del sistema ante las variables fisiológicas (alta robustez).
- ✚ Asegurar una adecuada estabilidad físico química de la FF.
- ✚ Aumento o mantenimiento de la estabilidad del F.
- ✚ Obtención de un SLM aplicable a una amplia variedad de fármacos.
- ✚ Costo de desarrollo razonable.
- ✚ Proceso de desarrollo fácil de realizar a gran escala.

En la actualidad la nanotecnología se ha convertido en una de las tecnologías centrales del siglo XXI y sus numerosas aplicaciones, incluidas en el área galénica, llevaron al desarrollo de **SISTEMAS NANOMÉTRICOS O NANOSISTEMAS** para la vehiculización de F.

1.1. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

La Nanotecnología fue definida por la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos (NNI según sus siglas en inglés) como “el desarrollo de la investigación y tecnología a nivel atómico, molecular o macromolecular en la escala nanométrica (nm) para la creación y uso de estructuras, aparatos y sistemas con nuevas propiedades y funciones debidas a su tamaño, así como la capacidad de controlar o manipular material a escala atómica” (Initiative y Society, 2008). Cuando esta tecnología se aplicada al área biomédica es denominada NANOMEDICINA.

La **nanomedicina** es una de las disciplinas más prometedoras para el desarrollo de una terapia efectiva basada en el direccionamiento de F (Webster, 2006; Irache y cols., 2011;). Es un campo multidisciplinario donde convergen áreas como la ingeniería, la química, la biología, la medicina y la ciencia de materiales.

Esta disciplina ha presentado un gran desarrollo durante las últimas décadas dado que el número de reportes científicos, patentes y recursos económicos relacionados con ella han experimentado un crecimiento exponencial.

Las prioridades de la nanotecnología para la administración de fármacos son:

- ✚ Proteger al F de la degradación.
- ✚ Mejorar la absorción del F facilitando la difusión a través del epitelio.
- ✚ Modificar el perfil farmacocinético y de distribución del F en el organismo.
- ✚ Mejorar la penetración y la distribución intracelular (Couvreur 2006; Couvreur 2013).
- ✚ Permitir la vectorización o localización selectiva del F que transportan a nivel de un órgano, de un tejido o de un tipo específico de células, con la finalidad de aumentar su eficiencia y disminuir los efectos secundarios derivados de su distribución sistémica (Villafuerte-Robles, 2009).

Dentro de los sistemas nanométricos desarrollados y estudiados se pueden mencionar liposomas, nanopartículas poliméricas o lipídicas, micelas poliméricas, sistemas micelares, dendrímeros, conjugados poliméricos y conjugados con anticuerpos, nanotubos de carbono y nanocristales (Elzoghby y cols., 2012).

En la tabla 1.1.1 se especifican algunos de los sistemas nanométricos aprobados para su comercialización por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA según sus siglas en inglés) (Irache y cols., 2011; Reimondez-Troitiño y cols., 2015).

Tabla 1.1.1. Sistemas nanométricos comercializados para la administración de fármacos (adaptada de Irache y cols., 2011).

NOMBRE COMERCIAL	FÁRMACO	SISTEMA PORTADOR	PATOLOGÍA
Emend®	Aprepitant	Nanocristales	Nauseas asociadas con la quimioterapia
TriCor®	Fenofibrate	Nanocristales	Hipercolesterolemia
Rapamune®	Rapamicina	Nanocristales	Inmunosupresor
Megace® ES	Megestrol	Nanocristales	Cáncer de cerebro
Estrasorb®	17-β-estradiol	Micelas poliméricas	Terapia hormonal
Oncaspar®	L-asparginasa	Conjugado de PEG	Leucemia
PEG-Asys®	Interferón α-2a	Conjugado de PEG	Hepatitis B/C. Melanoma
PEG-Intron®	Interferón α-2b	Conjugado de PEG	Hepatitis C Melanoma
Xyotax®	Paclitaxel	Conjugado de poliglutamato	Cáncer de ovario
Neolasta®	Pegfilgrastim	Conjugado de PEG	Cáncer
Ambisome®	Amfotericina B	Liposomas	Infecciones fúngicas
Daunoxame®	Daunorrubicina	Liposomas	Leucemia Neuroblastomas
Doxil®, Caelix®, Miocet®	Doxorubicina	Liposomas pegilados	Cáncer de ovario
Depocyt®	Citarabina	Liposomas	Leucemia Linfomas
Inflexal®	Vacuna virosomal	Virosomas	Vacuna contra la influenza
Pevaryllipogle®	Econazol	Liposomas	Infecciones tópicas
Alovectin-7®	Microglobulina	Liposomas	Melanoma
Visudyne®	Verteporfin	Liposomas	Degeneración macular
Abraxane®	Paclitaxel	Nanopartículas de Albumina	Cáncer de mama

Como se aprecia en la tabla la mayoría de los nanosistemas comercializados son utilizados en la terapia anticancerígena pero, debido al impacto en el desarrollo y las numerosas ventajas que presentaron estos SPM, el estudio se extendió al tratamiento de nuevas patologías. En este último punto la **farmacoterapia ocular** se presenta como una vía de administración potencial

para la aplicación de sistemas nanotecnológicos debido a la baja biodisponibilidad asociada a la misma (Couvreur, 2013).

A continuación, se detallan las características de la vía oftálmica que condicionan la biodisponibilidad de la farmacoterapia ocular.

1.2. VÍA DE ADMINISTRACIÓN OFTÁLMICA

El diseño de FF oftálmicas es uno de los desafíos más interesantes al que se enfrenta la ciencia farmacéutica, debido al entorno crítico y a la farmacocinética específica que presenta este órgano. La anatomía, fisiología y bioquímica del ojo hacen que éste sea un órgano poco accesible a las sustancias extrañas (Nagarwal y cols., 2009).

Para que la farmacoterapia ocular sea eficaz, el fármaco debe alcanzar el sitio diana o sitio de acción en una concentración terapéutica tal que debe ser capaz de mantenerse el tiempo necesario en dicho sitio. Ambos factores (concentración y tiempo) dependerán tanto de la absorción como de la eliminación de dicho fármaco luego de ser administrado. En la figura 1.2.1 se representa un esquema de un corte histológico del ojo.

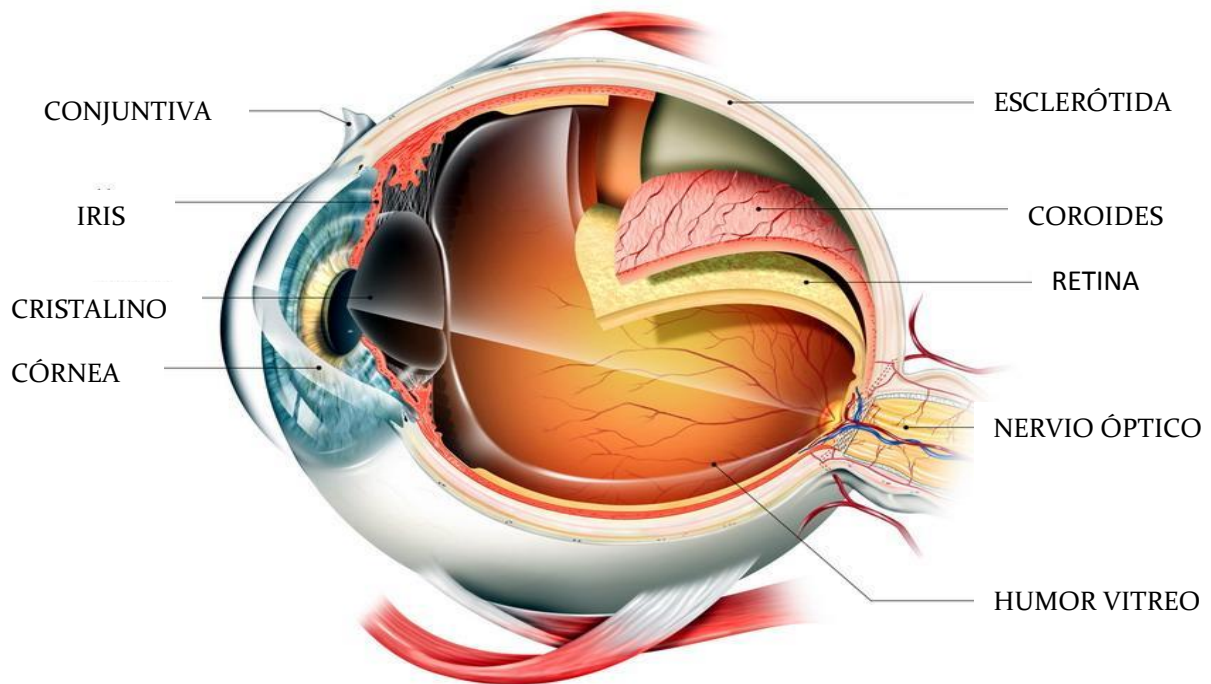


Figura 1.2.1. Corte esquemático del ojo humano (extraído de Innovar Ocular, n.d)

Para el tratamiento de patologías oculares, la vía de administración puede ser local o sistémica. Dentro de la vía local, puede ser por aplicación tópica (sobre la superficie ocular) o por inyección intraocular (intracameral e intravítrea) o periocular. Según la zona a ser tratada es la elección de la forma de administración, siendo la administración tópica la utilizada para el tratamiento de patologías del área pre ocular, la córnea y el segmento anterior del ojo, mientras que para patologías del segmento posterior se utiliza la vía sistémica o la administración intraocular o periocular (Magallón, 2014).

La vía de tópica para la administración F sobre la superficie ocular presenta numerosas ventajas ya que:

- ✚ Es una vía de fácil aplicación y acceso, simple, no dolorosa; hecho que favorece la adherencia del paciente al tratamiento.
- ✚ El efecto farmacológico es localizado y es baja la concentración de fármaco que pueden ingresar a circulación sistémica, lo cual disminuye la aparición de efectos adversos.
- ✚ Se evita el efecto de primer paso hepático.

Actualmente, el 90 % de las FF comercializadas para la administración tópica ocular se utilizan para el *tratamiento de afecciones exteriores* del órgano (como conjuntivitis, blefaritis, queratitis seca, etc.) y para el *tratamiento intraocular* (glaucoma, uveítis, endoftalmitis, entre otras) donde es necesaria la permeación de los principios activos a través de la córnea u otra membrana (Bourlais y cols., 1998).

En este trabajo de tesis doctoral se estudiaron nuevas estrategias tecnológicas para mejorar la terapia tópica ocular de fármacos. Por lo tanto, a continuación, se explican los diferentes mecanismos que afecta la biodisponibilidad del fármaco tras la administración tópica.

Aspectos fisiológicos y farmacoterapia oftalmológica

Tras la administración en la superficie ocular, los fármacos necesitan superar diferentes barreras anatómicas y fisiológicas para lograr alcanzar las estructuras oculares involucradas. En primer lugar, las moléculas de fármaco se deben diluir en la película lagrimal pre corneal, la cual tiene un espesor total aproximado de 10 μm . Dicha película lagrimal se compone de tres capas: I) una capa lipídica externa; II) una capa acuosa intermedia (representa el 90 % del espesor de la película) que contiene sales, mucinas secretadas, proteínas y enzimas metabólicas; y III) una capa interna formada principalmente por lisozimas y mucinas de la superficie celular (Bourlais y cols., 1998; Andres-Guerrero, 2008). La capa externa tiene una velocidad de renovación rápida (1-3 μL / min) que, junto con el reflejo del parpadeo, limita severamente el tiempo de residencia de los fármacos en el espacio pre corneal (entre 1-2 minutos) y, por lo tanto, la biodisponibilidad de los fármacos instilados (Patel y cols., 2015). Adicionalmente, el fondo del saco conjuntival del ojo humano puede acomodar un volumen máximo de 30 μL (en ausencia de parpadeo) mientras que en las FF oculares convencionales el volumen instilado en la gota es de aproximadamente 50 μL . Por lo tanto, el resto del volumen es eliminado por el conducto nasolagirmal (la principal vía de eliminación de los fármacos oculares a circulación sistémica) o se pierde en el exterior del globo ocular. Es importante tener en cuenta la presencia en el film lagrimal de proteínas que pueden unirse al F modificando su transporte o enzimas que pueden metabolizarlo. En la figura 1.2.2 se esquematiza lo que sucede tras la administración tópica ocular en el área pre corneal.

De la fracción del F disponible en la superficie ocular, la permeación al interior del órgano se produce principalmente a través de la córnea y sólo pequeñas porciones difunden a través de la zona límbica y la esclerótica.

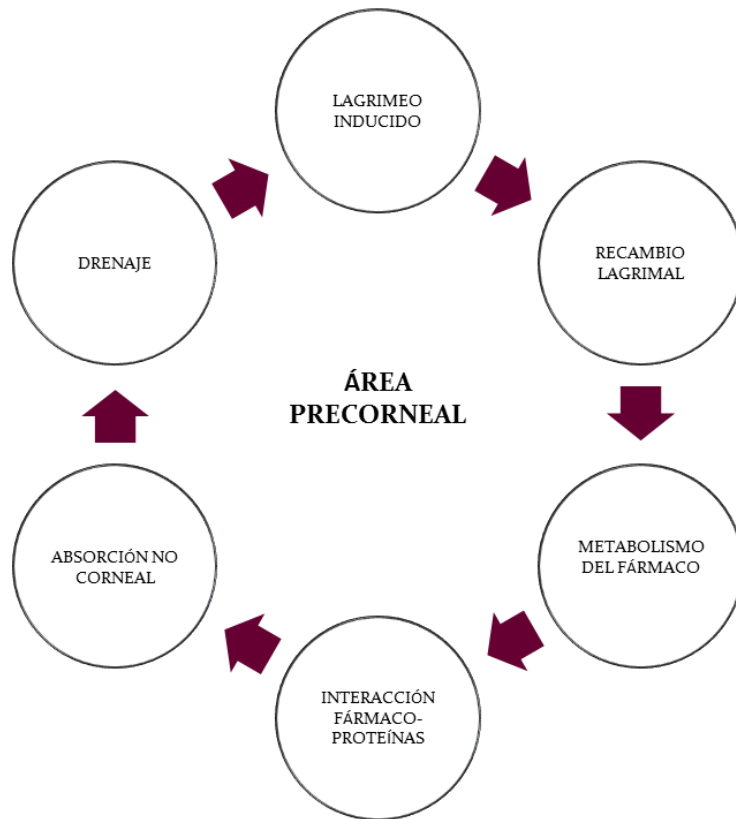


Figura 1.2.2. Factores que contribuyen a la baja biodisponibilidad ocular.

Permeacion Corneal

Se estima que menos del 5 % de la dosis inicial llega al tejido intraocular, lo cual se debe, por un lado, a las barreras que presenta la zona pre corneal y, por el otro, a que la córnea presenta una superficie pequeña de contacto y es relativamente impermeable a sustancias externas (Del Amo y Urutti, 2008; Lee, 1979).

La córnea es considerada la ruta principal de penetración de fármacos por vía tópica oftálmica (Doane y cols. 1978). Es una membrana de unos 0,5 mm de espesor que, junto a la esclerótica, se encarga de proteger los tejidos internos del globo ocular. Se trata de un tejido avascular que se compone de cinco capas que son, de más externa a más interna: el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio. De las cinco capas sólo el sistema de multicapas formado por células epiteliales, estroma (tejido conectivo) y el endotelio son relevantes para la penetración de los fármacos a través de la misma. El epitelio y el endotelio (ricos en lípidos y células) son generalmente

permeables a sustancias lipofílicas, mientras que el estroma (caracterizado por su carencia en células y su alto contenido de agua) es principalmente permeable a las sustancias hidrofílicas.

El paso del fármaco a través de las células endoteliales puede ser por difusión (ruta transcelular) o por ruta paracelular (en los espacios entre las células). Por ejemplo, las sustancias activas hidrofóbicas de pequeño tamaño pasan a través de las células epiteliales por difusión mientras que, en el caso de las sustancias hidrofílicas, el paso es entre los espacios de las células (Prausnitz y Noonan, 1998).

Permeación conjuntival

Durante mucho tiempo, la conjuntiva se consideró únicamente como una vía de eliminación del fármaco administrado. Pero actualmente se sabe que hay ciertas sustancias capaces de atravesar esta barrera, llegando incluso a alcanzar, en ciertas ocasiones, el segmento posterior del ojo (Urtti, 2006).

Al igual que en la córnea, el paso a través de la conjuntiva se puede llevar a cabo por vía transcelular o paracelular (Hosoya y cols., 2005). El tamaño de los espacios intercelulares de la conjuntiva y la densidad de poro son mayores que los de la córnea, siendo más permeable al paso de moléculas hidrofílicas que la córnea (Mari y cols., 2015).

En la figura 1.2.3 se esquematizan los eventos involucrados en el proceso de permeación.

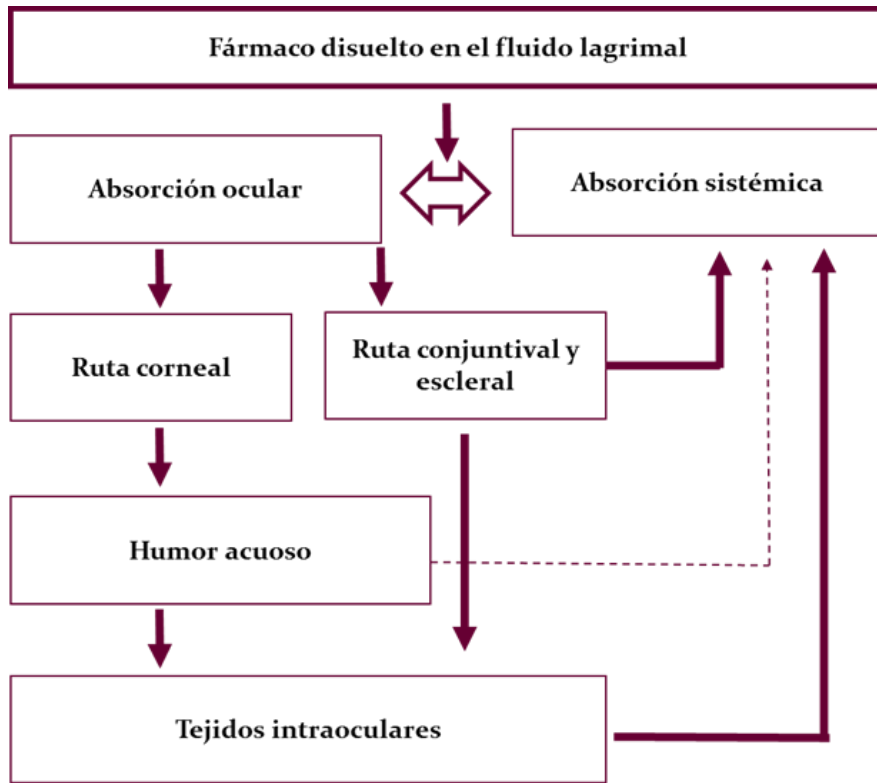


Figura 1.2.3. Esquema representativo de la absorción tras corneal.

1.3. Diseño de nuevos sistemas portadores de fármacos para la administración ocular

Durante décadas la administración ocular de fármacos ha sido un desafío importante para la industria farmacéutica, ya que las formulaciones convencionales presentan numerosos inconvenientes lo cual motiva la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias superadoras con la finalidad de lograr sistemas portadores novedosos, seguros y compatibles con el paciente. En los últimos años el desarrollo de nuevos fármacos o nuevas FF no ha sido suficiente para lograr un progreso importante en la efectividad de la farmacoterapia ocular.

Los objetivos farmacotécnicos que se plantean actualmente son: I) El mejoramiento del efecto terapéutico *in vivo* de las formulaciones convencionales; y II) La aplicación de nuevas tecnologías, como la nanotecnológicas, en el desarrollo de SLM.

Desde principios de la década del 80 comenzaron a realizarse estudios direccionados a la obtención de sistemas nanoparticulados para la aplicación

oftálmica. De este modo, Wood y cols. (1985) estudiaron la capacidad de los sistemas nanométricos de adherirse a la superficie ocular e interactuar con el epitelio corneal. Además, estos sistemas pueden mejorar la vehiculización de fármacos poco solubles en agua, reducir significativamente la toxicidad del F en comparación con el F libre y favorecer el direccionamiento del F al órgano diana (Diebold y Calonge, 2010; Irache y cols., 2011).

Por otro lado, son sistemas versátiles ya que pueden obtenerse de diferentes tamaños, diferente carga superficial y se pueden realizar modificaciones en su superficie, lo cual permitiría cambiar las características fisicoquímicas y la capacidad para transportar fármacos (Reimondez-Troitiño y cols., 2015).

En la última década el estudio de nanosistemas para la administración de fármacos oculares ha crecido sustancialmente, dando lugar a una amplia variedad de nanoestructuras, las cuales se esquematizan en la figura 1.3.1.

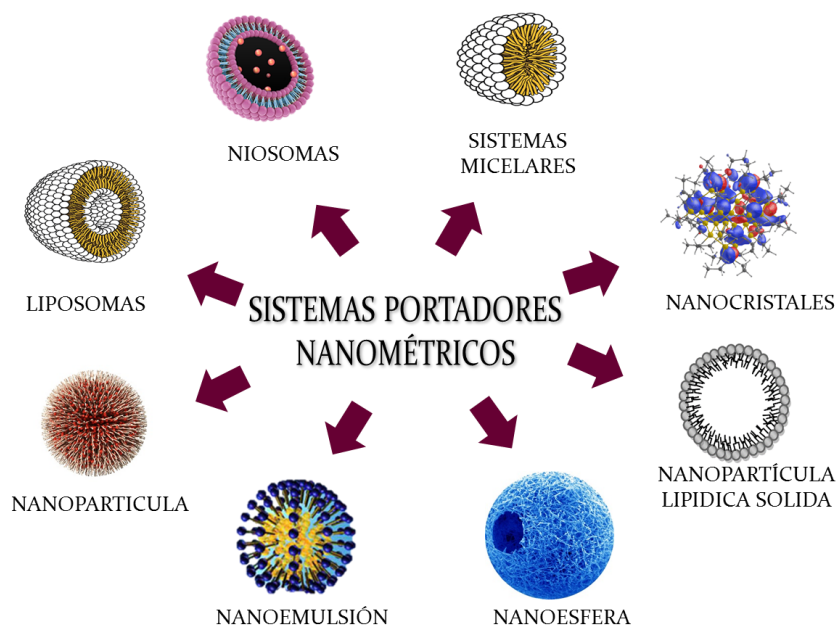


Figura 1.3.1. Sistemas portadores nanométricos estudiados para la administración oftálmica de fármaco (Extraído de Sah y Suresh, 2017).

El desarrollo de nanosistemas para la administración tópica ocular fue ampliamente estudiado para el tratamiento de la inflamación, infecciones, síndrome del ojo seco y el glaucoma, pero sólo unos pocos sistemas han sido aplicados clínicamente (Reimondez-Troitiño y cols., 2015; Sah y Suresh, 2017).

En el presente trabajo de investigación se desarrollaron sistemas nanométricos para la administración tópica ocular. Dicho trabajo constó de dos áreas de estudio paralelas y complementarias. El área I implicó el diseño, desarrollo y evaluación *in vitro* de los nanosistemas y el área II contempló la evaluación biomédica y biofarmacéutica de los sistemas desarrollados. El siguiente esquema resume lo antes expuesto:

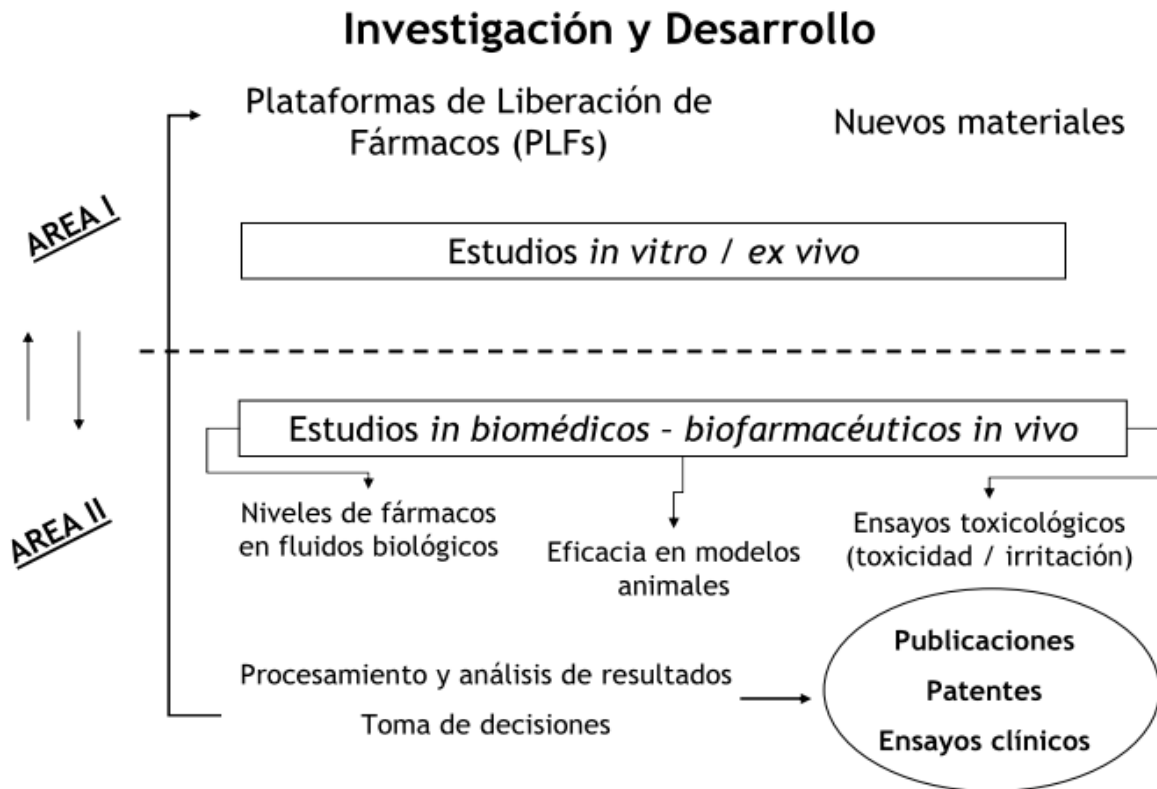


Figura 1.3.4. Esquema de trabajo para el desarrollo de nuevos sistemas portadores nanométricos.

2. OBJETIVOS GENERALES

Diseñar y formular nuevos SPF nanoparticulados sobre la base de proteínas (albumina sérica humana) utilizando nuevos entrecruzante de superficie con potencial aplicación en *terapéutica oftalmológica* abordando la problemática de un modo integral y ponderando la *eficacia, seguridad y confiabilidad* de los mismos.

Hipótesis del Trabajo

Las ventajas en la elección de la albumina sérica humana (ASH) para el desarrollo de SPF radica en que es un polímero biodegradable, no tóxico y que posee numerosos grupos funcionales (-NH₂, -COOH y -SH) (Wang y Uludag, 2008). Estos grupos funcionales ofrecen la posibilidad de interacciones covalentes y no covalentes que pueden ser utilizadas con numerosos fines tales como interacción con fármacos, aumento de su vida media biológica y aumento de su estabilidad coloidal. Además, son sistemas de fácil preparación (Weber y cols., 2000; Kouchakzadeh y cols., 2015).

Un punto importante en el desarrollo de estos sistemas es asegurar la estabilidad coloidal de las nanopartículas (en adelante NP) formadas, la cual se logra por el agregado de un agente químico entrecruzante, tal como el glutaraldehído. En la actualidad es un desafío el estudio de alternativas al muy estudiado glutaraldehído ya que es un compuesto tóxico para las mucosas, lo cual supone un riesgo en sistemas de administración oftálmicos (Gaihre y cols., 2009). Por dicha razón el estudio de nuevos agentes entrecruzantes (en adelante AE) que reemplacen al glutaraldehído es un importante desafío.

La administración oftálmica de sistemas nanométricos presenta la gran ventaja que las NP pueden desarrollar interacciones bioadhesivas con componentes de la mucosa. Dichas interacciones van a depender de parámetros físicoquímicos tales como tamaño de partícula, carga superficial o la presencia de ciertos recubrimientos o ligandos. Estos fenómenos conducen a: (I) incremento del tiempo de residencia de la forma farmacéutica en contacto íntimo con la

superficie de la mucosa, o (II) localización específica del vehículo en una determinada zona (Nahar y cols., 2006)

En este trabajo de tesis, el desarrollo de los nuevos nanosistemas fue destinado al mejoramiento de la farmacoterapia del glaucoma y la neovascularización. Dichas patologías afectan a un alto porcentaje de la población y a continuación se realiza una breve descripción de ellas:

✚ **Glaucoma** es una patología específica del ojo que puede estar asociada o ser consecuencia de otras patologías oculares. Es la segunda causa principal de pérdida de visión en el mundo (Sena y Lindsley, 2013). Cabe señalar que debido a la progresión silenciosa de la enfermedad (por lo menos en sus primeras etapas) hasta un 50 % de las personas afectadas en los países desarrollados no son conscientes de tener glaucoma y se estima que este hecho puede aumentar a un 90 % en países subdesarrollados (Sommer A. y cols., 1991).

No hay cura para el glaucoma aún, y la pérdida de visión es irreversible. Sin embargo, la medicación o la cirugía (tradicional o láser) apuntan siempre a disminuir la presión intraocular (PIO) con la finalidad de detener o reducir la evolución natural de la enfermedad.

✚ **Neovascularización corneal (NVC)** es una de las patologías que ha despertado gran interés en la última década para los especialistas ya que afecta al 4 % de la población, llegando a causar aproximadamente 1,4 millones casos de ceguera en el mundo por año (Gonzalez y cols., 2013; Bachmann y cols., 2008).

Durante la última década se han utilizado diversas estrategias para el tratamiento de esta condición patológica (corticoides, AINES, fototerapia y fotocoagulación). Sin embargo, la eficacia de estas terapias está lejos de ser óptima (Ob y cols., 2015).

En este marco el presente trabajo de tesis doctoral se ha organizado de la siguiente manera:

- ✚ **Capítulo 2:** Obtención de NP-ASH.
- ✚ **Capítulo 3:** Nanopartículas de ASH para la vehiculización de maleato de timolol.
- ✚ **Capítulo 4:** Nanopartículas de ASH para la vehiculización de bevacizumab.
- ✚ **Conclusiones generales**
- ✚ **Referencias bibliográficas**
- ✚ **Anexos: Difractogramas.**

Cada capítulo fue organizado con su correspondiente introducción específica, material y metodología utilizados, resultados obtenidos, discusión y conclusión parcial.

Capítulo 2

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NP-ASH

1. INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas poliméricas (NP) se definen como partículas de tamaño inferior a $1\ \mu\text{m}$ (generalmente entre 10 y 500 nm) elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza, tanto sintéticos como naturales (Gómez-gaete, 2014; Fukumori y Ichikawa, 2006).

De acuerdo con su estructura, las nanopartículas se subdividen en nanoesferas y nanocápsulas (figura 1.1). Por un lado, las nanoesferas son de tipo matricial y el fármaco puede ser adsorbido en la superficie de la esfera o encapsulado dentro de la partícula. Por otro lado, las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco es vehiculado en la cavidad interior; el sistema consiste en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica (Irache y cols., 2011; Kumari y cols., 2010). Alternativamente, algunos fármacos u otros agentes de interés pueden estar adsorbidos, acomplexados o conjugados a la superficie de los nanosistemas.

NANOESFERAS



NANOCAPCULAS

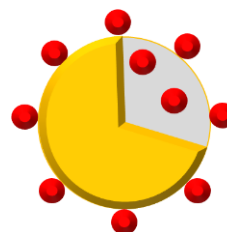


Figura 1.1. Imagen que representa en forma esquemática las nanoesferas y nanocápsulas (modificado de Kumari y cols., 2010)

Las proteínas ofrecen numerosas ventajas como material de partida para la formación de NP en relación a los polímeros sintéticos, ya que son biocompatibles, biodegradables, se descomponen en subproductos no tóxicos y presentan numerosos grupos funcionales en su estructura ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ y $-\text{SH}$) que permiten posteriores modificaciones covalentes y no covalentes en la superficie de los nanosistemas. Pero, al ser polímeros naturales, presentan la desventaja que es difícil conocer con exactitud la composición y pureza del polímero (Elzoghby y cols., 2012).

Con el correr de los años, son numerosos los polímeros estudiados para la obtención de NP, como por ejemplo gelatina, colágeno, caseína, albúmina (ovoalbúmina, albumina sérica bovina y humana), zeína, gliadina y proteínas de suero (Pathak y Thassu, 2009). A fin de tener una idea más amplia del impacto en el desarrollo de estos sistemas nanoparticulados poliméricos se realizó una búsqueda bibliográfica en una fuente primaria de información ("scopus") combinando las palabras claves "**nanopartículas proteínicas**" y "**sistemas transportadores de fármacos**" en la opción de búsqueda avanzada desde 1990 a 2015. A partir de dicha búsqueda se obtuvo la figura 1.2 en lo cual se observa claramente que el número de artículos publicados ha aumentado significativamente a través de los años, hecho que revela un interés creciente en el estudio de estos sistemas portadores de fármacos.

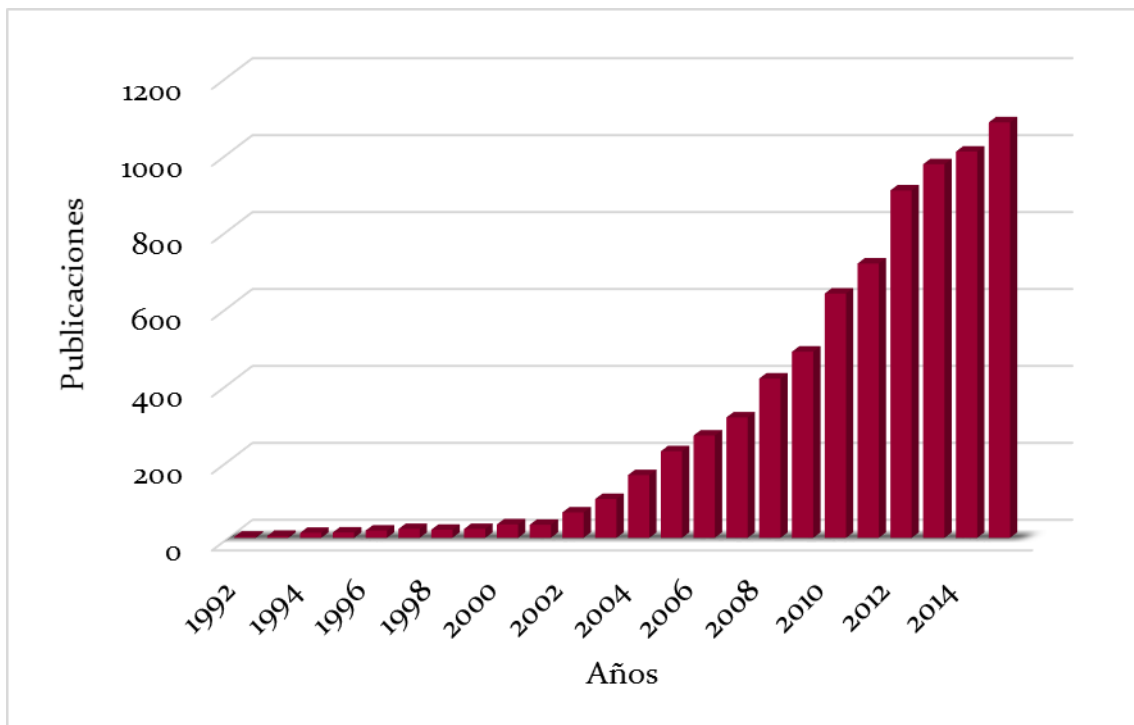


Figura 1.2. Numero de publicaciones de NP poliméricas en función de los años obtenidos combinando las palabras claves "nanopartículas proteínicas" y "sistemas transportadores de fármacos" en el buscador scopus desde 1990 a 2015

La utilización de **albúmina sérica humana (ASH)** para la elaboración de nuevos sistemas portadores de fármacos nanométricos presenta numerosas ventajas debido a que es una proteína endógena y, por lo tanto, a las ventajas de los polímeros naturales se suma la falta de actividad antigénica (Migneault y cols., 2004). Existen numerosos procedimientos para la obtención de nanopartículas de albúmina sérica humana (NP-ASH), siendo el proceso de desolvatación uno de los más simples, robustos y reproducibles mediante el cual las NP se forman por el agregado de un agente de desolvatación (etanol o acetona) a una solución de ASH (Paik y cols., 2013; 2012; Wacker y cols., 2011). Posteriormente, es clave el agregado de un agente entrecruzante (AE) a las NP formadas para asegurar la estabilidad coloidal del nanosistema en el tiempo ya que, de lo contrario, la ASH tiende a volver a su estructura termodinámicamente más estable llevando a la desaparición de las NP. Son muchos los reportes que muestran al glutaraldehído como el agente químico utilizado para dicho fin y el entrecruzamiento se logra por la reacción entre los grupos aminos de la ASH nanoparticulada expuestos en la superficie y los grupos aldehídos (Weber y cols., 2000; Rohiwal y Pawar, 2014). En la figura 1.3 se esquematizo dicho proceso.

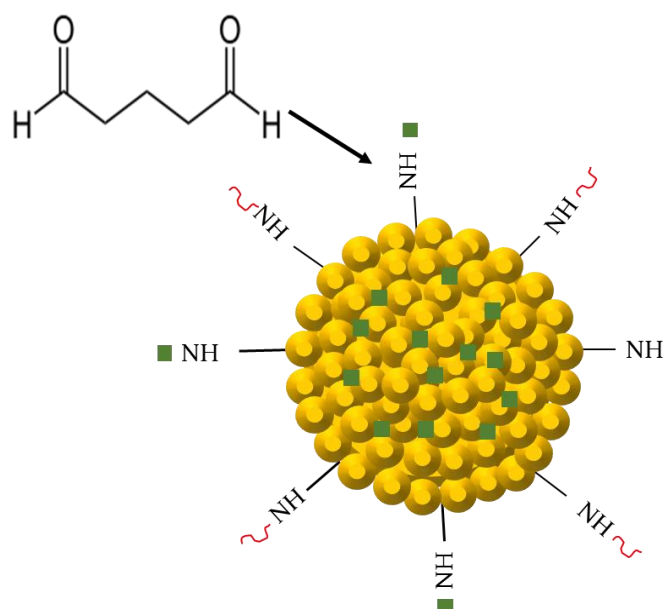


Figura 1.3. Esquema representativo de la reacción entre los grupos reactivos del glutaraldehído y los grupos aminos libres de la NP-ASH (extraído y modificado de Bae y cols, 2012).

Como fue reportados por Van Miller y cols. (2002) el uso de glutaraldehído presenta la desventaja de que se trata de un compuesto toxico para las mucosas. Por consiguiente, si estos sistemas son para la administración crónica pueden llegar a presentar numerosos problemas para la salud.

En este contexto, uno de los principales objetivos del presente trabajo fue el estudio de nuevos agentes AE para la formación de NP de ASH. El reemplazo del glutaraldehído supone un gran desafío dado que existen muy pocos antecedentes del uso de AE alternativos con propiedades adecuadas (Jahanban-Esfahlan y cols., 2014; Lin y cols., 2004). La selección de los AE se basó en la existencia de grupos funcionales en la estructura química del AE capaces de interaccionar con la NP-ASH y, adicionalmente, deben ser compuestos no tóxicos y, en lo posible, aprobados como excipientes para formulaciones farmacéuticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES

EXCIPIENTES

2.1. Albúmina sérica humana (ASH)

La albúmina de suero humano (ASH, figura 2.1.1) es la proteína más abundante del plasma (35 a 50 mg/ ml), con una vida media de 19 días. Esta proteína endógena es sintetizada en el hígado, participa en el mantenimiento de la presión osmótica y en procesos relacionados a la unión y el transporte de nutrientes hacia las células (Kratz, 2008).

La ASH tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa. Su estructura química consiste en una cadena polipeptídica de 585 aminoácidos con numerosos residuos de aminoácidos (1 residuo triptófano, 6 residuos de metionina, 17 residuos de cisteína, 36 residuos de ácido aspártico, 61 residuos de ácido glutámico, 59 residuos de lisina y 23 residuos de arginina) y 7 puentes di-

sulfuros, los cuales contribuyen a las propiedades químicas de la proteína y a su conformación espacial. En lo que respecta a la estructura secundaria, si bien no se conoce con exactitud, se reportó que aproximadamente es el 55 % α -hélice (Irache y cols., 2012; Langer y cols., 2008).

Las numerosas ventajas de esta proteína (biodegradable, biocompatible y no-toxica) junto a la alta solubilidad (hasta 40 % p/v) a pH 7,4 hacen de la ASH un portador de interés terapéutico, capaz de transportar una amplia variedad de fármacos.

Con respecto a las propiedades fisicoquímicas, esta proteína tiene un potencial zeta de -17 mV (a pH fisiológico), es estable en el rango de pH de 4 a 9 y se puede calentar a 60°C hasta 10 horas sin efectos deletéreos (Pathak y Thassu, 2009).

En el presente trabajo de tesis doctoral se utilizó ASH con una pureza del 99 % adquirida en Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

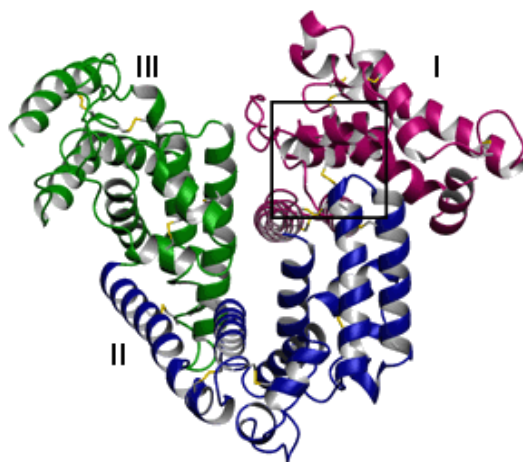


Figura 2.1.1. Esquema de la estructura de la albumina sérica humana (Extraído de Kratz, 2008).

2.2. Glutaraldehído (GLUT)

El glutaraldehído (figura 2.2.1.) es un líquido di-aldehído alifático, de bajo peso molecular e incoloro ampliamente utilizado para aplicaciones industriales, científicas y biomédicas. Es un compuesto soluble en agua y en solventes orgánicos como el etanol, benceno y éter. Este reactivo es ligeramente ácido en solución acuosa (pH 3-4).

La exposición al glutaraldehído presenta números efectos adversos como irritación ocular, dermatitis (por alergia o por efecto irritante directo) e irritación del tracto respiratorio (Van Miller y cols., 2002).

La solución de glutaraldehído al 25 % utilizada fue adquirida en Sigma, Buenos Aires. Debido a su alta reactividad resulta ser el entrecruzante más utilizado y estudiado para la obtención de NP de ASH.

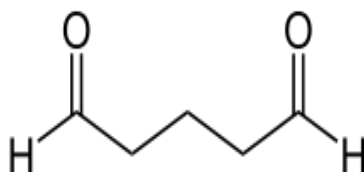


Figura 2.2.1. Estructura química del Glutaraldehído.

2.3. Gantrez ES-425 (Gantrez)

Los productos Gantrez® (figura 2.3.1) son una familia de copolímeros sintéticos provenientes del metilviniléter y el anhídrido maleico que reacciona fácilmente con grupos amino (Gómez y cols., 2006).

Los mencionados copolímeros de Gantrez® son ampliamente utilizados en aplicaciones farmacéuticas por sus excelentes propiedades bioadhesivas en el área de la odontología. También son usados como viscosizantes, agentes acomplejantes, coloides hidrófilos, en parches transdérmicos y en comprimidos bucales (Fraga y cols., 2009).

En el presente trabajo de tesis se seleccionó el Gantrez ES-425 donado por Ashland (Buenos Aires, Argentina)

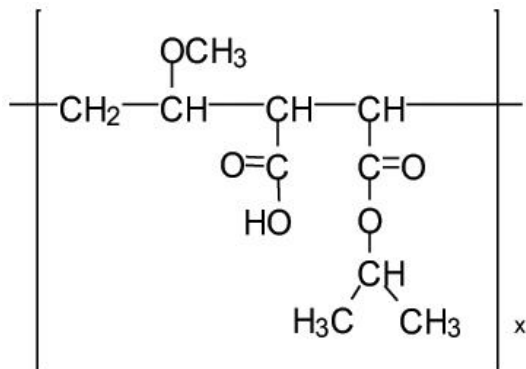


Figura 2.3.1. Estructura química del Gantrez ES-425.

2.4. Eudragit® S100 (EUDS100)

Es un copolímero lineal constituido por grupos dimetil-amino-metacrilatos y esteres de metacrilato. Es utilizado mayoritariamente para el recubrimiento de cápsulas y comprimidos destinados a la vía oral. Dependiendo del tipo de polímero usado los recubrimientos presentan diferentes propiedades.

El EUD-S100 (figura 2.4.1, Evonik, España) seleccionado como entrecruzante de las NP es un copolímero aniónico en base de ácido metacrílico y metacrilato de metilo. Es un polvo fino de color blanco, insoluble en agua y soluble en alcohol y acetona. Este excipiente puede ser utilizado en formulaciones tópicas ya que se lo considera un material no tóxico y no irritante.

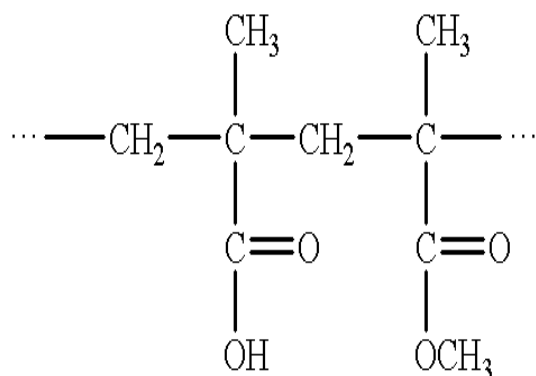


Figura 2.4.1. Estructura química del EUD-S100.

2.5. Hidroxipropilmetilcelulosa-Ftalato (HPMCF)

Es un compuesto derivado de la glucosa, insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos como metanol, etanol y acetonitrilo (Rowe y cols., 2006).

El HPMCF (figura 1.5.1) fue desarrollado y utilizado originalmente como un agente de revestimiento entérico, pero gracias a sus propiedades favorables, se ha extendido su uso a nuevos campos de aplicaciones, incluyendo preparaciones de liberación sostenida y bases de microcápsulas.

La HPMCF fue provista por Acros Organic, España.

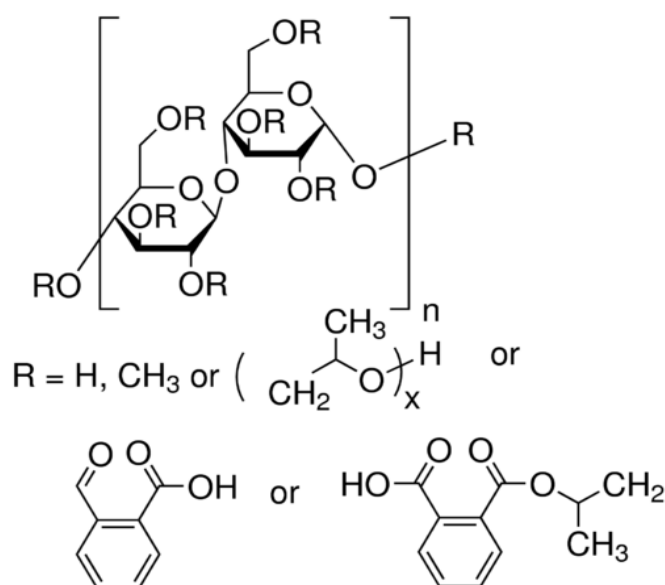


Figura 2.5.1. Estructura química del ftalato de HPMC.

2.6. Polietilenglicol 35000 (PEG)

Los PEG (figura 1.6.1) son un grupo de polímeros formados por la reacción entre óxido de etileno y agua. Existen varios grados según su peso molecular (de 200 hasta 35000)

Son compuestos muy utilizados en la industria farmacéutica en productos oftálmicos, parenterales, formulaciones tópicas, orales, rectales, etc. Son esencialmente no tóxicos y no irritantes.

Poseen una alta reactividad química, conferida por sus dos grupos -OH terminales lo que los hace incompatibles con ciertos antibióticos (penicilina, bacitracina), conservantes (parabenos), colorantes, etc.

Se seleccionó como excipiente el PEG 35000 adquirido en Sigma (Madrid, España) para estabilizar las NP.

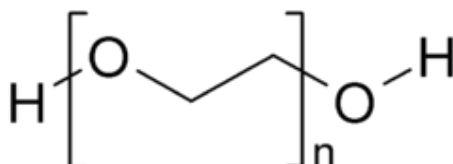


Figura 2.6.1. Estructura química del PEG 35000.

2.7. Animales

La manipulación de los conejos albinos se realizó conforme a la ARVO (Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología), a European Communities Council Directive (86/609/CEE) resolución sobre el uso de animales en la investigación, y el Comité de ética de protocolos experimentales en el uso de animales en proyectos científicos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Se utilizaron conejos albinos New Zeland de aprox 2,5 kg (n: 6), los cuales se encontraron albergados en estrictas condiciones de animalario.

Respecto a los ratones, se utilizaron hembras Balb/c de 8 semanas de edad con un peso medio de 20 ± 1 g que fueron cuidados y alimentados bajo condiciones estándar con libre acceso a comida y bebida. Los ratones se trasladaron a jaulas metabólicas 12h antes de empezar el estudio para prevenir la coprofagia (la cual alteraría el estudio) pero permitiéndoles libre acceso al agua. Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo un protocolo previamente aprobado (nro. de protocolo: 172-14) por el Comité Ético de la Universidad de Navarra en línea con la legislación europea de animales de experimentación (86/609/EU).

3. METODOLOGIA

3.1. Obtención de nanopartículas de albumina sérica humana

La obtención de nanopartículas de albumina sérica humana (NP-ASH) se realizó mediante el proceso de desolvatación basado en la metodología descrita por Merodio y cols. (2002).

El proceso de obtención fue dividido en los siguientes pasos:

Paso uno: 15 mL de etanol fueron añadidos a 7,5 mL de una solución de ASH al 2 % (p/v). Se estudiaron diferentes pH de la solución inicial de ASH en el rango de 4 a 8, ajustados con HCl y NaOH respectivamente. Las nanopartículas formadas (NP-ASH) se dejaron con agitación mecánica constante por 10 minutos.

Paso dos: se agregó el AE a las NP. En la tabla 3.1.1 se muestran los diferentes AE seleccionados, la proporción utilizada y los diferentes tiempos de incubación estudiados para la obtención de NP. El glutaraldehído fue utilizado como AE de referencia.

Tabla 3.1.1. proporciones de AE estudiadas y los diferentes tiempos de incubación evaluados para cada proporción de AE.

AE	Relación AE/HSA	Tiempo de incubación(min)
Glutaraldehído	5×10^{-3}	15
Gantrez	0,1-0,5	0-15
Eudragit® S100	0,1-0,75	0-60
HPMCF	0,1-0,5	0-60
PEG 35000	0,2-0,75	0-45

Paso tres: Se eliminó el etanol de la solución de NP mediante evaporación a presión reducida (rotavopar Phonenix RH-1000, Shanghai, China) y luego se realizó la purificación de las NP mediante dos ciclos de ultracentrifugación a 20.000 rpm durante 20 min. a 4°C (HERMLE Z 36 HK, Labortechnik, Alemania). En cada ciclo fue separado el sobrenadante (ASH libre) del precipitado (NP purificada). En el último ciclo, el precipitado fue redispersado en 5 mL de una

solución acuosa de sacarosa al 5 % y las NP fueron congeladas a -8°C para luego ser liofilizadas (Genesis 12EL, Virtis, USA)

Se utilizó 150mg de sacarosa como agente crioprotector para prevenir la aglomeración de las NP durante el proceso de liofilización (Anhorn y cols., 2008).

En la figura 3.1.1 se encuentra esquematizado el proceso de obtención completo.



Figura 3.1.1. Esquema de los pasos a seguir para la obtención de NP-ASH.

3.2. Tamaño de partícula e índice de Polidispersidad y potencial zeta

Los valores de coeficiente de difusión (CD), diámetro hidrodinámico (dH) o tamaño medio de partícula (TMP) y el índice de polidispersidad (IP) fueron determinados mediante espectroscopia de correlación fotónica (ECF) también llamada dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizando un equipo Delsa-Nano-C (Beckman Coulter, Osaka, Japon) seleccionando un ángulo de detección de 165° .

El potencial electrocinético o potencial zeta (PZ) de las NP se determinó por la técnica de electroforesis dinámica de la luz (EDL) utilizando un equipo Delsa-Nano-C (Beckman Coulter, Osaka, Japon) provisto de un láser de diodo de 658nm y un ángulo de detección de 165° .

El diámetro de las nanopartículas e IP se obtuvieron de la función de auto correlación provista por el software de equipo (Delsa-Nano 2.2 software, Beckman-Couter, Osaka, Japón) utilizando el método de Cumulants, que infiere el diámetro a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 1) considerando los valores de viscosidad del solvente informados en la bibliografía.

ec.1

$$R_H = \frac{KT}{6\pi\eta CD}$$

Donde R_H es el radio hidrodinámico, K es la constante de Boltzmann, T es la Temperatura, CD es el coeficiente de difusión y η es la viscosidad del líquido a 25°C. Los potenciales zeta (PZ) se obtuvieron a partir del análisis de software del equipo que utiliza la ecuación de Smoluchowski.

Todas las mediciones se realizaron por triplicado a 25°C a partir de diluciones de las NP en agua purificada tanto de las NP sin liofilizar como de los sistemas liofilizados. Se comprobó previamente que las mediciones no presentaran modificaciones significativas en función de las diluciones.

3.3. Microscopia electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido (MEB) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de los sistemas. Las imágenes y contrastes se construyen a partir de la emisión de electrones de una muestra cuando sobre ella incide un delgado haz de electrones enfocados de alta energía (superior a 40 keV, generalmente)

Una muestra para poder ser analizada por MEB por un lado debe estar completamente seca, ya que las moléculas de agua que permanezcan en la muestra ocasionaría daños en el microscopio y, por otro lado, debe ser conductoras de electrones, motivo por el cual suelen ser metalizadas con una delgada lamina de paladio-platino.

Para el estudio morfológico se pesaron 10 mg de la NP liofilizada que se re dispersaron en 1 mL de agua purificada. Luego, 50 μ L de la muestra fue colocada sobre una placa metálica y dicho sistema fue secado al vacío. Posteriormente, se

recubrió con una capa de paladio-platino empleando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica (PELCO Model 3). Las fotografías MEB se obtuvieron mediante la utilización de un microscopio digital (Oberkochen, Alemania). La magnificación seleccionada permitió observar en detalle la morfología de las muestras.

3.4. Osmolaridad y pH

Los valores de pH de las formulaciones se midieron utilizando un pHmetro Hanna (Hanna HI 112, Argentina) y las mediciones de la osmolaridad con un Osmómetro (Osmomat 030-D crioscópico, Gonotec®, España), utilizando una solución de cloruro de sodio como referencia (303 osmoles / kg). Ambos valores se midieron por triplicado en todas las formulaciones.

3.5. Rendimiento del proceso

El rendimiento del proceso (RP) se realizó por gravimetría. Para tal fin, se prepararon NP-ASH, con los diferentes AE y se liofilizaron sin crioprotector. Una vez obtenido el polvo fue pesado y el rendimiento se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{ec. 1} \quad \text{RE (\%)} = [P_{\text{liof.}} / (P_{\text{ASH}} + P_{\text{AE}})] \times 100$$

Donde $P_{\text{liof.}}$ es el peso del polvo obtenido luego del proceso de liofilización, P_{ASH} es el peso inicial de ASH para la formulación de las NP y P_{AE} es el peso del AE agregado.

3.6. Rendimiento de encapsulación

Este cálculo es la determinación de la cantidad de ASH que forma NP en relación a la cantidad inicial de ASH. La cuantificación de ASH puede ser realizada en *forma directa* (por desnaturalización de las NP obtenidas con NaOH) o en *forma indirecta* (utilizando los sobrenadantes obtenidos del proceso de purificación). En el presente capítulo se seleccionó la forma directa de cuantificación redispersando 10mg de NP sólida en una solución de NaOH al

0,005 mM. Luego, mediante la técnica Bradford (descripta continuación) se determinó la concentración de ASH en las NP.

La concentración de ASH en las NP se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{ec. 1} \quad \text{ASH (\%)} = [(C_{\text{NP}} / (C_{\text{INC}})] \times 100$$

Donde C_{NP} es la concentración de ASH en las NP, C_{INC} es la concentración de ASH usado inicialmente.

3.6.1. Técnica Bradford para la cuantificación de ASH

Es una reacción colorimétrica que permite determinar proteínas totales mediante la reacción de un colorante específico (Coomassie Azul brillante G-250, Bio-Rad, Argentina) en solución ácida con la proteína. La unión del colorante a la proteína provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 365 a la 595 nm (Bradford, 1976) y este cambio es indicativo de la presencia de proteínas en la muestra.

Este método es sensible, simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación (Carlsson y cols., 2011).

El procedimiento para la cuantificación de ASH consistió en mezclar igual volumen de solución de reactivo Bradford con la dispersión NP (previamente desnaturalizadas con NaOH) dejando incubar la mezcla durante 15min. Posteriormente las muestras fueron medidas por espectroscopia U.V-Visible utilizando un espectrofotómetro Thermo®-Evolution 300 a un máximo de absorción de 595nm. Mediante una curva de calibrada realizada previamente con contracciones conocidas de ASH fue determinada la concentración de ASH en la muestra.

3.6.2. *Análisis por espectroscopia ultra violeta visible*

Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura de las moléculas y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que la longitud de onda es característica de cada molécula en el medio en el cual se encuentra.

Por lo tanto, es de gran utilidad esta técnica para caracterizar las soluciones en la región ultravioleta-visible del espectro y se rige la ley de Beer-Lambert que responde a la ecuación 1:

$$\text{ec.1} \quad A = E.C.l$$

Donde A es la Absorbancia, E es el Coeficiente de extinción (característico de cada sustancia), l es el espesor de la cubeta (cm) y C es la Concentración (moles/l).

Una vez seleccionada la longitud de onda máxima a la que absorbe el analíto se realiza la curva de calibrado partiendo de una solución madre de concentración conocida. Se realizaron tres determinaciones de cada punto.

3.7. Estabilidad del sistema coloidal

En este ensayo se determinó el tiempo durante el cual los sistemas coloidales no modifican TMP e IP.

Para dicho ensayo las NP liofilizadas se re dispersaron en una solución amortiguadora fosfato salino (PBS 7,4) y fueron conservadas a 4°C. A tiempos determinados, durante un mes, se realizaron por triplicado las medidas de TMP e IP.

3.8. Caracterización fisicoquímica del sólido

Para estudiar los cambios que se producen en la ASH durante el proceso de desolvatación y posterior agregado del agente entrecruzante, se llevaron a cabo estudios de espectroscopia infrarroja (IR) y difracción de Rayo X (XRD).

3.8.1. Espectroscopia IR

A través de esta técnica es posible relacionar las frecuencias de ciertas bandas de absorción en el IR con la presencia de determinados enlaces o grupos funcionales en la molécula (Valls y del Castillo, 1998; Conley, 1979).

La espectroscopia IR se utilizó para determinar posibles cambios en la estructura de la ASH tras la formación de NP. Los espectros infrarrojos se obtuvieron mediante la colocación de una muestra sólida en el espectrómetro NICOLET FTIR (Thermo® Fisher Scientific, E.E.U.U). Las muestras fueron escaneadas de 4000 a 400 cm^{-1} . Los datos se analizaron utilizando el software OMNIC (Thermo® Fisher Scientific, EE.UU.).

Se realizaron IRFT de cada analito por separado (ASH y AE), la mezcla física (preparada a partir de la mezcla de iguales cantidades de ASH y AE que en las NP) y las NP.

3.8.2. Difractometría de rayos x de polvos (DRX)

Esta técnica fue utilizada para identificar fases cristalinas y examinar cualitativamente cambios en la cristalinidad. Para este fin, las muestras se colocaron en forma de polvo sobre una placa metálica en un difractómetro (Bruker Axs D8 Advance, Alemania) y se realizaron medidas a más de 360°C a temperatura ambiente. Los difractogramas se analizaron utilizando el programa Diffrac.Suite.

3.9. Ensayo *in vivo* de irritación ocular

Para evaluar la potencial irritación y daño ocular causado por los nanosistemas bajo estudio se empleó el test de Draize modificado por Tártara y cols. (2012) (ver tabla 3.9.1). La principal modificación con respecto al método original fue la utilización de un oftalmoscopio binocular indirecto (Neitz®, Japón) y una lupa de aumento de 20 dioptrías (Nikon®, Japón), que permitieron evaluar microlesiones corneales y conjuntivales con la previa aplicación de fluoresceína (solución de Gran, Laboratorio Alcon®).

En este ensayo se utilizaron grupos de 3 conejos New Zealand para cada formulación, con un peso promedio entre 2,0-2,5 kg. Para el ensayo, se

instilaron 50 µl de la formulación en estudio (NP) en el saco conjuntival del ojo derecho del conejo y el ojo izquierdo se utilizó como control mediante la instilación de una formulación comercial de hialuronato de sodio (Laboratorio Poen®)

Las observaciones del tejido ocular fueron realizadas a los 0,5- 1- 2-3- y 24 h pos administración. Luego, se calculó el puntaje del daño causado tras la aplicación de la formulación (tabla 3.9.1) y a partir del puntaje obtenido se determinó la gravedad de la lesión (tabla 3.9.2).

Tabla 3.9.1. Puntajes según daño causado tras la aplicación de la formulación (Tártara y cols., 2012).

CLASIFICACIÓN POR ÁREA		SCORE(puntaje)
OPACIDAD DE LA CÓRNEA		
Sin opacidad ni queratitis		0
Opacidad o queratitis difusa, detalles del iris claramente visibles		1
Áreas translucidas fácilmente discernibles, detalles del iris ligeramente oscurecidos		2
Áreas opalescente, no hay detalles visibles del iris, tamaño de la pupila apenas discernible		3
Córnea opaca, iris no discernible a través de la opacidad		4
AREA DE LA CÓRNEA INVOLUCRADA		
Un cuarto (o menos) pero no cero		1
		2
		3
		4
IRIS		
Normal		0
Turbidez del humor acuoso		4
Profundización de las criptas y/o congestión y edema del iris con inyección periquerática		6
Hemorragia, destrucción del iris, pupila o pupila no reactiva a la luz		8
ENROJECIMIENTO CONJUNTIVAL		
Vasos sanguíneos normales		0
Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (inyección conjuntival)		1
Enrojecimiento difuso, vasos sanguíneos no fácilmente discernibles		2
Ojo Rojo		3
Quemosis		4

Tabla 3.9.2. Gravedad de la lesión según puntaje obtenido de la tabla 3.9.1

GRAVEDAD DE LA LESIÓN	
Puntaje	Grado de Irritación
0 a 2	NO HAY IRRITACIÓN
3 a 7	LEVE
8 a 12	MODERADO

3.10. Estudios de biodistribución

El ensayo de biodistribución permite determinar la presencia de la formulación en los tejidos (órgano diana y no diana) así como el mecanismo y el tiempo de eliminación de la formulación del órgano diana y del resto del cuerpo (Mallol, 2008).

Con la finalidad de realizar estudios de biodistribución *in vivo* se emplearon técnicas basadas en el uso de trazadores radioisotópicos. El ^{99m}Tc fue el isótopo de elección para el radiomarcaje de las nanopartículas debido a las adecuadas propiedades físicas de este elemento ($t_{1/2} = 6,02$ h, emisor gamma puro de 140 keV) y a su gran disponibilidad mediante un generador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc . El marcaje con este isótopo permitió ver la localización de las NP en los diferentes órganos del animal tras la administración oftálmica (Sanchez-Martinez y cols., 2013).

El radiomarcaje de las nanopartículas se llevó a cabo en el grupo de Química Nuclear del Hospital de la Universidad de Navarra (España).

Para el ensayo se establecieron 3 grupos de 6 ratones cada uno y a cada grupo de animales se les administraron 8 μL de las respectivas formulaciones en estudio (^{99m}Tc -NP-GANTREZ, ^{99m}Tc -NP-PEG y $^{99m}\text{TcO}_4$ - libre en colirios de hidroxipropilmetilcelulosa). Luego, a tiempos determinados se tomaron imágenes de los animales mediante cámara gamma (previa anestesia con isoflurano al 2 %). Es importante aclarar que los animales estuvieron anestesiados únicamente durante la toma de las imágenes.

4. RESULTADOS

4.1. Estudios de pre-formulación y formulación de NP-ASH

Mediante el proceso de desolvatación, se logró obtener nanosistemas de ASH en forma sencilla y los resultados fueron reproducibles.

La determinación del pH de la solución inicial de ASH fue un factor importante en el control de la precipitación de la proteína durante el proceso de desolvatación (Jun y cols., 2011). Cuando el pH es cercano al PI (5,5), las interacciones proteína-proteína son mayores lo cual favorecería a la precipitación de las moléculas de ASH y como resultado podrían formarse partículas más grandes. Por otro lado, a pH alejados de PI las interacciones proteína-disolvente (agua) favorecen la formación de partículas más pequeñas de ASH (Paik y cols., 2013). Los resultados del presente trabajo mostraron que el pH óptimo para la formación de NP-ASH fue de 4,4, ya que se formó una dispersión turbia a la vista tras el agregado de etanol (figura 4.1.1). A pH menores de 4,4 no hubo formación de NP (ausencia de turbidez) y a pH mayores se formaron precipitados de la proteína.



Figura 4.1.1. Obtención de NP-ASH con estabilidad coloidal.

Posteriormente se estudió la concentración óptima de los nuevos AE seleccionados utilizando tiempos de incubación iniciales de 30 min. Los ensayos mostraron que cuando la concentración de AE fue baja no hubo formación de NP, mientras que a concentración altas las NP precipitaron. Posteriormente, al encontrar la concentración que logró mantener la estabilidad coloidal del sistema se fueron disminuyendo los tiempos de incubación(TI).

En la tabla 4.1.1 se esquematizan las diferentes proporciones de ASH, de AE utilizados y el TI para la obtención de NP con estabilidad coloidal.

Tabla 4.1.1. Proporciones de los agentes entrecruzantes(AE) estudiados, de la ASH y los TI seleccionados para la obtención de sistemas coloidales estables.

Nanosistemas	ASH(mg)	AE(mg)	TI(min)
NP-GLUT	100	5	10
NP-GANTREZ	100	25	5
NP-EUD S 100	100	50	15
NP-HPMCF	100	25	10
NP-PEG	100	10	5

De este modo, como se observa en la tabla 4.1.2 los nanosistemas con los nuevos AE tuvieron TMP mayor y polidispersidad similar a las NP-GLUT (sistemas de referencia) y, a su vez, dichos resultados fueron coincidentes con los reportados previamente en bibliografía (Rohiwal y Pawar, 2014; Merodio y cols., 2000). Las diferencias en los TMP de las NP entrecruzadas con los nuevos AE respecto las NP-GLUT fue debido a que los nuevos AE tienen un mayor tamaño molecular y se utilizaron en concentraciones mayores respecto al glutaraldehído (el cual es una molécula pequeña, con dos grupos ácido muy reactivos y con bajas concentraciones logro estabilizar las NP) (Lin y cols., 1999; Lin y cols., 1994). En la figura 4.1.1-5 se muestran microfotografías de los nanosistemas obtenidos.

Tabla 4.1.2. Tamaño medio de partícula(TMI) e índice de polidispersidad (IP) de los nanosistemas formulados con los diferentes AE.

Muestras	TMP (nm)	IP
NP- GLUT	163 ± 2	0,17 ± 0,01
NP -GANTREZ	231 ± 2	0,14 ± 0,02
NP-EUD S100	269 ± 2	0,13 ± 0,02
NP-HPMCF	376 ± 1	0,17 ± 0,01
NP-PEG	207 ± 1	0,10 ± 0,01

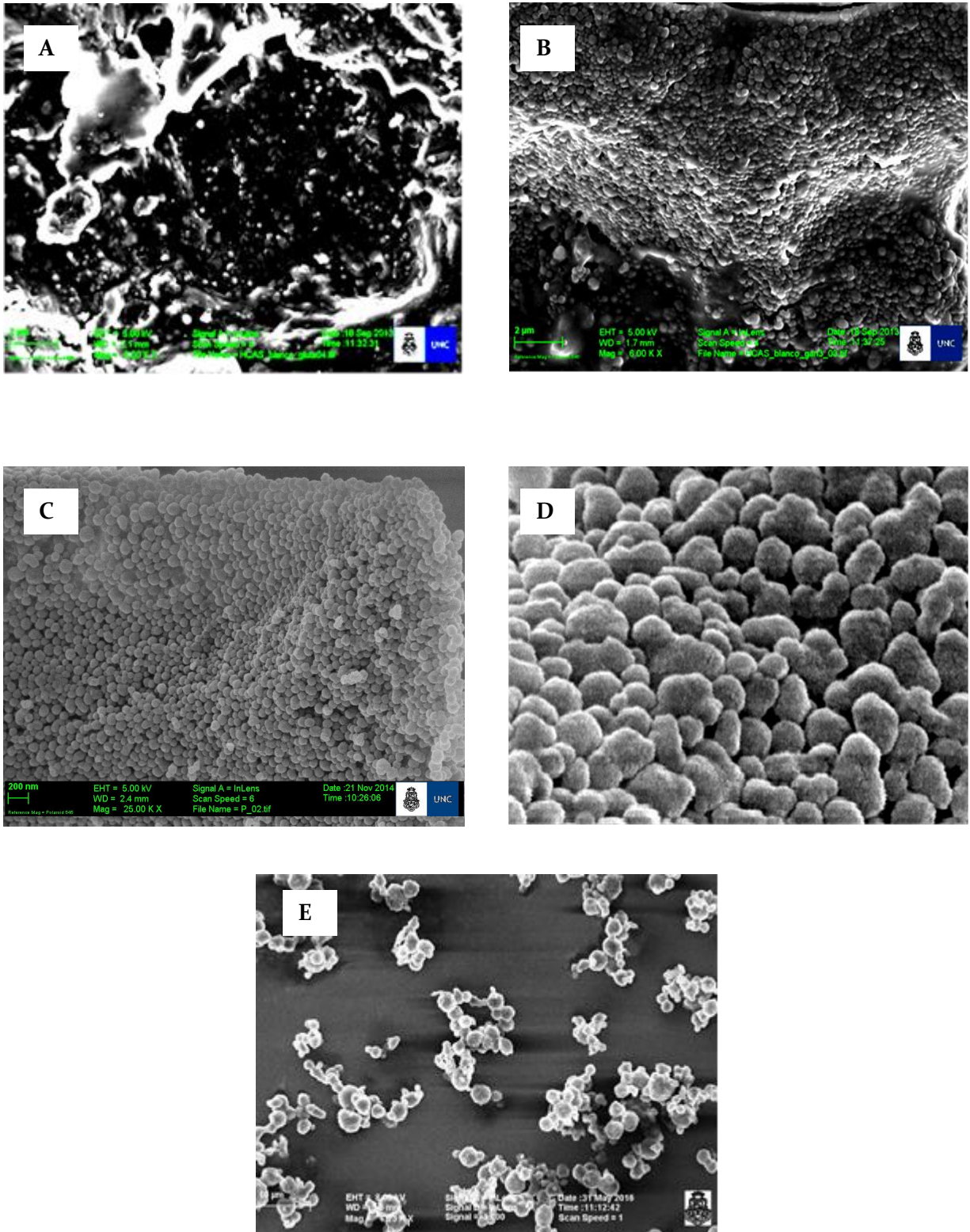


Figura 4.1.5. Microfotografía obtenida por MEB de: A) NP-GLUT; B) NP-GANTREZ; C) NP-EDU₁₀₀; D) NP-HPMCF; E) NP-PEG.

En las fotografías MEB se observó una aglomeración de las NP causada por una alta concentración de los nanosistemas en la muestra inicial. Por tal motivo son las diferencias entre los TMP determinados por DLS respecto los calculados por imágenes MEB, ya que la técnica de DLS calcula el TMP utilizando un modelo matemático, el cual considera a cada partícula como una esfera (Gaumet y cols., 2008) y la presencia de unos pocos agregados pudo aumentar significativamente el TMP.

Por último, se determinó el PZ de los diferentes nanosistemas. Como fue reportado anteriormente por Gómez-Gaete (2014) este parámetro da información de la estabilidad coloidal del sistema en medio acuoso. Fue reportado que valores absolutos de potencial zeta alejados del cero son los ideales para que el sistema coloidal sea estable (Das y cols., 2005). En la figura 4.1.1 se observa que los PZ de las NP-ASH con los diferentes AE fueron electronegativos y alejados del cero, mientras que cuando las NP no son entrecruzadas (NP-ASH) el PZ es cercano al cero, ya que son sistemas que presentaron baja estabilidad coloidal.

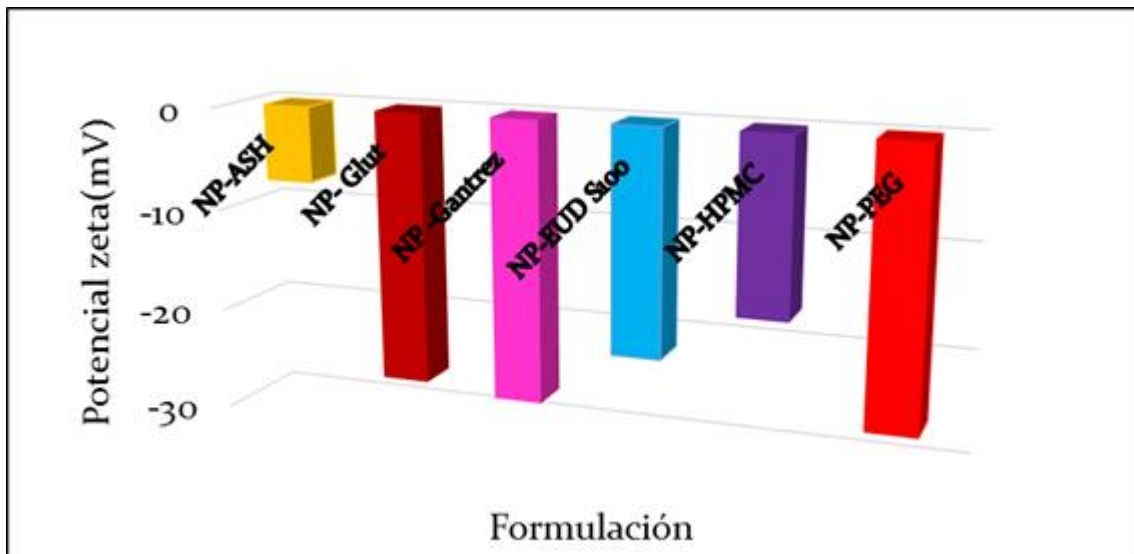


Figura 4.1.1. Potencial zeta (PZ) de los diferentes nanosistemas con AE y de los NP sin agregado de AE.

Otro punto interesante que se desprendió de los resultados obtenidos de PZ fue que la diferencia de dichos valores entre las NP-AE respecto las NP sin AE indicó una modificación en la superficie de las NP por el agregado del AE (Lin y cols., 1994; Kurman y Jain, 2006)

4.2. Estabilidad del sistema coloidal

El análisis basado en la determinación del TMP es una de las formas habituales de evaluación de la vida útil de las formulaciones farmacéuticas (Das y cols., 2012). En las tablas 4.2.1 y 4.2.2 se detallan los valores TMP e IP de los nanosistemas en medio acuoso almacenados a 4°C no mostraron modificaciones estadísticamente significativas dentro de los 21 días pos dispersión del polvo, exceptos las NP que fueron estabilizadas con PEG. Las NP-PEG aumentaron la polidispersidad en el tiempo con una disminución del TMP y dicha inestabilidad fue atribuida a las características hidrofílicas del AE, el cual, al estar un tiempo prolongado en medio acuoso favoreció la solubilización de las cadenas del polímero (Blanco-Prieto y cols., 2006).

Tabla 4.1.1. TMP de los diferentes nanosistemas en medio acuoso durante 21.

Formulación	TMP(nm)			
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
NP-GLUT	163 ± 2	159 ± 2	161 ± 4	171 ± 12
NP-GANTREZ	246 ± 1	251 ± 9	225 ± 3	221 ± 3
NP-EDU S100	241 ± 2	246 ± 5	243 ± 13	238 ± 1
NP-HPMCF	250 ± 6	244 ± 15	242 ± 26	237 ± 18
NP-PEG	173 ± 2	154 ± 15	122 ± 7	95 ± 9

Tabla 4.1.2. IP de los diferentes nanosistemas en medio acuoso durante 21 días

Formulación	IP			
	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
NP-GLUT	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,01
NP-GANTREZ	0,21 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,01
NP-EDU S100	0,20 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,01
NP-HPMCF	0,24 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01
NP-PEG	0,09 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,44 ± 0,03	0,45 ± 0,04

4.3. Rendimiento del proceso y rendimiento de encapsulación

Los RP fueron mayores al 60 % en todos los sistemas, siendo similares a los resultados reportados en bibliografía (Arnedo y cols., 2002; Honary y cols., 2010; Wacker y cols. 2011). Por otro lado, los rendimientos de encapsulación, indicativo de la cantidad de proteína en los sistemas, dependió del AE utilizado.

Tabla 4.3.1. Porcentaje del rendimiento del proceso de obtención de las NP (RP) y del rendimiento de encapsulación (RE).

Formulaciones	RP (%)	RE (% HSA)
NP- GLUT	87 ± 7	74 ± 14
NP -GANTREZ	98 ± 1	93 ± 7
NP-EUD S100	87 ± 5	59 ± 8
NP-HPMCF	77 ± 9	44 ± 6
NP-PEG	71 ± 1	38 ± 2

4.4. Estudios fisicoquímicos del sólido

Los patrones de DRX de los sistemas mostraron que las NP obtenidas fueron sistemas amorfos. En el Anexo 1 se muestran los espectros correspondientes para cada sistema.

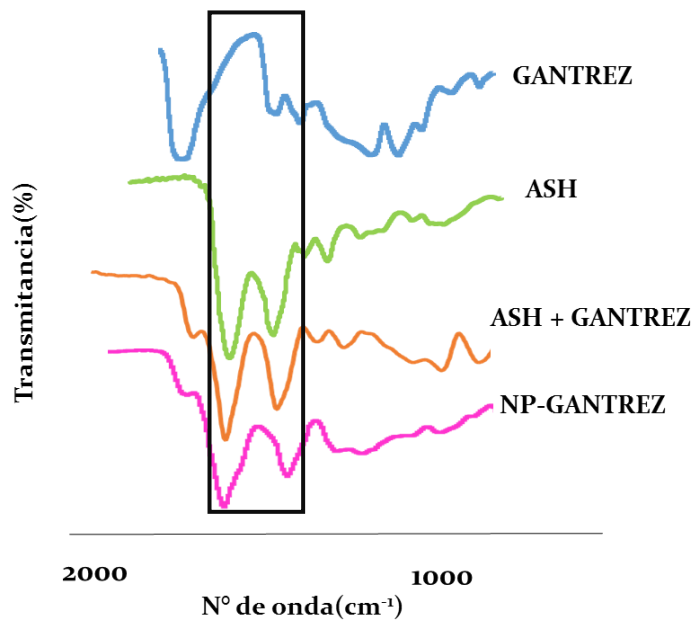
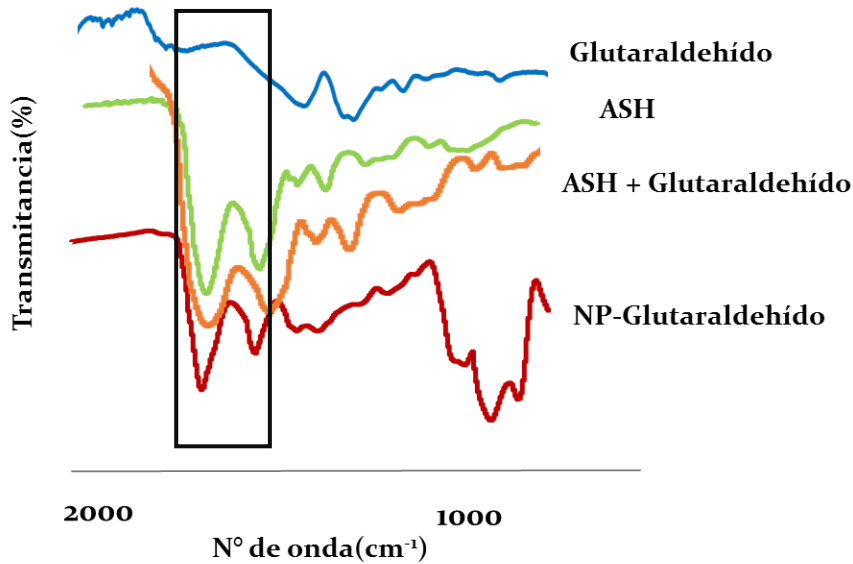
Posteriormente, la espectroscopia IR se utilizó para estudiar los posibles cambios conformacionales en la estructura secundaria de HSA como consecuencia de la adición de los diferentes AE.

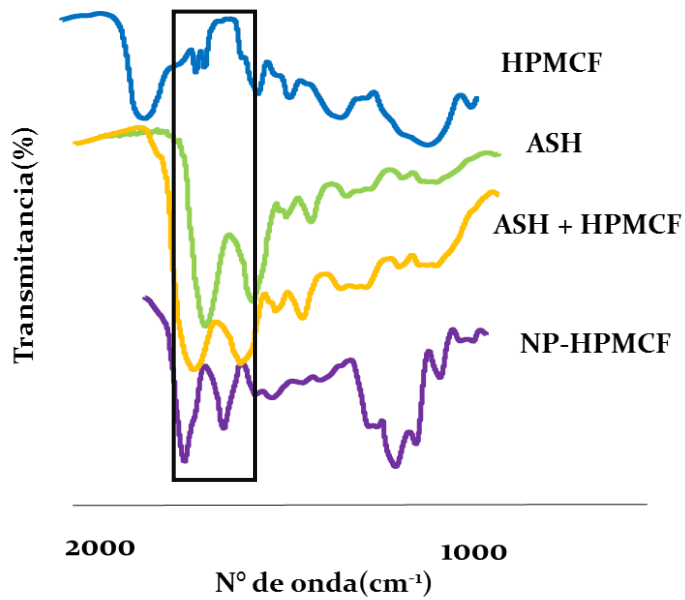
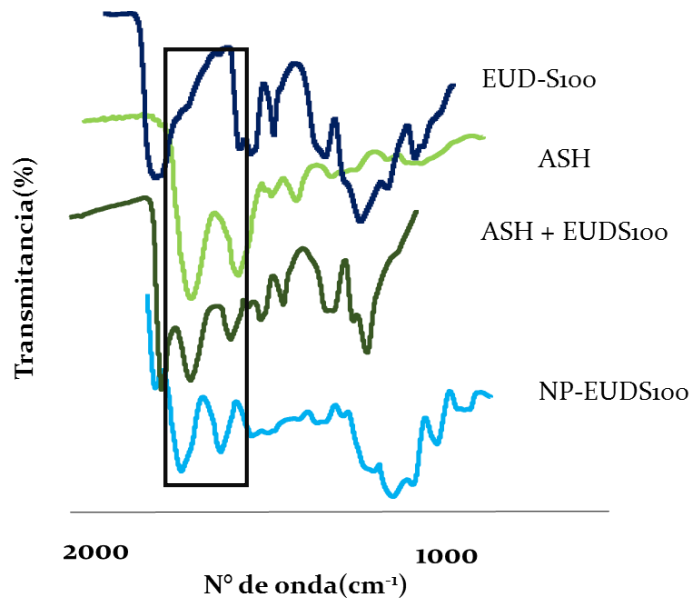
En las figuras 4.5.1 se pueden observar los espectros infrarrojos de: NP, ASH, AE y la mezcla física (obtenida a partir de la mezcla de la ASH y AE en iguales proporciones que en la NP).

A partir del análisis del espectro de ASH podemos observar que exhibió señales correspondientes a enlaces amida, los cuales representan diferentes vibraciones de los restos peptídicos. Tales señales corresponden a la banda de amida I que varía de 1600 a 1700 cm^{-1} (correspondiente al estiramiento C = O) y la banda amida II a 1550 cm^{-1} (estiramiento C-N unido al N-H). Estas bandas se han utilizado como evidencia para determinar los posibles cambios en la estructura de la ASH al formarse las NP debido a que están directamente relacionados con la estructura secundaria de la proteína. Así mismo, la banda de amida I es más sensible al cambio de estructura secundaria de la proteína que la amida II (Jahanshahi y cols., 2008).

Al analizar comparativamente los diferentes espectros, no se observó desplazamiento en la frecuencia de la banda amida I así como tampoco de amida II del espectro de las NP respecto al de la proteína sola, pero se logró determinar un cambio en la intensidad de dichas bandas. Estos cambios de intensidad indicaron algún tipo de interacción entre el AE y la ASH responsable del reordenamiento de la red polipeptídica. Esto fue previamente reportado por Rohiwal y cols. (2014) quienes determinaron que las diferencias entre los espectros de las NP respecto al de la ASH indicaron cambios en la estructura de la ASH al formar NP, pero por la técnica IR no pudo ser posible la determinación exacta de dichas modificaciones.

Para determinar de forma cuantitativa los cambios de intensidad de las bandas amidas, se calculó el cambio en la intensidad relativa de la banda amida I respecto a la banda amida II en cada una de los espectros (ASH puro, mezcla física y NP) realizando una línea base manual de los diferentes espectros en cada análisis. Dichos valores son detallados en la tabla 4.5.1.





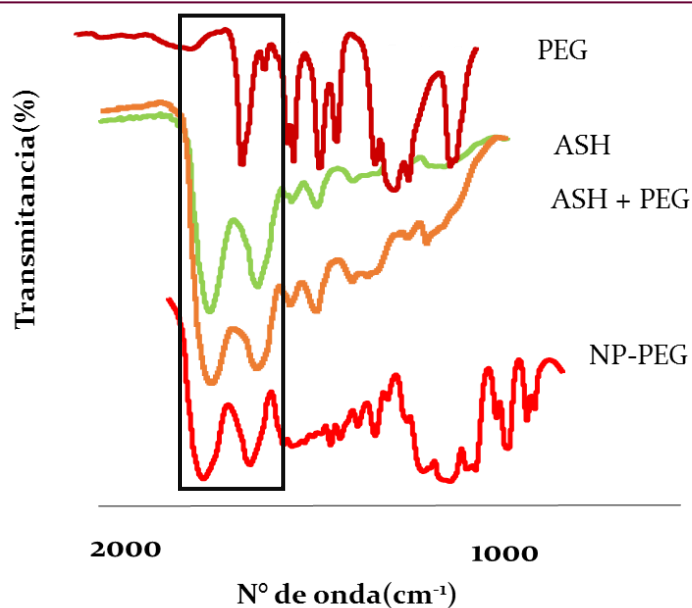


Figura 4.5.1. Espectros IR de los sistemas nanométricos, ASH, AE y mezcla física (ASH y AE).

Tabla 4.4.1. Porcentaje de los cambios en las intensidades relativas de los picos amida I respecto amida II de los espectros IRFT de ASH, NP y mezcla física.

Formulación	Intensidad Relativa(%)
ASH	57
Mezcla física: ASH-GLUT	50
NP-GLUT	40
Mezcla física: ASH+ GANTREZ	61
NP-GANTREZ	50
ASH+EUDS ₁₀₀	58
NP-EUDS ₁₀₀	45
Mezcla física: ASH+HPMCF	50
NP-HPMCF	54
Mezcla física: ASH+PEG	57
NP-PEG	45

4.5. Ensayos *in vivo* de irritación ocular

Las formulaciones de aplicación ocular deben cumplir con una serie de requisitos entre los cuales se incluyen isotonicidad y pH compatibles con el fluido lagrimal. Estos valores corresponden a un valor de osmolaridad de 290mOsm/kg y un rango de pH entre 6,6 y 7,8, pero el fluido lagrimal tiene una cierta capacidad amortiguadora (Burstein, 1997; Guerrero y cols., n.d).

Por lo tanto, según lo establecido por la USP 32 - NF 26 (2008) el pH de las formulaciones oftálmicas debe estar en el rango de 6,5 a 8,5, mientras que los valores de osmolaridad deberían estar comprendidos entre 205-684 mOsm/l. Cuando dichos valores se encuentran por fuera del rango especificado, las formulaciones pueden producir irritación ocular e incluso daños en los tejidos oculares del segmento anterior del ojo. A continuación, en la tabla 4.5.1 se detallan los valores de dichos parámetros correspondientes a los sistemas nanométricos. Estos datos mostraron que las NP no requieren el agregado de excipientes para regular pH u osmolaridad.

Tabla 4.5.1. Osmolaridad y pH de los nanosistemas formulados.

Formulación	Osmolaridad (mosm/l)	pH
NP -GLUT	453 ± 21	6,11 ± 0,02
NP-GANTREZ	344 ± 12	7,00 ± 0,13
NP-EUDS ₁₀₀	447 ± 25	6,05 ± 0,08
NP-HPMCF	611 ± 22	7,23 ± 0,02
NP-PEG	474 ± 21	6,00 ± 0,02

Posteriormente a la determinación de los valores de pH y osmolaridad de las nanopartículas, se llevaron a cabo estudios *in vivo* con la finalidad de asegurar la inocuidad de las NP en el tejido ocular. Tras la administración de las NP no se observaron molestias o enrojecimiento en el tejido ocular de los animales

respecto el ojo control. Adicionalmente, en la córnea y en la conjuntiva no hubo evidencias de hinchazón o signos de edema o hemorragia.

La figura 4.5.1 se muestran los resultados de los estudios de tolerancia ocular. utilizado como control una solución comercial de ácido hialurónico.

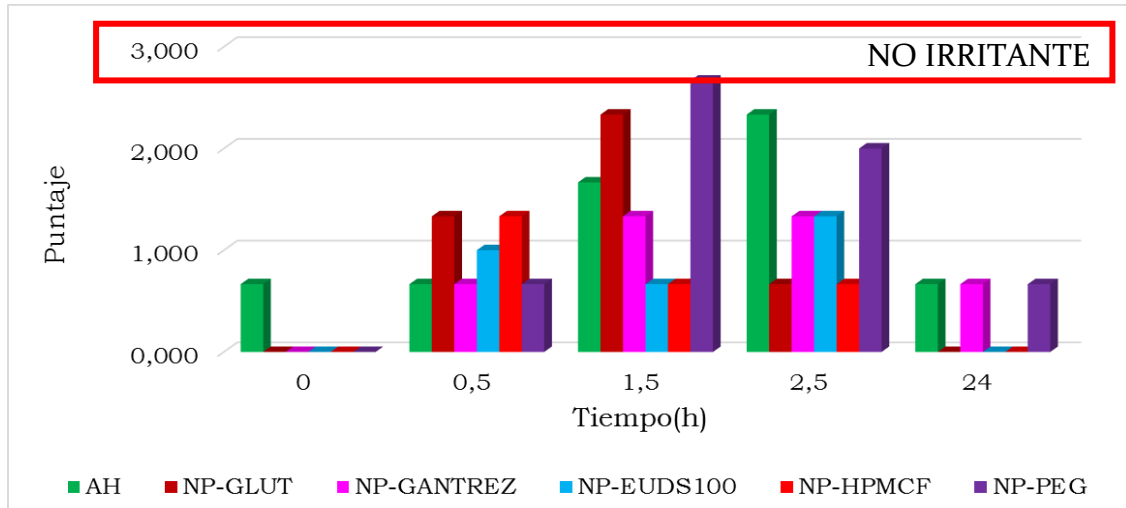


Figura 4.5.1. Puntaje de Irritación ocular determinada a través de test de Draize modificado para los diferentes sistemas nanométricos formulados.

4.6. Ensayo *in vivo* de biodistribución

Este ensayo permite observar de forma preliminar el comportamiento de los sistemas nanoparticulados en relación al tiempo de permanencia en el lugar de aplicación y, paralelamente, el destino biológico luego de su distribución en los distintos tejidos circundantes al entorno ocular. Para el ensayo se seleccionaron dos sistemas nanométricos: NP-GANTREZ y NP-PEG. Las NP-GANTREZ fueron elegidas en base a los resultados de rendimientos y de estabilidad coloidal, mientras que las NP-PEG se seleccionaron debido a que el PEG es un polímero ampliamente utilizado y estudiado en la industria farmacéutica (Irache y cols., 2011).

La figura 4.6.1 muestra las fotografías de los animales luego de la instilación de la formulación y de la solución control. Si bien las imágenes fueron tomadas a partir de los 15 minutos aquí se mostraron a partir de las 5 h. A tiempos menores no se observó migración de las formulaciones fuera del entorno

ocular infiriendo dicho resultado a una muy baja eliminación de las NP desde el sitio de aplicación durante dicho período de tiempo.

Las imágenes mostraron que la formulación permanece en el sitio de aplicación por lo menos 17 h pos instilación, lo cual es indicativo de la buena bioadhesión de los sistemas en el tejido ocular. Por otro lado, se visualizó la migración de la formulación desde el sitio de aplicación al tracto gastrointestinal y su posterior eliminación.

De este modo, los sistemas mostraron ser muy eficientes en cuanto al tiempo de permanencia en el sitio de aplicación.

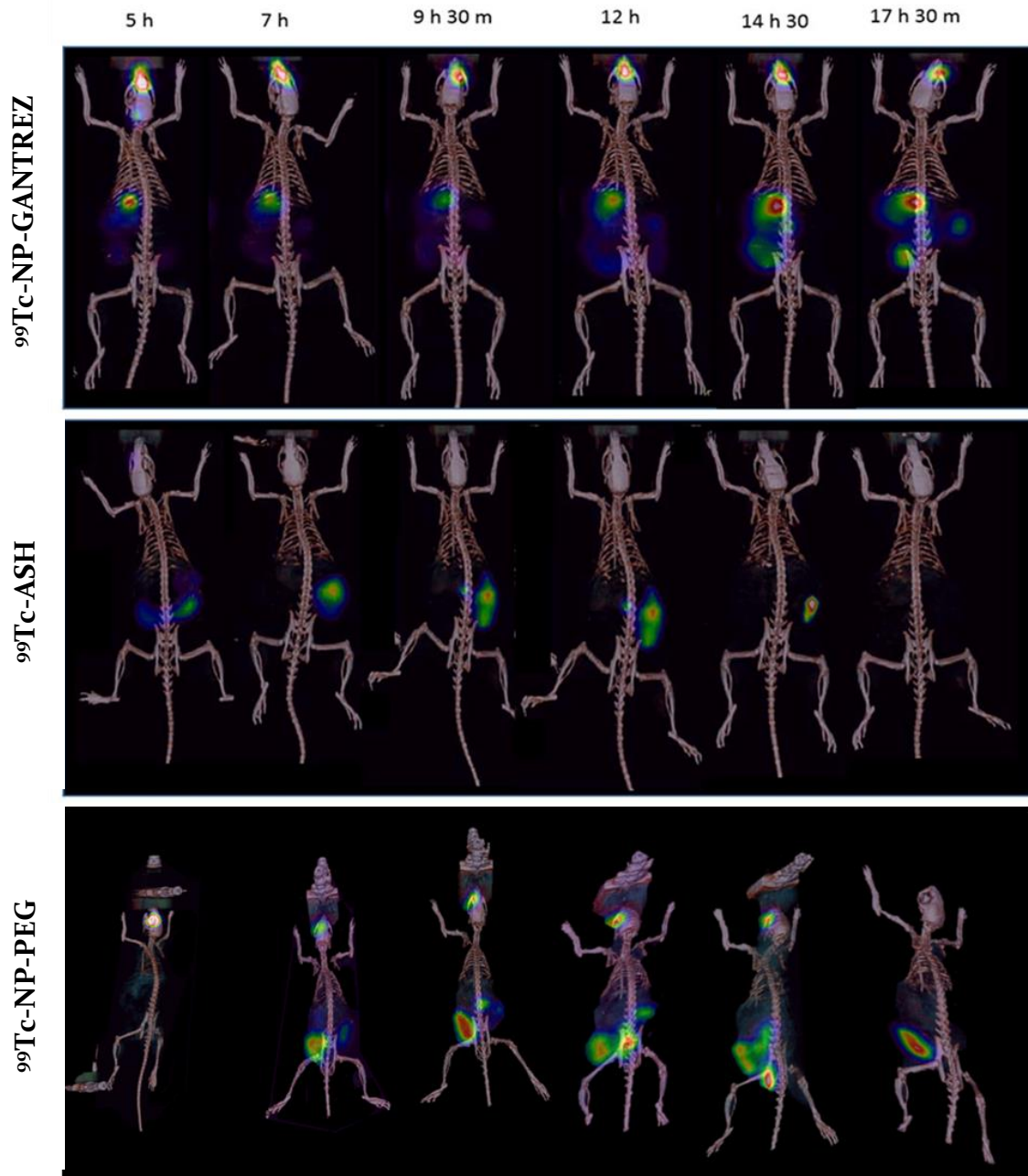


Figura 4.7.1. Biodistribución y permanencia en el tejido ocular de las NP-Gantrez, NP-PEG y formulación control en el tiempo tras la administración tópica oftálmica.

5. DISCUSIÓN

La albúmina es una proteína con propiedades farmacéuticas beneficiosas ya que presenta alta solubilidad en agua, es estable frente a cambios de pH y disolventes orgánicos, es biodegradabilidad / biocompatibilidad, sin toxicidad e inmunogenicidad y versátil para modificaciones en su estructura (Kratz, 2008). Como fue reportados por Naveenraj y Anandan (2013), las nanopartículas obtenidas de albúmina son seguras para la administración de fármaco y capaces del direccionamiento de fármacos anticancerígenos al tejido tumoral. Además, a diferencia de las nanopartículas obtenidas a partir de polímeros sintéticos, las NP- HSA mostraron ser bien toleradas *in vivo* y no presentaron efectos secundarios significativos (Irache y cols., 2011; Dreis y cols, 2007) lo cual fue confirmado mediante los resultados arrojados de los estudios clínicos del Abraxame[®] que fue el primer sistema nanométrico de ASH (conjugado polimérico) comercializado (Ibrahim y cols., 2002; Feinstein y cols., 1990).

El método de desolvatación ideado por Weber y cols. (2000), permitió la obtención de NP tras el agregado de un agente de desolvatación a una solución de ASH. En el presente trabajo, fue necesario la implementación de modificaciones en la metodología de obtención reportada previamente (Ghosh y cols., 2016; Rhaese y cols., 2003; Merodio y cols., 2002; Weber y cols., 2000) con la finalidad de simplificar el proceso y utilizar nuevos AE en reemplazo al glutaraldehído. La reacción de entrecruzamiento entre las NP de ASH y glutaraldehído fue estudiado anteriormente por otros autores (Rohiwal y cols., 2014; Migneault, 2004) y dicho proceso se origina por una reacción covalente entre los grupos aldehídos del glutaraldehído y los amino libres correspondientes a los residuos lisina de la ASH que quedan expuestos en la superficie de la NP. Por otro lado, si bien no hay reportes sobre la interacción entre la NP-ASH y los nuevos AE, por las estructuras químicas de los diferentes AE se postuló que el entrecruzamiento fue por reacciones del tipo puente de hidrogeno o hidrofóbicas. Esta teoría pudo confirmarse a partir de las investigaciones anteriores (Wu y cols., 2013; Kumar y cols., 2009) que indicaron que la interacción

entre el PEG y las proteínas fue a través de interacciones hidrofóbicas o puente de hidrógeno.

Posteriormente, el análisis de IR, como fue estudiado previamente por Bronze-Uhle y cols. (2017), permito determinar una modificación en las intensidades de las bandas amida I y II (características de la ASH nativa), lo cual significo una modificación en la estructura secundaria de la ASH al formar NP.

La estabilidad coloidal de los sistemas dependió del AE. Los nuevos AE mostraron mantener la estabilidad coloidal por 21 días en medio acuoso, excepto el PEG. Dicha inestabilidad de las NP- PEG fue a causa de la exposición del nanosistema en solución acuosa durante tiempos prolongados, hecho que favoreció la solubilización de las cadenas del polímero (Simón-Yarza y cols., 2013). Una alternativa para mejorar la estabilidad coloidal de las NP-PEG fue la liofilización de las NP luego de la obtención. Este proceso permitió conservar la estabilidad tanto química como física de la formulación durante períodos de tiempo prolongados (Carpenter y cols., 1997). Paralelamente, dicho proceso se aplicó en los demás sistemas nanométricos obtenidos, ya que aumentó considerablemente la vida útil de la formulación. Este aumento en la estabilidad de los nanosistemas fue estudiado previamente en el trabajo de investigación realizado por Ahton y cols. (2008). Adicionalmente el proceso de secado presenta la ventaja del fácil transporte y almacenamiento de las muestras (Lu y Pikal, 2004).

Las formulaciones oculares no deberían causar irritación ni daño ocular, lo cual se logró determinar fácilmente mediante la utilización del test de Draize modificado por Tartara y cols. (2009). Mediante este test se determinó que las NP-ASH con los diferentes AE no causaron irritación ni daño ocular superficial lo cual también fue reportado por otros autores que desarrollaron sistemas poliméricos para administración oftálmica (Yadav y cols, 2014; Pignatello y cols. 2002).

Al considerar seguros los sistemas para la administración oftálmica de fármacos, fue importante determinar la capacidad de las NP-ASH de permanecer en el sitio de administración, ya que poco se conoce acerca del comportamiento y

biodistribución *in vivo* ocular de estos sistemas. Para tal fin, se realizó el marcaje radiactivo de los sistemas nanométricos, lo cual permitió determinar la radioactividad de las NP-Gantrez y NP-PEG en la superficie ocular por 17h pos administración. Este fenómeno de mucoadhesión se logró explicar mediante lo reportado por Sosnik y cols. (2014). Dichos autores publicaron que el proceso de bioadhesión se encuentra favorecido en los sistemas nanométricos y que dicha unión perdura tiempos más prolongados en comparación con estructuras de mayor tamaño. Este comportamiento fue atribuido a la mayor superficie de contacto de las NP. En la figura 5.1 se esquematizó lo sucedido luego de la administración ocular de NP en la superficie ocular, observando que las NP que atraviesan la capa de moco quedan atrapadas o enredadas las cadenas de la mucina, generando un mayor tiempo de permanencia de la formulación en la zona pre corneal (círculos verdes).

El fenómeno de bioadhesión de las NP evaluadas fue favorecido también por las propiedades bioadhesivas de las AE, las cuales fueron previamente estudiadas por diferentes autores (Agüeros y cols., 2009; Krassimira y cols., 2005; Yoncheva y cols., 2005; Patel y cols., 2010; Peppas y cols., 1995).

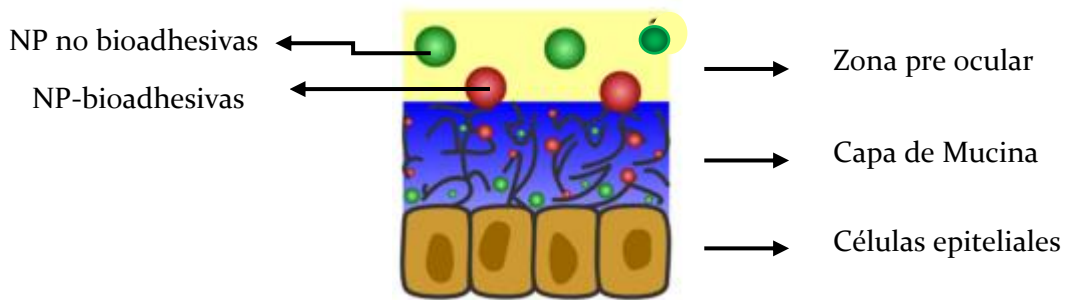


Figura 5.1. Esquema del proceso de bioadhesión de los NP con la capa de mucina (Extraído de Sosnik y cols, 2014).

Durante años la búsqueda de nuevos sistemas portadores de fármacos para el tratamiento de enfermedades oculares ha intentado aumentar el tiempo de permanencia de la formulación en la superficie ocular con la finalidad de aumentar la permeación de F a través de la córnea y disminuir la pérdida del F a circulación sistémica (Järvinen y cols., 1995). Por lo tanto, las nanopartículas

mostraron ser sistemas con gran capacidad de adhesión a la mucosa ocular lo que genero un aumento del tiempo de residencia de la formulación en el ojo. Esta característica de las NP permitiría una mayor biodisponibilidad ocular de los F respecto a los colirios.

6. CONCLUSIONES PARCIALES

Se obtuvieron nuevos sistemas nanométricos de ASH con potencialidad para la aplicación oftálmica. El proceso de coacervación permitió la obtención de las NP de forma fácil, reproducible y con baja polidispersidad.

Los sistemas presentaron valores de osmolaridad y pH en el rango adecuado para las formulaciones oftálmicas y, en los ensayos *in vivo*, las NP no causaron irritantes ni daño ocular superficial. Adicionalmente, los sistemas mostraron una alta permanencia en el sitio de aplicación.

En conclusión, las NP-ASH fueron sistemas con características prometedoras para la liberación prolongada de fármacos a nivel ocular.

Capítulo 3

NANOPARTÍCULAS DE ASH PARA LA VEHICULIZACIÓN DE MALEATO DE TIMOLOL

1 INTRODUCCIÓN

El glaucoma es una neuropatía óptica, crónica, progresiva que conduce a la ceguera. De hecho, es la principal causa de ceguera irreversible en el mundo (Lora y Andr, 2005) y, según la organización mundial de la salud (OMS), el número de personas con glaucoma es de 5,7 millones.

Esta patología comprende una serie de enfermedades oculares, de diferentes causas pero que tienen como común denominador el aumento de la presión intraocular (en adelante PIO) (Tártara y cols., 2008). La PIO elevada puede provocar un deterioro funcional progresivo e irrecuperable de las fibras nerviosas de la retina y por ende del nervio óptico, causando una constricción característica del campo visual.

La PIO está determinada por la relación entre la velocidad de producción del humor acuoso (en adelante HA) en el epitelio del cuerpo ciliar y la eliminación del mismo. Su principal vía de eliminación es a través de la vía trabecular, también llamada vía convencional, por la cual se evacua aproximadamente el 80 % del HA. La otra vía de drenaje, menos conocida, es la uveoescleral (Schmidl y cols., 2015).

En la figura 1.1 se puede observar un esquema de un corte anatómico del segmento anterior del ojo, donde se muestra la circulación normal del humor acuoso (amarillo), secretado por los procesos ciliares y su eliminación por el seno camerular (rojo).

La presión ocular tiene un valor promedio en la población de 16 mmHg con una desviación estándar de 2,5 mmHg, por lo que valores sobre 21 mmHg se consideran probablemente patológicos.

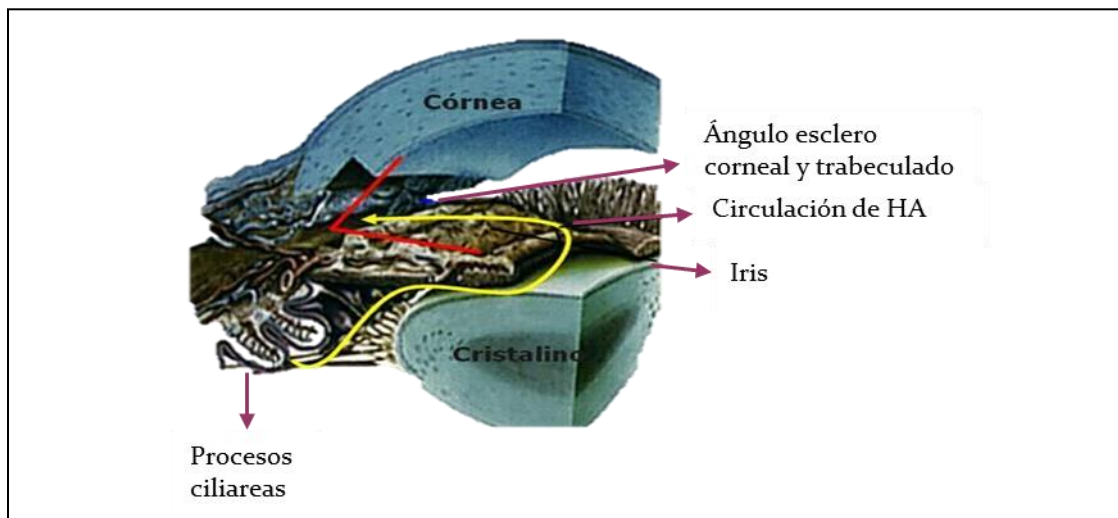


Figura 1.1. Esquema de un corte anatómico del segmento anterior del ojo, donde se observa la circulación normal del humor acuoso (amarillo), secretado por los procesos ciliares y su eliminación por el ángulo esclero-corneal (rojo) (Extraído de Tártara, 2013).

La etiopatogenia varía según las diferentes formas de glaucoma (Maul y Puente, 2011). El denominado **glaucoma de ángulo abierto primario (GAAP)** o **glaucoma crónico simple** es la forma más frecuente de glaucoma, llegando a representar el 60 % de los glaucomas, y es totalmente asintomático. Los pacientes pueden pasar años sin saber que tienen glaucoma a menos que se les realicen un examen para detectar la enfermedad. Por este motivo muchos enfermos se dan cuenta que algo afecta su visión cuando ya el campo visual se encuentra seriamente comprometido. Si bien es una enfermedad bilateral puede ocurrir que su evolución sea asimétrica. Los tratamientos farmacológicos están orientados a la disminución y el control de la PIO (Piñero y cols., 2005; Anhchuong y cols., 2003)

El objetivo del tratamiento del glaucoma consiste en la disminución de la PIO a valores normales para disminuir el riesgo de progresión del daño en el nervio óptico. El tratamiento tópico por instilación de fármacos hipotensores es la primera línea de elección y, de no ser efectivo el tratamiento farmacológico, es necesaria la utilización de terapia láser o quirúrgica.

Los fármacos utilizados cotidianamente en la clínica son: betabloqueantes tópicos (selectivos y no selectivos), inhibidores de la anhidrasa carbónica, agonistas alfa-2 y análogos de las prostaglandinas (Lavik y cols., 2011). La eficacia de estos sistemas depende de la farmacodinamia del medicamento hipotensor y la capacidad del fármaco de permear la córnea y llegar a su sitio de acción en tiempo y forma (farmacocinética). Es importante resaltar que, por los mecanismos normales del ojo (descritos en la introducción general), es bajo el porcentaje de fármaco que permea a través de córnea y en menor medida por esclera.

El maleato de timolol (TM) es un betabloqueante adrenérgico no selectivo de los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 . Este agente antiglaucomatoso produce disminución de la presión intraocular mediante una reducción de la producción de humor acuoso en el epitelio ciliar. Desde su aprobación en 1979 es utilizado en la clínica como primera línea para el tratamiento del glaucoma (Mohamed y cols., 2014).

Si bien el TM es de aplicación tópica ocular, debido a la pérdida de formulación por la vía nasolagrimal, son numerosos los efectos adversos a nivel sistémico que se pueden presentar tras su administración (Ofri y Narfström, 2007). Entre los efectos secundarios se puede citar la disminución en la presión sanguínea, disminución de pulso, fatiga y depresión, entre otros (Schmidl y cols., 2015). Es importante destacar que es un medicamento de administración crónica en la clínica, por lo tanto, es sumamente importante la disminución de dichos efectos secundarios. Por este motivo resulta interesante el desarrollo de nuevos sistemas portadores que presenten ventajas respecto la terapia actual disponible.

Uno de los desafíos del presente trabajo de tesis doctoral fue la obtención de nuevos sistemas portadores de TM vehiculizados en nanopartículas de albumina sérica humana. El objetivo fue aumentar el tiempo de permanencia de la formulación en el tejido ocular buscando: aumento de la permeación del fármaco en el tiempo, disminución del porcentaje de fármaco que se elimina por conducto nasolagrimal y reducción de la dosis administrada. Todos los factores detallados anteriormente conllevan a una reducción de los efectos adversos de los

fármacos a nivel sistémica y una menor frecuencia de administración (favoreciendo la adherencia al tratamiento). En la figura 1.2 se esquematizó los principales objetivos para los nuevos sistemas portados.

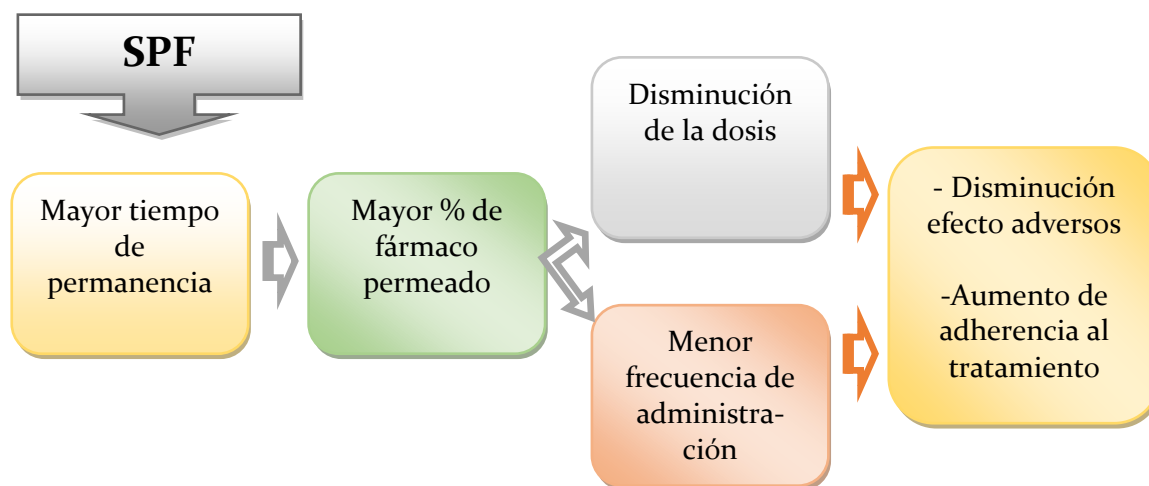


Figura 1.2. Objetivos planteados en el desarrollo de SPF.

Si bien el 90 % de las formulaciones oftálmicas de TM disponibles en el mercado son soluciones o suspensiones oculares (colirios) existen numerosas investigaciones relacionadas a nuevos SPF, incluyendo nanosuspensiones, liposomas, niosomas, dendrímeros, nanopartículas, insertos oculares, implantes, hidrogeles y profármacos. Los nuevos sistemas de administración de fármacos presentan numerosos beneficios respecto a las formulaciones convencionales, tales como: mejor biodisponibilidad, baja o nula toxicidad sistémica, perfil terapéutico superior y mayor adherencia al tratamiento por parte del paciente (Sah y Suresh, 2017; Wadhwa y cols., 2010,; Lavik y cols., 2011).

En el presente capítulo se obtuvieron NP de ASH con TM. Para tal fin se realizó la caracterización fisicoquímica y los estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de las NP obtenidas.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

2. MATERIALES

Para el diseño y elaboración de las NP-ASH se utilizó la ASH y las AE (glutaraldehído, Gantrez ES-425, Eudragit S100, ftalato de HPMC y PEG 35000) descriptos en los materiales del capítulo 2.

2.2. Fármacos: MALEATO DE TIMOLOL

El maletao de timolol ((S)-(-)-1-[tert-butylamino]-3- [(4-morpholino-1,2,5 -thiadiazol- 3 -yl)oxy]-2 -pro - panol, figura 2.2.1) utilizado en este trabajo fue adquirido en Parafarm® (Argentina).

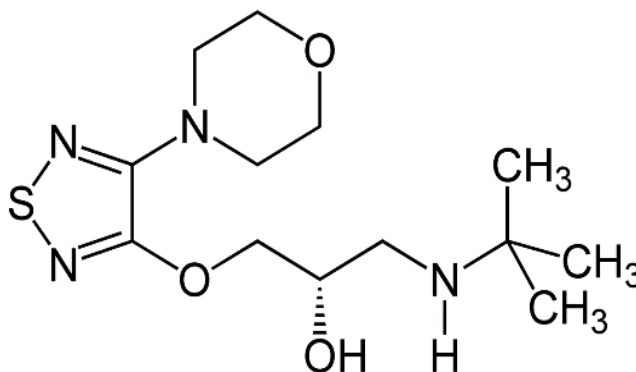


Figura 2.2.1. Estructura química del maleato de timolol

2.3. Animales: Modelo en conejos para el tratamiento del glaucoma

Se utilizaron conejos albinos tipo New Zealand de 1,8 a 3,0 kg (n=10). Se le proporcionó alimentos y agua a voluntad en un recinto con temperatura controlada. Los animales fueron expuestos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El procedimiento de manejo animal fue efectuado conforme a la ARVO (Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología), a European Communities Council Directive (86/609/CEE) resolución sobre el uso de animales en la investigación, y el Comité de ética de protocolos experimentales en el uso de animales en proyectos científicos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtención de nanopartículas de albumina sérica humana

Se utilizó el procedimiento descrito en metodología 3.1 del capítulo 2. La variante incorporada en este ensayo fue la incorporación de 5 mg de TM añadido a la solución inicial de ASH al 2 % p/v. Luego el procedimiento fue realizado tal como se ha descrito en el capítulo para la obtención de NP-ASH utilizando los nuevos AE y el glutaraldehído como AE de referencia.

3.2. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad y potencial zeta

Dicha metodología fue detallada en el capítulo 2 (metodología 3.2).

3.3. Rendimiento del proceso y rendimiento de encapsulación

Ambos parámetros fueron determinados según la metodología 3.5 y 3.6 del capítulo 2.

3.4. Capacidad de carga

La capacidad de carga(CC) es el porcentaje de TM vehiculado en la NP y la determinación fue realizada por dos metodologías diferentes: I) análisis por espectroscopia ultra violeta visible y II) cromatografía líquida de alta resolución

La espectroscopia UV-Visible se utilizó para la cuantificación de TM mediante la técnica directa por desnaturalización de las NP con una solución de NaOH 0,005 M. Las muestras desnaturalizadas fueron filtradas a través de tubos AMICON® con filtro 10 kDa. El filtro retuvo la ASH mientras que el fármaco fue filtrado, permitiendo la cuantificación de TM sin la interferencia de la ASH.

La técnica HPLC (explicada a continuación) fue validada para la determinación conjunta de TM y ASH. Esta técnica se utilizó como control para

la determinación de ASH y TM en el sobrenadante obtenido luego del proceso de purificación de las NP-ASH.

Mediante la ec. 1 se calculó del porcentaje de TM en las NP y la ec. 2 permite la cuantificación de TM en el sobrenadante.

$$\text{ec. 1} \quad \%CC = (C_{\text{final}}/C_{\text{inicial}}) \times 100$$

$$\text{ec. 2} \quad \%CC = [(C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}}) \times 100] / C_{\text{inicial}}$$

Donde la C_{final} , es la concentración de TM cuantificada en las NP, las C_{inicial} es la cantidad de TM pesado inicialmente y CC es capacidad de carga.

3.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El equipo utilizado fue HPLC WATERS con bomba binaria (Waters 1525 pump) con inyector automático (Waters 717 plus autosampler), horno termostático para columnas (Waters 1500 series column heater) y detector UV con arreglo de diodos Waters 2996 (PDA) (Waters Corp., Milford, USA). La longitud de onda seleccionada fue 276 nm para la detección de los analitos.

Los datos fueron recopilados y analizados a través del Empower Software®.

La columna utilizada fue una columna de fase reversa Luna C18 (250 x 4,60 mm, Phenomenex) de 10 µm de tamaño de poro con una pre-columna de seguridad.

Para el desarrollo de la técnica de HPLC la fase móvil utilizada fue una mezcla de acetonitrilo: ácido trifluoroacético 0,05 % en agua en una proporción 60:40. El flujo isocrático de la corrida fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de 20 microlitros, a una temperatura de 25 °C. La fase móvil fue filtrada a través de filtros 0,45 µm Millipore Durapore® filtro y desgasificadas mediante una bomba de vacío.

Desarrollo y validación de la técnica de determinación de albumina sérica humana y maleato de timolol por HPLC

Para la determinación de ASH y TM (en forma conjunta o por separado), se desarrolló y validó una nueva técnica de HPLC, la cual no estaba descripta anteriormente en bibliografía (Boiero y cols., 2015).

La validación fue realizada según los lineamientos de la *International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use* (ICH según sus siglas en inglés) y de Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA según sus siglas en inglés).

Preparación de las soluciones madres y estándares de calibración

Las soluciones madres de ASH y TM fueron preparadas pesando 100 mg de ASH y 50 mg de TM, los cuales se disolvieron en 50 mL de agua. A partir de estas soluciones se realizaron las curvas de calibrado a partir de diluciones seriadas de la solución madre usando agua purificadas. Las concentraciones utilizadas para las curvas de calibrado fueron de 0,2- 1- 2,5-10- 15- 20 mg/mL de ASH y 0,01- 0,05- 0,1- 0,3- 0,6 y 1 mg/mL de TM.

Parámetros de Validación

Curva de Calibrado

La curva de calibrado se realizó por triplicado utilizando 6 concentraciones diferentes de ASH y de TM, preparadas a partir de la solución madre de cada analito. Cada curva de calibrado fue obtenida por triplicado, realizándose curvas inter e intra día. Las curvas se obtuvieron por análisis de regresión lineal de las áreas de los picos de los analitos en función de la concentración. A partir de cada curva se calculó el coeficiente de correlación (r^2) y la desviación estándar relativa (RSD %) del factor de respuesta para cada estándar. La linealidad de las curvas se determinó graficando las concentraciones interpoladas en función de las concentraciones reales de las muestras.

Límite de cuantificación inferior

Es la menor concentración del analito que puede ser cuantificada con una desviación de la concentración real menor a un 20 %. Este parámetro se determinó a partir de la curva de calibrado.

Precisión y exactitud

La determinación de ambos parámetros fue por análisis repetido de las soluciones de concentraciones conocidas de cada analito. Los ensayos se realizaron intra día e inter día a distintos niveles de concentración (alto, medio y bajo) de cada curva de calibrado. Las tres concentraciones seleccionadas fueron: 0,2- 10 y 20 mg/mL y 0,01- 0,3 y 1 mg/mL para ASH y TM respectivamente, las cuales se prepararon a partir de una solución madre.

Selectividad

Se determinó la selectividad del método para identificar y cuantificar de forma inequívoca de cada analito en una muestra ASH y TM.

En las **tablas 3.4.1.1. y 3.4.1.2** se detalla los valores obtenidos de estos parámetros.

Tabla 3.4.1.1. Resultados del análisis de regresión lineal de las curvas obtenidas por HPLC de ASH y TM.

ALBUMINA SERICA HUMANA				
y = bx + a	C₁*	C₂*	C₃*	Media ± SD
Ordenada al origen (a)	-16461	-21229	-35161	$(-24 \pm 9)10^3$
Pendiente (b)	681906	690466	674677	$(68 \pm 9)10^4$
Coefficiente de correlación (r²)	0,9994	0,9974	0,9999	$0,999 \pm 0,001$
MALEATO DE TIMOLOL				
y = bx + a	C₁*	C₂*	C₃*	Media ± SD
Ordenada al origen (a)	-3108	-8796	-4455	$(-35 \pm 8)10^2$
Pendiente (b)	12100000	12600000	12600000	$(12 \pm 1) 10^6$
Coefficiente de correlación (r²)	0,9999	0,9999	0,9996	$0,9998 \pm 0,0002$

*Réplicas de la curva de calibrado. SD: desviación estándar

Tabla 3.4.1.2. Precisión y Exactitud de la metodología HPLC para determinación de TM y ASH.

Concentración nominal (mg/mL)	Concentración calculada (mg/mL)	Precisión (%)	Exactitud (%)	N
Día 1				
ASH				
0,2	0,196 ± 0,002	1,27	98,00	3
10	10,0 ± 0,4	3,72	100,30	3
20	20,2 ± 0,2	1,09	101,02	3
ASH + (TM 0,497mg/mL)				
0,2	0,198 ± 0,002	1,01	99,00	3
10	10,12 ± 0,09	0,86	101,20	3
20	20,10 ± 0,30	1,34	100,75	3
TM				
0,01	0,0102 ± 0,0002	1,02	102,00	3
0,3	0,29 ± 0,01	0,67	99,33	3
1	0,99 ± 0,01	1,50	99,30	3
TM (HSA 10 mg/mL)				
0,01	0,0101 ± 0,0003	2,90	101,00	2
0,3	0,30 ± 0,01	0,66	100,70	2
1	1,05 ± 0,01	1,9	100,50	2
Día 2				
ASH				
0,2	0,199 ± 0,006	3,00	99,50	3
10	9,9 ± 0,2	1,70	98,80	3
20	19,9 ± 0,4	2,20	99,45	3
TM				
0,01	0,0102 ± 0,0001	0,68	102,00	3
0,3	0,29 ± 0,01	0,33	99,33	3
1	1,01 ± 0,01	1,20	100,70	3

n: número de réplicas.

3.5. Ensayos de liberación *in vitro* de maleato de timolol

Los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron la por técnica de diálisis utilizando membranas de 12 kDa de celulosa (Sigma Spectral/pro membrana, Sigma, Argentina).

Para el ensayo se redispersaron 150 mg de nanopartículas en 1 mL de solución amortiguadora de fosfato salino (PBS, pH: 7,4) y se colocaron dentro de la membrana de diálisis (medio donador) la cual fue atada en forma de saco con ambos extremos cerrados herméticamente (figura 3.5.1). La membrana se colocó en un medio receptor conteniendo una PBS en un baño termostaticado a 37 °C con agitación constante (100 rpm). A intervalos de tiempo apropiados durante 2 h se tomaron alícuotas de 1 mL del medio receptor y se reemplazaron con 1 mL de medio fresco. La cuantificación de TM se realizó por espectroscopia U.V- Visible.

Los ensayos de liberación fueron realizados en los diferentes sistemas nanométricos, la formulación comercial de TM (Zopirol 0,5 %®, laboratorio Elea) y una solución de TM al 0,1 % (STM 0,1 %, misma concentración de TM que en las NP).

Cada ensayo fue realizado por triplicado manteniendo las condiciones de sumidero (sink, siglas en inglés) es decir asegurando que la concentración final del fármaco en el medio receptor sea inferior al 10 % de la concentración de saturación del mismo o, lo que es equivalente, inferior al 10 % de su solubilidad durante todo el periodo analizado (USP31-NF26, 2008).



Figura 3.5.1. Sistemas de diálisis utilizado para el ensayo de liberación *in vitro* de las NP-ASH con TM.

Posteriormente, los datos de liberación fueron analizados acorde con el modelo matemático semiempírico desarrollado por Korsmeyer cols. (1983), a partir del cual la velocidad de liberación de un fármaco desde sistemas poliméricos puede calcularse por la siguiente ecuación:

$$\text{ec. 1} \quad F_t / F_\infty = k_l \cdot t^n$$

Donde F_t y F_∞ representan la fracción de fármaco liberado en un determinado tiempo t y la cantidad total contenida en el sistema, respectivamente, k_l es la constante de liberación aparente y n el exponente de difusión.

A partir del cálculo del coeficiente n (Lee, 1985; Korsmeyer y cols., 1983) se realizó una aproximación de los mecanismos de liberación que operan durante el proceso. Este modelo (desarrollado para matrices poliméricas) propone:

(a) que si $n=1$ la velocidad de liberación es constante en el tiempo, por lo tanto, la cinética de liberación es de orden cero y el paso limitante para la liberación sería la relajación de las cadenas del polímero;

(b) si el valor de $n=0,5$ (o se halla entre 0,45 y 0,55), la velocidad de liberación se aproxima o es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo siguiendo una cinética fickiana, donde la liberación estaría controlada por la difusión de fármaco a través de la matriz y,

(c) si $n: 0,55 < n < 1$ la velocidad de liberación va depender de los procesos de difusión y relajación, conociéndose como liberación no fickiana o anómala (Costa y Sousa Lobo, 2001).

El análisis de los perfiles de liberación del fármaco se realizó utilizando el software científico 2.0 (Micromath, EE.UU.). La selección del modelo se basó en el mejor coeficiente de correlación y los mejores criterios de selección, ambos proporcionados por el software.

3.6. Ensayo *ex vivo* de permeación trascorneal

Para la cuantificación de la cantidad de fármaco permeado a través de la córnea se utilizaron celdas bicompartimentales (Palma y cols., 2009) (figura 3.6.1). La misma consiste en un compartimento con el medio donador con la formulación a estudiar y otro con el medio receptor (4 mL de una solución de NaCl 0,9 %). El ensayo se realizó a temperatura controlada ($35,0 \pm 0,5$) °C, con

constante oxigenación y burbujeo (mezcla de 95 % O₂ y 5 % de CO₂), a fin de mantener la viabilidad de la córnea.

Para la extracción de la córnea los animales fueron sedados con una mezcla de ketamina 0,8 ml/kg (Ketafine® de laboratorio Brouwer) y xilacina 2 % 0,1 mL/kg (Kensol® de laboratorio Konig) previo a la eutanasia. Luego se colocaron los conejos en una campana de acrílico herméticamente cerrada con 90 % CO₂ y 10 % O₂. Una vez muerto el animal, se extrajeron las córneas con un remanente escleral de 2 mm y se colocaron en las celdas con el epitelio corneal hacia el medio donador.

A tiempos establecidos se extrajo 1 mL de muestra del medio receptor y se lo reemplazó por la misma cantidad de NaCl fresco. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se mantuvieron las condiciones de sink. La cuantificación de TM se realizó utilizando la técnica HPLC mencionada en el ítem 3.4.1.

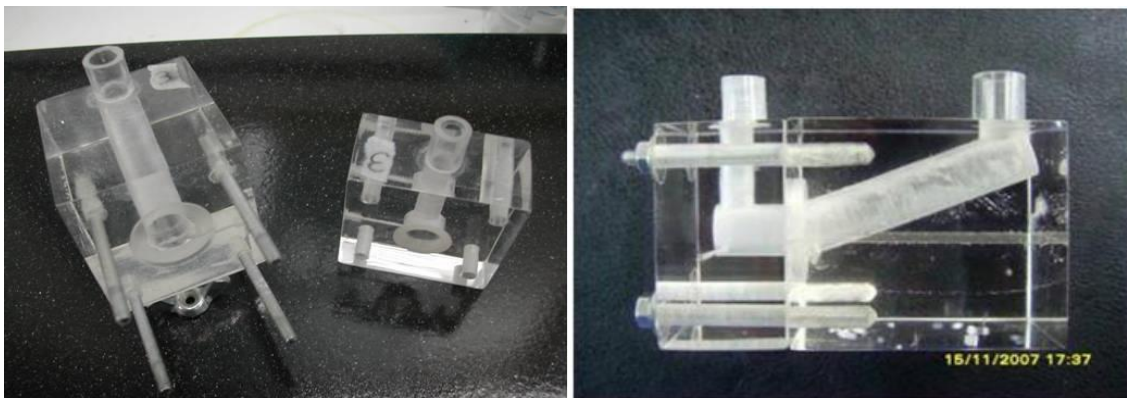


Figura 3.6.1. Fotografías de una celda bicompartimental. A la izquierda se puede observar la celda desmontada con sus dos compartimentos, y a la derecha la celda ensamblada.

Luego de la cuantificación se realizó un análisis de regresión lineal de los datos de difusión obtenidos. Los parámetros calculados fueron:

- ✚ **Flujo(J):** $\Delta Q / \Delta t$. Donde Q es la cantidad de TM difundido a través de la córnea en el tiempo (t).
- ✚ **Coefficiente de permeabilidad aparente: (Papp):** J / C_i . Donde C_i es la concentración inicial del fármaco en el medio donador.

- ✚ **Tiempo de latencia** para la permeación del fármaco. Es el tiempo necesario para que el fármaco puede saturar la córnea y alcanzar el compartimento receptor. Corresponde al primer valor de TM cuantificado durante el ensayo.

3.7. Estudios *in vivo* de farmacocinética

El objetivo de este ensayo fue estudiar la presencia de TM en humor acuoso luego de la administración de la formulación. Para tal finalidad, se realizaron diferentes pasos los cuales serán detallados a continuación.

- ✚ **Extracción de humor acuoso**

Para el ensayo se utilizaron conejos albinos New Zealand (2,5 kg) y el volumen de extracción de humor acuoso (HA) fue de 150 μ L utilizando jeringas de 1 mL de capacidad (sin volumen muerto). Antes de realizar la extracción, se colocó un blefarostato infantil (para mantener los párpados abiertos durante el ensayo) y se administró, en cada ojo, 50 μ L de una solución al 0,5 % de HCl proparacaína (anestésico tópico, POEN-CAINA®, laboratorio POEN). Una vez finalizada la extracción, a modo profiláctico, se colocaron 50 μ L de antibiótico en el ojo afectado (Moosa y cols., 2014).

El esquema de extracción de HA fue el siguiente: 0- 0,5-1- 2- 3- 4- 6 y 8 h pos administración de las diferentes formulaciones de NP, de la formulación comercial y de una solución de TM al 0,1 % (STM 0,1 %).

El ensayo fue realizado por triplicado para cada formulación estudiada y las muestras de HA fueron conservadas a -5°C hasta su cuantificación por HPLC.

- ✚ **Desproteización del humor acuoso y cuantificación de TM en HA**

La cuantificación de TM en humor acuoso fue realizada mediante técnica de HPLC correspondiente y las muestras a inyectar fueron previamente desproteinizadas. Para la desproteización se añadió 100 μ L de metanol a 150 μ L de HA, la mezcla fue agitada y centrifugada a 8000 rpm durante 10 min. Luego se

separó el sobrenadante del precipitado (proteínas) y el sobrenadante fue analizado utilizando la técnica de HPLC modificada a partir de la técnica descrita en el punto 3.4.1. Se modificó la fase móvil, con el fin aumentar el tiempo de retención del analito en la columna y la temperatura del horno fue de 45 °C. La fase móvil utilizada fue una mezcla de trietilamina al 0,1 % pH: 2,72 y acetonitrilo (80:20) con un flujo de 1 mL/min. Las demás condiciones se mantuvieron constantes. El tiempo de retención del analito con las condiciones de estudio fue de 6,4 minutos (Nasir y cols., 2011).

Análisis farmacocinético

Las curvas de concentración en función del tiempo obtenidas, así como los parámetros farmacocinéticos fueron determinados empleado el modelo no compartimental. Los picos de concentración máxima (C_{max}) de cada muestra fueron leídos directamente de la curva. El área bajo la curva (AUC) desde cero hasta el último tiempo de muestreo con una concentración medible fue calculado según la regla del trapecioide (Gibaldi y Perrier, 1982). Los parámetros farmacocinéticos promedios de TM obtenidos luego de la administración tópica de la forma comercial, STM 0,1 % o vehiculizado en NP fueron comparados estadísticamente usando el test de *t-student*. Se empleó una transformación logarítmica donde se encontraron diferencias significativas entre las desviaciones estándares. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

3.8. Ensayos de farmacodinamia: MEDICIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR

En conejos adultos el valor medio de PIO es de 16 mmHg y puede medirse fácilmente con el uso de un tonómetro veterinario. Para el ensayo se utilizó un Tonometro Tonovet ICARE®.

Días previos al tratamiento se inició la ambientación de los animales mediante manipulación de los mismos en el animalario.

Cada ensayo fue realizado en grupos de seis animales (12 ojos), a los cuales se les administraron 50 µL de las formulaciones en estudio en cada ojo. Las

mediciones tonométricas se realizaron en los tiempos 0- 0,5- 1-2- 4- 6- 8 h y el valor de PIO a tiempos cero se estableció 15 min. antes del tratamiento. Todas las mediciones se realizaron en el mismo momento del día, por triplicado, tomándose la media como dato final.

Los resultados de cada formulación fueron comparados con: I) una formulación comercial de TM (POENTIMOL 0,5 %, laboratorio POEN), II) una solución al 0,1 % de TM (STM 0,1 %), III) NP vacías(NP-ASH) y IV) la PIO basal (obtenida tras la administración de solución salina).

Los datos estadísticos de los perfiles de disminución de PIO fueron evaluados mediante una prueba *t-student* con inferencia en dos variables. Los resultados se tomaron como significativamente diferentes en $p < 0,05$.

Por otro lado, la determinación del porcentaje de descenso máximo de PIO de cada muestra fueron leídos directamente de la curva y la PIO mínima correspondió al mínimo valor de PIO obtenido de las mediciones. El área bajo la curva (AUC) desde cero hasta el último tiempo de muestreo fue calculado según la regla del trapecoide (Gibaldi y Perrier, 1982). Todos los parámetros promedios obtenidos fueron comparados estadísticamente usando el test de *t-student*. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1. Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta

A partir del proceso de desolvatación se obtuvieron NP-ASH para la vehiculización de TM con los diferentes agentes entrecruzantes (AE). Como se mostró en la tabla 4.1.2 todos los nanosistemas fueron nanométricos, monodispersos con PZ negativos. Dichos valores fueron similares a los valores de los NP sin fármaco, lo cual confirma que el TM no interfiere en el proceso de

entrecruzamiento (ya que no posee grupos reactivos) y se encontró encapsulado en las NP (Arnedo y cols., 2002).

Tabla 4.1.1. TMI, IP y PZ de los nanosistemas con TM y de los nanosistemas sin fármaco formulados con los diferentes AE.

Formulación	TMP (nm)	IP	PZ
NP-TM			-10
NP- GLUT	163 ± 2	0,17 ± 0,01	-26 ± 1
NP- GLUT -TM	179 ± 9	0,18 ± 0,02	-28 ± 1
NP -GANTREZ	231 ± 2	0,14 ± 0,02	-21 ± 2
NP-GANTREZ- TM	255 ± 3	0,13 ± 0,01	-27 ± 9
NP-EUD S100	269 ± 2	0,13 ± 0,02	-21 ± 1
NP -EUDS100-TM	270 ± 4	0,14 ± 0,09	-26 ± 1
NP-PEG	207 ± 1	0,11 ± 0,01	-26±1
NP -PEG-TM	190 ± 1	0,19 ± 0,01	-23 ± 3
NP-HPMCF	376 ± 1	0,17 ± 0,01	-17 ± 1
NP -HPMCF-TM	285 ± 1	0,19 ± 0,02	-26 ± 1

Por último, las fotografías realizadas por MEB fueron similares a las fotografías de los sistemas sin fármaco, con presencia de pequeños agregados y las imágenes también son similares a las reportados en otros trabajos de NP-ASH con glutaraldehído como AE (Sebak y cols., 2010) donde se reportó que los sistemas son esféricos.

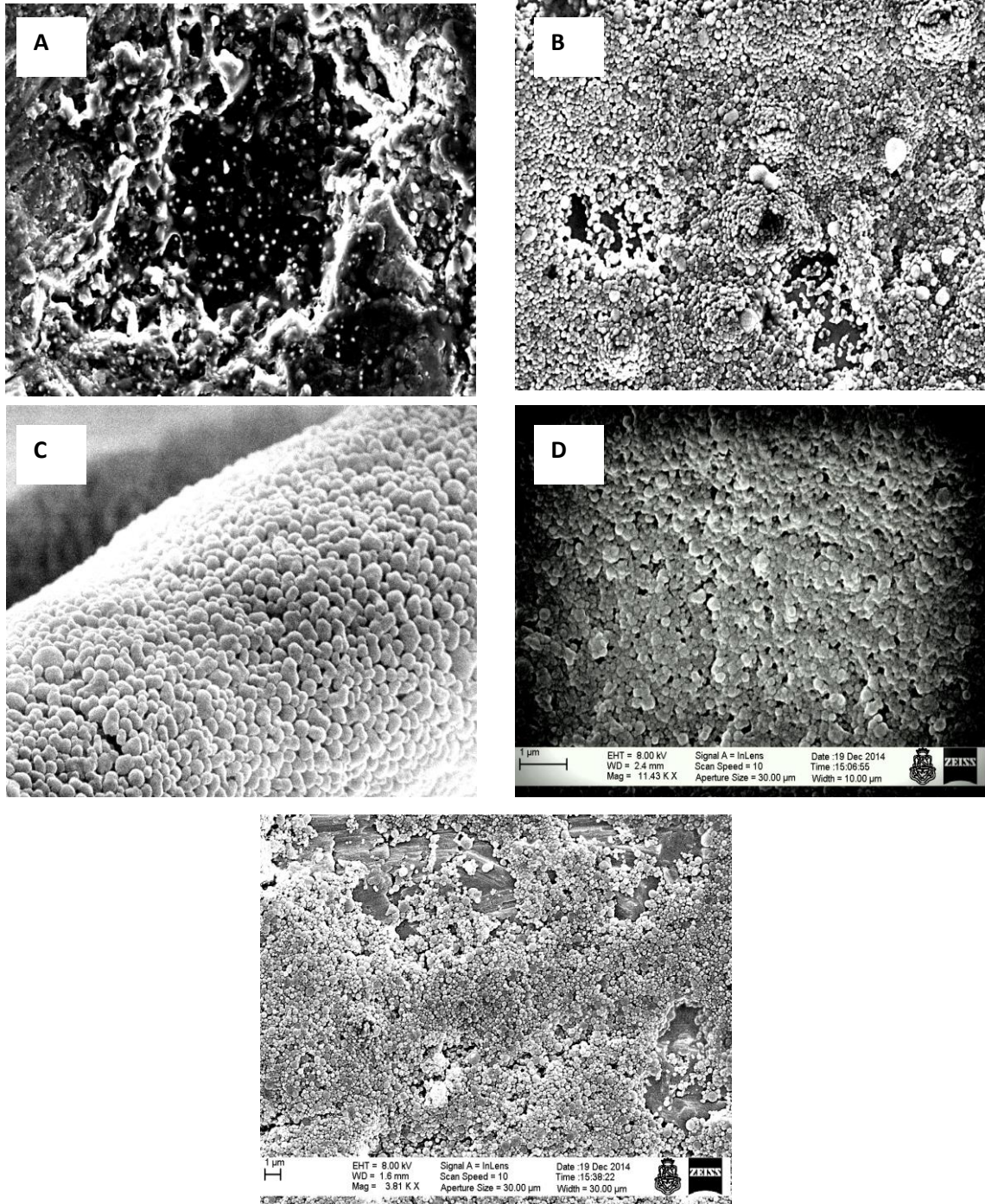


Figura 4.1.5. Microfotografía obtenida por MEB de: A) NP-GLUT-TM; B) NP-GANTREZ-TM; C) NP-JDS100-TM; D) NP-HPMCF-TM; E) NP-PEG-TM.

4.2. Rendimiento del proceso, rendimiento de encapsulación y capacidad de carga

Analizando la tabla 4.2.1 se observó que los rendimientos son relativamente altos, tanto del proceso como el de encapsulación, y similares a los encontrados previamente en bibliografía (Costa y cols., 2017).

Respecto la CC como reporto Merodio y cols. (2001) el agregado del fármaco en la solución inicial de ASH es la metodología que mejores resultados de CC arroja para fármacos solubles, razón por la cual se eligió dicho procedimiento. A partir de los valores de CC se observó una relación entre el porcentaje de TM encapsulado y el RE, ya que los sistemas con mayor RE fueron los que mayor porcentaje de TM encapsularon, siendo el máximo porcentaje encapsulado de TM del 40 % en los NP-GANTREZ.

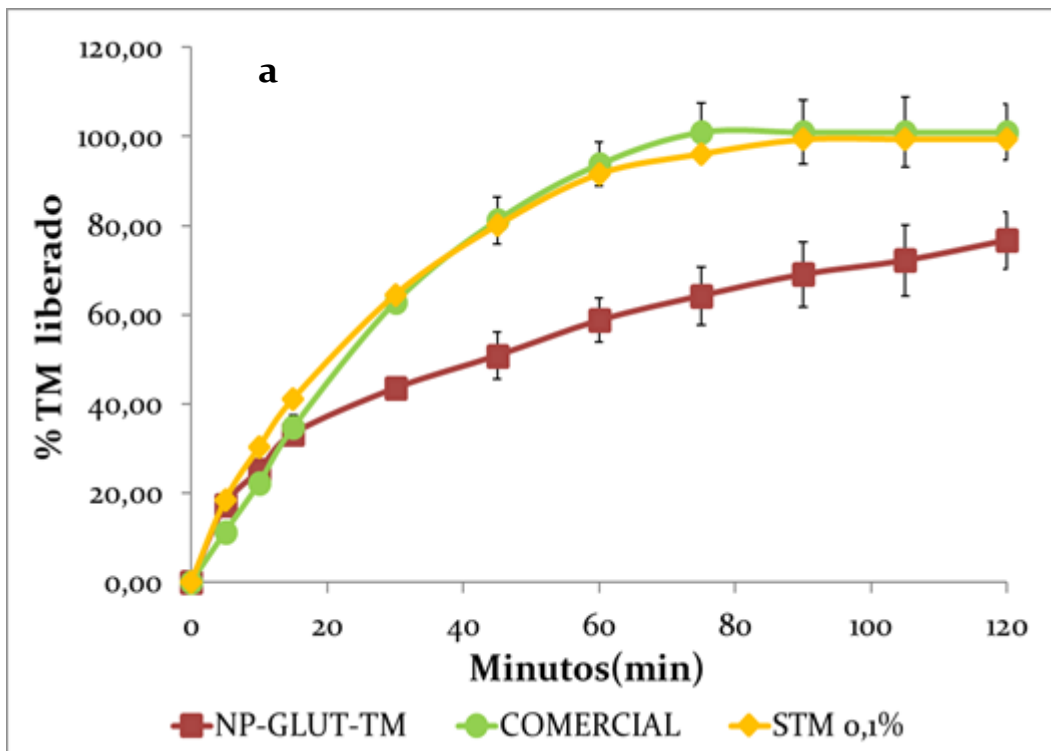
Tabla 4.2.1. Rendimiento del proceso (RP)total de obtención de NP, rendimiento de encapsulación (RP) proteínico y carga del fármaco o capacidad de carga (CC).

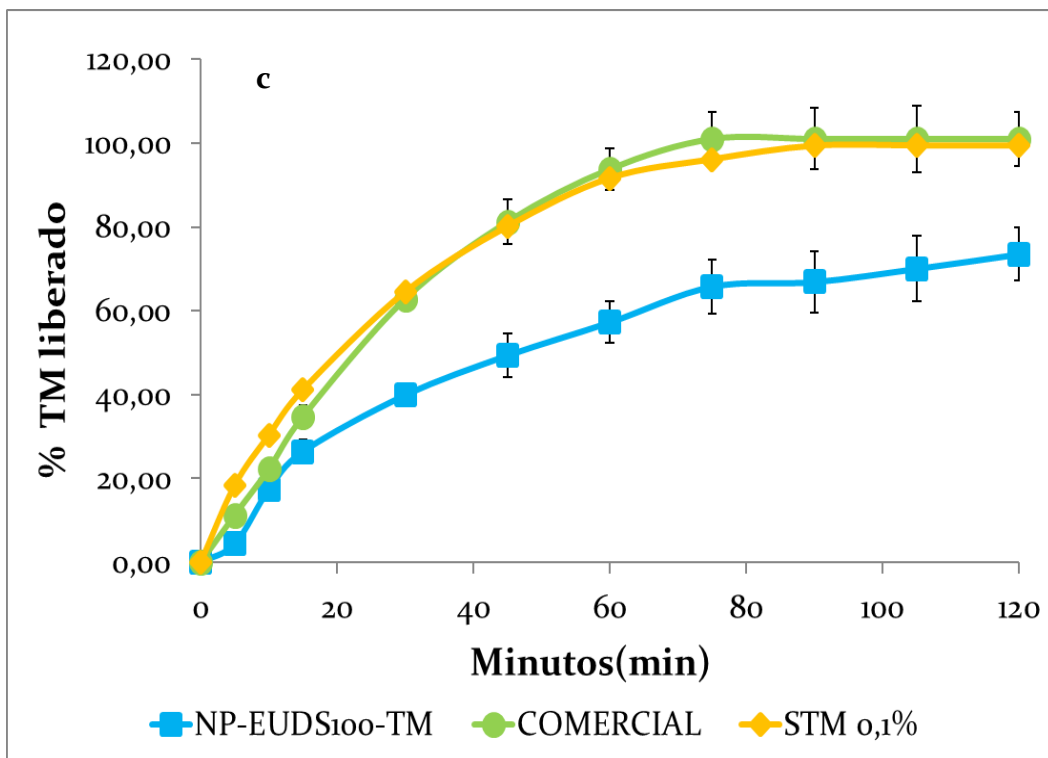
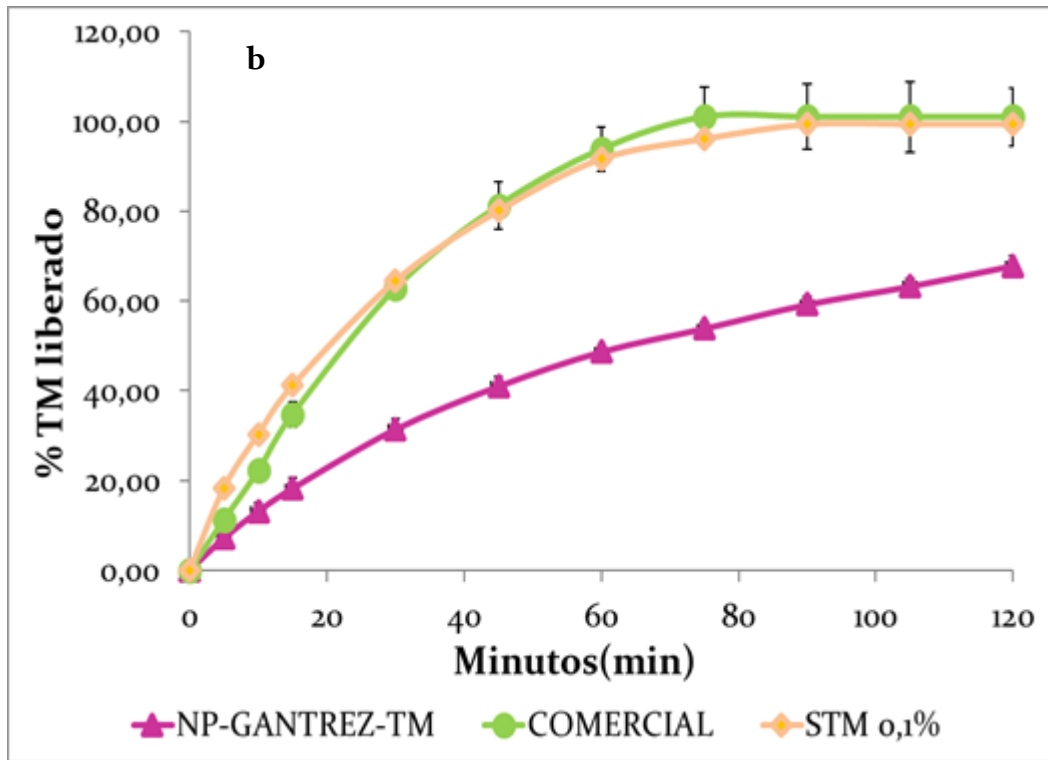
Formulación	RP (%)	RE (%)	CC
NP-GLUT-TM	87 ± 4	74 ± 13	24 ± 5
NP-GANTREZ-TM	91 ± 2	93 ± 5	40 ± 7
NP-EUD-TM	89 ± 2	82 ± 14	38 ± 4
NP-HPMCF-TM	78 ± 1	71 ± 5	17 ± 4
NP-PEG-TM	65 ± 2	70 ± 11	15 ± 3

4.3. Ensayos de liberación *in vitro* de maleato de timolol

En la literatura se han descriptos patrones de liberaciones bifásico para los sistemas de NP-ASH entrecruzadas con glutaraldehído (Maghsoudi y cols. 2008; Jain y cols., 2008; Das y cols, 2005; Merodio y cols.,2001). Dicho comportamiento consiste en una liberación del fármaco rápido en las primeras horas de ensayo y luego se mantiene el porcentaje liberado en el tiempo, hecho que le confiere al sistema una capacidad de regular la liberación de los F.

El ensayo de liberación de las NP-ASH con TM se realizó durante dos horas, mostrando una modulación en la liberación de TM en todos los sistemas nanométricos con los nuevos AE, excepto las NP con PEG como AE. En la figura 4.3.1 se pueden observar los diferentes perfiles de liberación de TM desde los sistemas nanoparticulados (**a**: NP-GLUT -TM vs. FC y STM 0,1 %; **b**: NP-GANTREZ-TM vs. FC y STM 0,1 %; **c**: NP-EUDS₁₀₀-TM vs. FC y STM 0,1 %; **d**: NP-HPMCF- TM vs. FC y STM 0,1 %; **e**: NP-PEG -TM vs. FC y STM 0,1 %). En las figuras se graficó el promedio de las tres mediciones de la contracción de TM indicando la desviación estándar en función del tiempo.





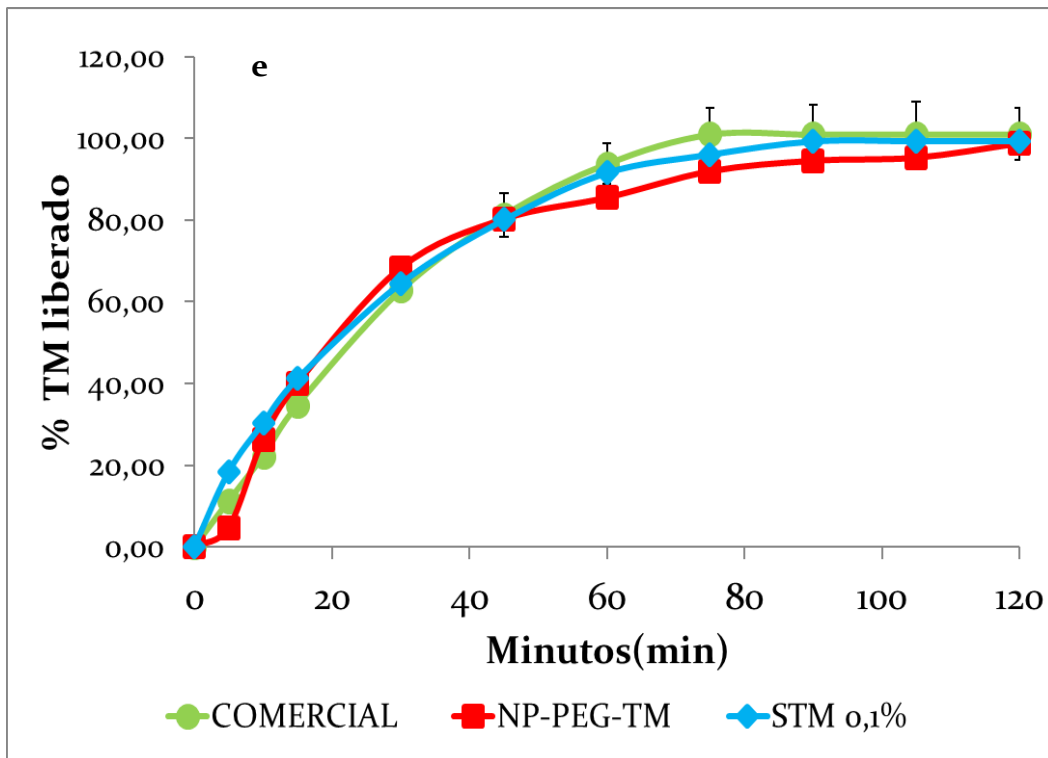
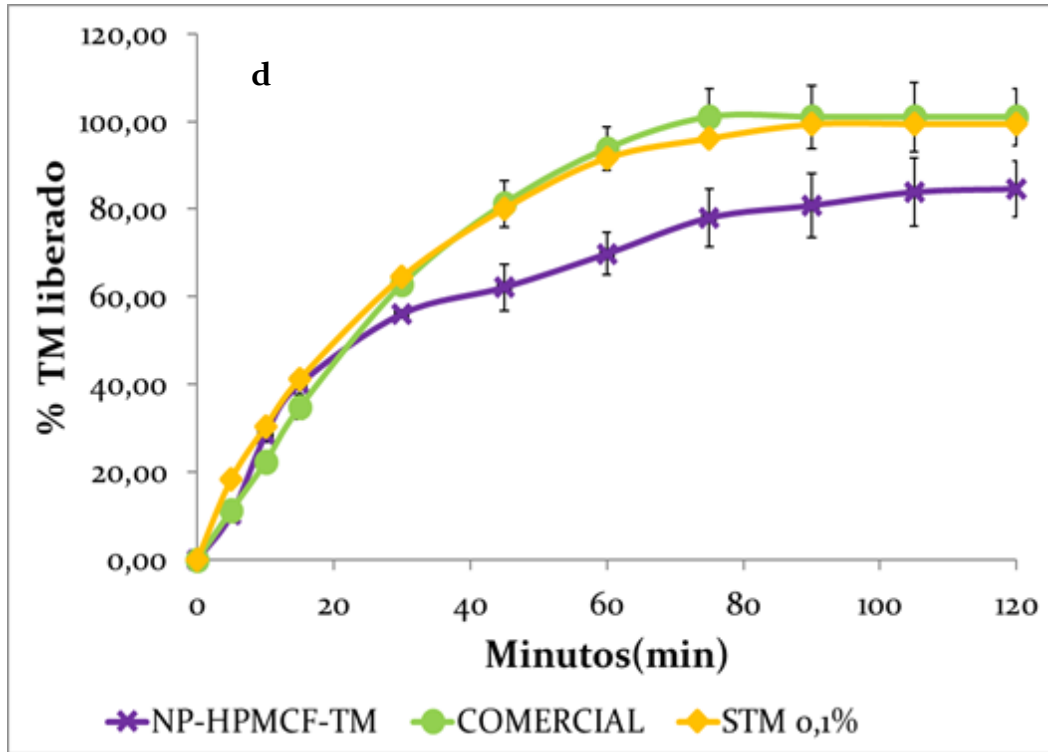


Figura 4.3.1. Porcentajes de TM liberado en función del tiempo desde las nanosistemas, la FC y la STM 0,1 % (min.).

A partir de los perfiles de liberación se observó que el TM se liberó en su totalidad desde la FC y la STM 0,1 % durante el ensayo y dicho comportamiento fue similar en las NP-PEG-TM. Por el contrario, las NP-GLUT-TM, NP-GANTREZ-TM, NP-EDU-TM y NP-HPMCF-TM el fármaco liberado fue de aprox. el 70 % durante las 2h de ensayo. La diferencia en los perfiles de liberación de las NP-PEG-TM respecto los otros nanosistemas fue por causa de la baja estabilidad coloidal de las NP-PEG en medio acuoso (Simón-Yarza y cols., 2013).

Posteriormente se realizó el análisis de los datos mediante el modelo matemático de Korsmeyer y cols. (1983) el cual permitió realizar una aproximación de los mecanismos por los cuales fue liberado el TM desde los sistemas nanométricos. En la Tabla 4.3.2 se mostraron los datos obtenidos del análisis matemático:

Tabla 4.3.1: Datos de la cinética de liberación según el modelo matemático de Kosmeyer y Peppas.

	KOSMESYER y PEPPAS		
	K	N	R ²
NP-GLUT-TM	9,1 ± 0,6	0,41 ± 0,02	0,99
NP-GANTREZ-TM	3,5 ± 0,4	0,42 ± 0,06	0,99
NP-EUDS ₁₀₀ -TM	5,5 ± 0,9	0,54 ± 0,04	0,98
NP-HPMCF-TM	8 ± 4	0,54 ± 0,02	0,93
NP-PEG-TM	1,4 ± 0,9	1,1 ± 0,1	0,98

Según los valores de la tabla, en los sistemas NP-GLUT-TM, NP-GANTREZ-TM, NP-HPMCF-TM y NP-EDUS₁₀₀-TM la liberación del TM fue por difusión a través de la red polimérica. Este comportamiento fue observado por otros autores para la liberación de fármacos desde diferentes sistemas poliméricos (Thakkar y cols., 2005; Ramaiah y cols., 2016), considerándose la difusión través de la matriz el paso limitante para la liberación del fármaco. Por otro lado, las NP-PEG presentaron una cinética de orden cero donde la liberación se daría por la relajación y erosión parcial de las cadenas poliméricas.

4.4. Ensayos *ex vivo* de permeación tras corneal

La córnea es la principal barrera para la absorción del fármaco en la superficie corneal (Quinteros y cols., 2016), por lo tanto, el ensayo tras corneal permitió comprobar si los sistemas nanométricos favorecen o no la permeación a través de dicha barrera respecto a la FC y la STM 0,1 %.

En la tabla 4.4.1 se presentaron los datos obtenidos de las permeaciones realizadas con los diferentes sistemas, expresando el promedio de cada parámetro con la desviación estándar de cada valor.

Tabla 4.4.1. Datos de permeaciones tras corneal de los sistemas nanométricos, FC y la STM 0,1 %.

FORMULACION	$\mu\text{g TM}$ 2h	Flujo	P_{app} ($\times 10^{-3}$)	Tiempo de latencia
FC	89 ± 23	$1,64 \pm 0,25$	$0,38 \pm 0,06$	10
STM 0,1 %	15 ± 2	$0,20 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,17$	15
NP-GLUT-TM	$4,2 \pm 0,1$	$0,020 \pm 0,007$	$0,050 \pm 0,002$	15
NP-GANTREZ-TM	10 ± 1	$0,14 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,06$	15
NP-EUDS ₁₀₀ -TM	$4,6 \pm 0,7$	$0,11 \pm 0,024$	$0,37 \pm 0,08$	15
NP-HPMCF-TM	$10,9 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,01$	$0,84 \pm 0,02$	15
NP-PEG-TM	6 ± 1	$0,17 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,02$	5

La FC fue el sistema que mostró mayor permeación de TM a través de la córnea y mayor flujo de permeación, hecho que se relacionó con la concentración inicial de TM en dichos sistemas, la cual fue 5 veces mayor respecto a las NP. En relación al coeficiente de P_{app} , dicha valor fue similar, incluso mayor para algunos sistemas nanométricos respecto al FC y la STM 0,1 %, lo cual indicó que los nanosistemas fueron promotores de la absorción (excepto las NP-Glut-TM).

Las NP-Glut-TM fueron descartadas para los ensayos *in vivo* de farmacocinética, ya que no mostraron ser sistemas promotores de la absorción del TM.

4.5. Ensayo de farmacocinética

La biodisponibilidad de un fármaco indica la velocidad y cantidad de la forma inalterada del mismo que es absorbida, alcanza el órgano diana y, por lo tanto, se encuentra disponible para producir una acción farmacológica determinada (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004). La comprensión de este proceso es crítica para determinar la dosis y la frecuencia de administración de un fármaco e influye en su eficacia y seguridad.

Las figuras 4.5.1 - 4.5.2 se muestra el perfil de concentración de TM en HA en función del tiempo. Como puede observarse la fracción de TM que atravesó la superficie ocular resulto ser significativamente menor a la dosis inicial administrada y los perfiles de los nanosistemas fueron diferentes al de la FC, debido a las diferentes concentraciones de TM en las formulaciones. En figura 4.5.2 se excluye el perfil farmacocinético correspondiente a la FC, a los fines de observar comparativamente con más detalle los perfiles de las NP. Posteriormente en la tabla 4.5.1. se detallan los diferentes parámetros farmacocinéticos más relevante.

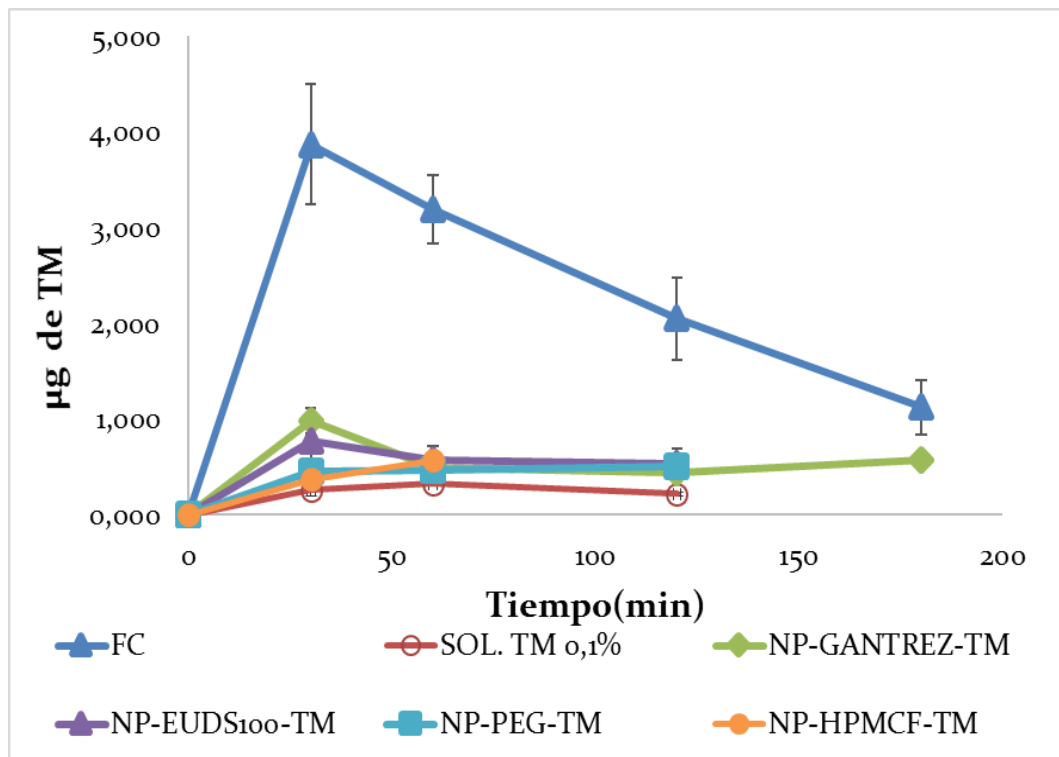


Figura 4. 5.1. Perfiles comparativos de concentraciones de TM en HA en función del tiempo.

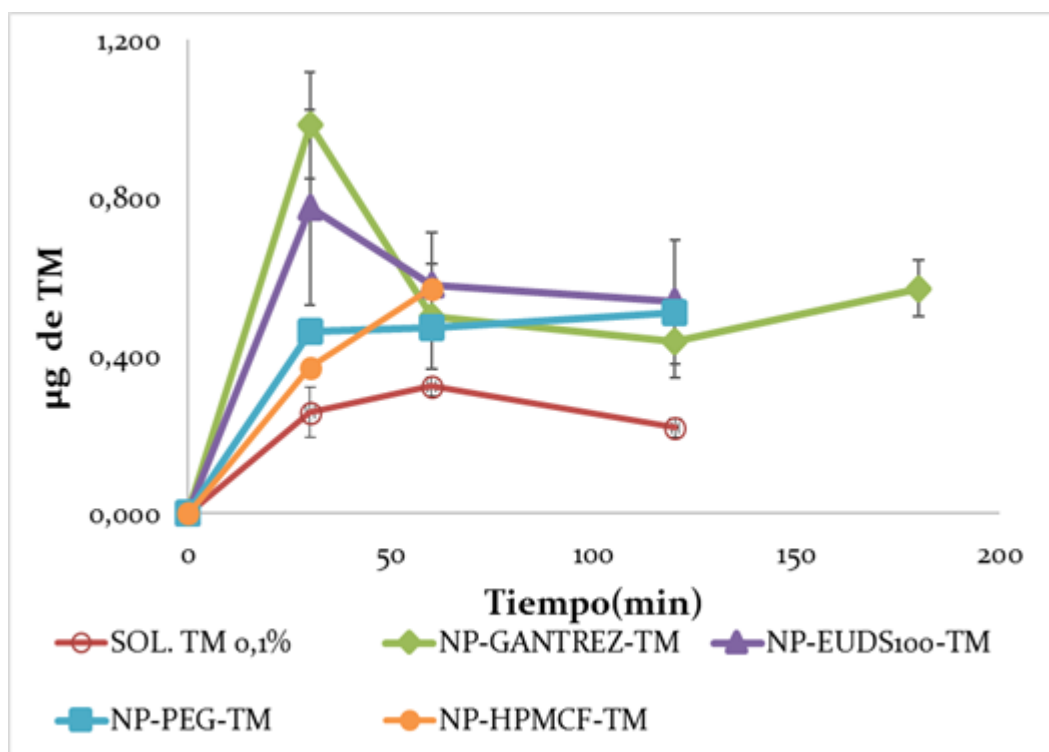


Figura 4.4.1. Perfiles comparativos de concentraciones de TM en HA en función del tiempo.

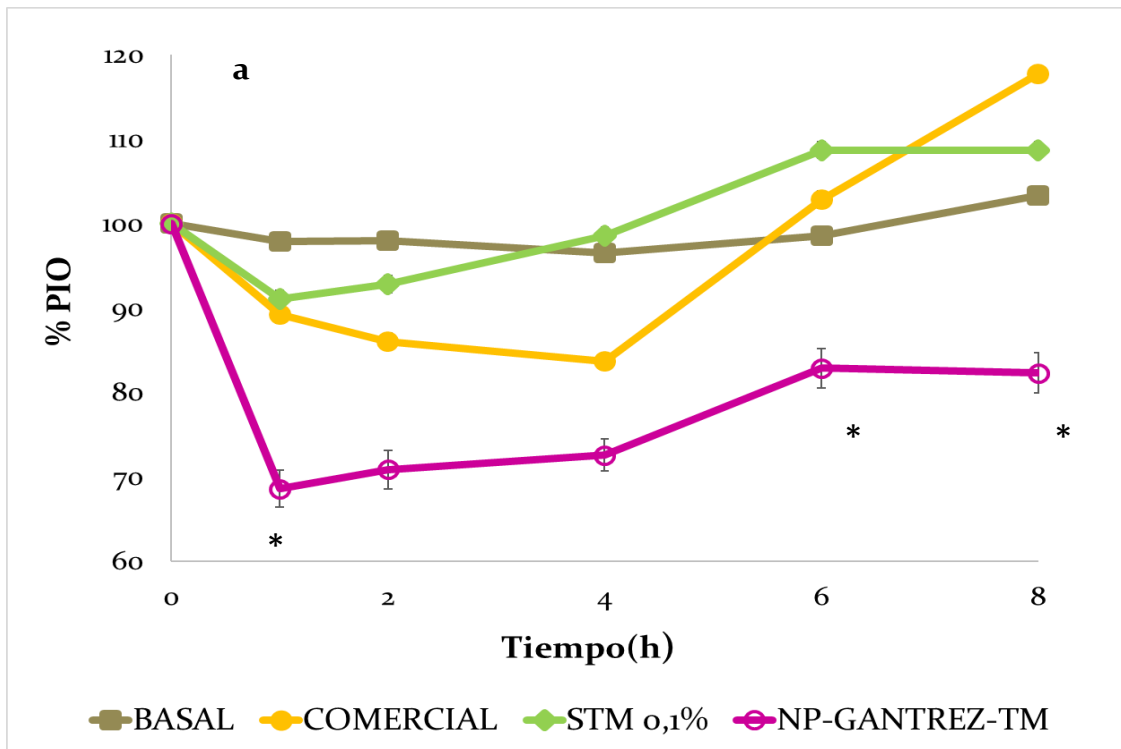
Tabla 4.5.1. Parámetros farmacocinéticos para TM obtenidos luego de la administración tópica de los nanosistemas, la FC y la STM 0,1 %.

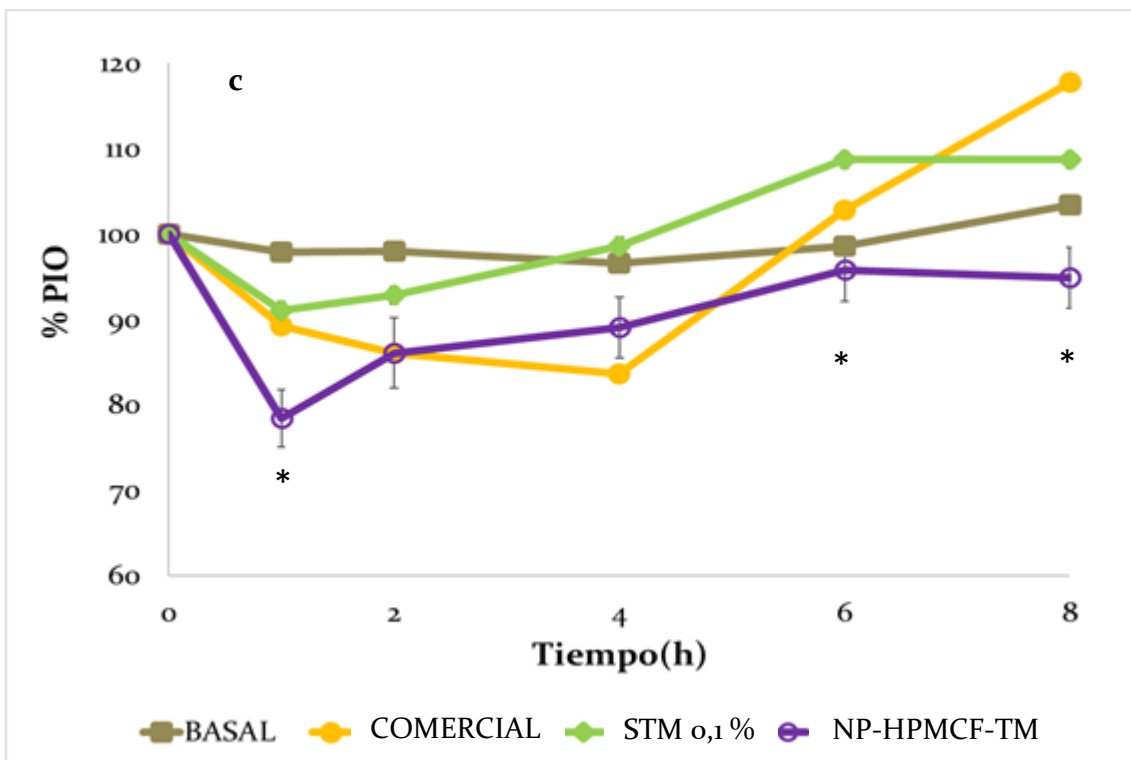
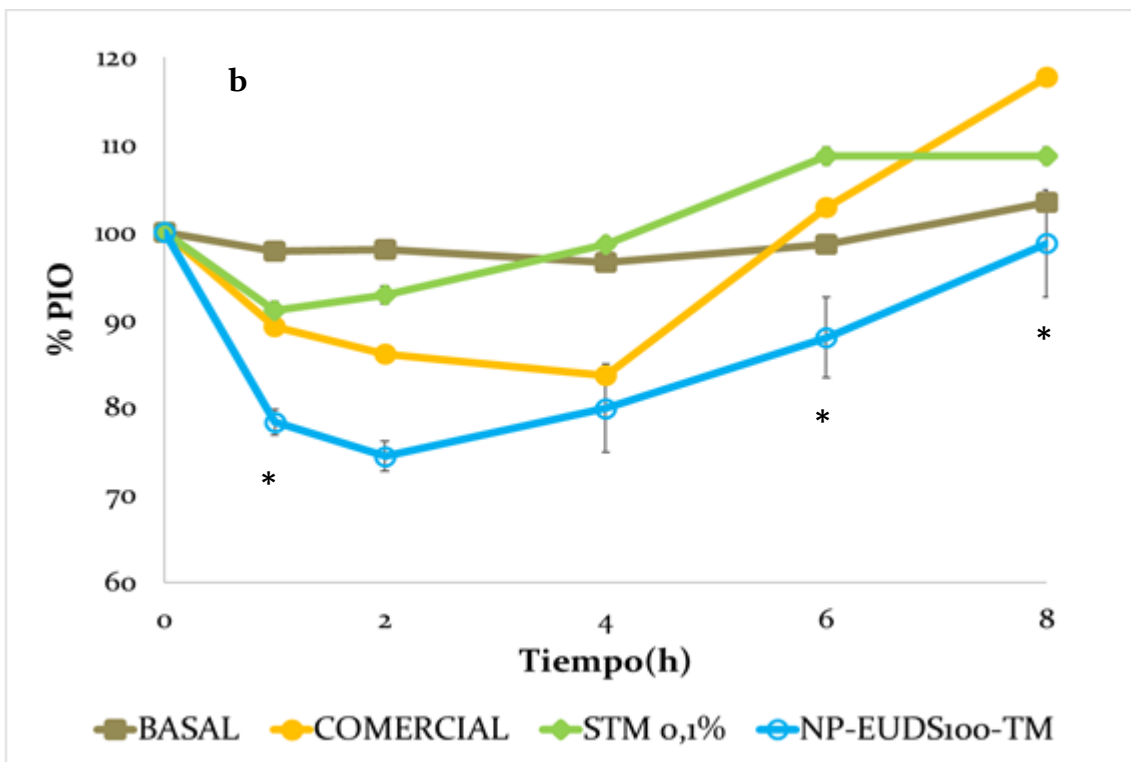
Formulaciones	C_{max} (μg)	T_{max} (min)	$AUC_{(0-180)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)
STM 0,1 %	$0,30 \pm 0,02$	60	39 ± 4
FC	$3,7 \pm 0,6$	30	400 ± 12
NP-GAN-TM	$1,0 \pm 0,1$	30	79 ± 11
NP-EUDS100-TM	$0,9 \pm 0,2$	30	82 ± 17
NP-HPMCF-TM	$0,51 \pm 0,02$	30	56 ± 1
NP-PEG-TM	$0,49 \pm 0,05$	30	50 ± 1

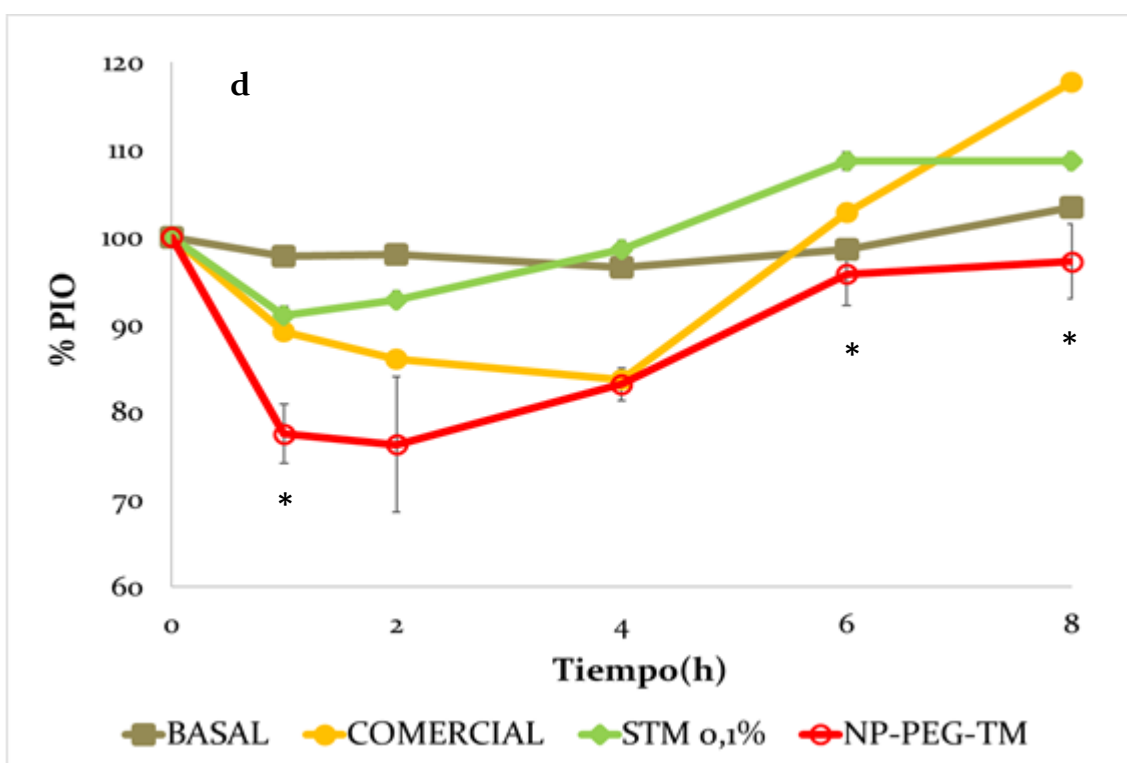
El área bajo la curva(AUC) de la FC fue 5 veces mayor respecto las NP-GANTREZ y NP-EUDS₁₀₀ y, aproximadamente, 8 veces mayor que las NP-PEG y NP- HPMCF. Lo mismo sucedió con los valores de C_{max} . La diferencia en ambos parámetros fue atribuida a la mayor concentración de TM en la FC (5 veces mayor que en las NP). Por otro lado, todos los sistemas nanometricos muestran mayor C_{max} y AUC que la STM 0,1 %, así como una mayor velocidad de absorción(T_{max}). Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p<0,05$).

4.6. Ensayo *in vivo* de PIO

Los resultados de los ensayos de disminución de la PIO se muestran en las figuras 4.6.1 (a-e) donde se muestran los perfiles de PIO de cada sistema portador obtenido comparado con la PIO de la FC, PIO STM 0,1 % y la PIO basal. Dichos valores se expresaron como el promedio del porcentaje de PIO, siendo el 100 % el valor de PIO correspondiente al valor obtenido a los 15 min antes de comenzar el ensayo.







Gráficos 4.6.1. Perfiles de % PIO vs Tiempo: a) NP-GANTREZ; b) NP-EUDS₁₀₀; c) NP-HPMCF; d) NP-PEG. Comparadas con PIO basal, FC de TM y STM 0,1 %.

A partir de los datos, se observó que **todos** los sistemas nanométricos mostraron una disminución de la PIO estadísticamente diferente a la STM 0,1 % y la PIO basal en todos los tiempos. Paralelamente, en las figuras se representó con asterisco ($p < 0,05$) los puntos en los cuales el valor de PIO fue estadísticamente diferente entre la FC y los sistemas nanométricos. Dichos resultados mostraron que el efecto farmacológico de las nanopartículas con TM fue superior a la FC en la primera hora de ensayo, así como también a las 6 h y 8 h de muestreo. Estos resultados fueron obtenidos utilizando una concentración de TM administrada 5 veces menor en las NP respecto a la FC.

En la tabla 4.6.1 se expresaron diferentes parámetros obtenidos del ensayo de farmacodinamia. A partir de los datos se observó una diferencia significativa en las AUC de todos los sistemas nanométricos respecto a la FC y la STM 0,1 % y los tiempos de descenso máximo de la PIO fueron entre 1 y 2 h pos administración de la formulación en todos los sistemas, lo cual coincide con la reportados por Tan y cols. (2017). A su vez, la disminución en el porcentaje de

PIO fue mayor en los conejos tratados con NP (con un descenso mayor al 20 %) en comparación con la FC (18 %).

Tabla 4.6.1. Parámetros determinamos a partir de los perfiles de farmacodinamia de los diferentes nanosistemas, la FC y la STM 0,1 %.

FORMULACIÓN	AUC(0-8 h) (Δ PIO-h)	DESCENSO MÁX. (%)	PIO min (mmHg)	TIEMPO MÁX. DESCENSO (min.)
STM 0,1 %	31 ± 9	13 ± 2	86 ± 2	1,4 ± 0,2
COMERCIAL	70 ± 14	18 ± 3	82 ± 3	1,8 ± 0,3
NP-GANTEZ-TM	98 ± 6	23 ± 2	77 ± 2	1,1 ± 0,1
NP-EUDS ₁₀₀ -TM	93 ± 18	20 ± 3	79 ± 3	1,5 ± 0,2
NP-HPMCF-TM	96 ± 16	25 ± 3	74 ± 3	1,3 ± 0,1
NP-PEG-TM	122 ± 12	27 ± 1	74 ± 1	1,9 ± 0,3

5. DISCUSIÓN

A lo largo de los años fue de interés el estudio de sistemas nanométricos para la encapsulación de TM, los cuales tuvieron como objetivo común el aumento de la biodisponibilidad de fármaco (Lavik y cols., 2011). Dentro de los nanosistemas desarrollados están las NP a base lipídicas como los liposomas (Gan y cols., 2013) o NP poliméricas de quitosano (Sunil y cols., 2013), pero hasta el momento no hay reportes de NP-ASH para la encapsulación de dicho fármaco.

Los nuevos nanosistemas obtenidos con los nuevos AE fueron de tamaños nanométricos con adecuada polispersidad. Como ejemplos de resultados similares se puede citar los obtenidos por Ghosh y cols. (2016) quienes desarrollaron NP de ASH encapsulando fisetina con un TMP de aprox. 200nm o los datos reportados por Bae y cols. (2012) y Dries y cols. (2007), quienes desarrollaron NP-ASH con doxorubicina. Ambos trabajos mostraron un potencial zeta negativo (mayor -30mV) de las NP-ASH obtenidas utilizando glutaraldehído

como AE, resultado similares a las NP-ASH con TM estudiadas en este trabajo de tesis.

Los rendimientos del proceso fueron mayores al 70 % en todos los sistemas y las NP-Gantrez fueron los sistemas que encapsularon un porcentaje mayor de TM (aprox.40 %), valor similar a lo reportado anteriormente por otros autores. Por ejemplo, Kumar y Jain (2007) obtuvieron una encapsulación del 40 % para la cefalosporina mientras que la encapsulación del ácido acetil salicílico fue de aprox. 50 % a pH:9 según Costas y cols. (2017).

La liberación de TM desde las NP-ASH fue condicionada por los AE utilizados, ya que el perfil de liberación las NP-PEG fue diferente respecto los otros nanosistemas formulados, hecho atribuido a la inestabilidad coloidales de las NP-PEG en medio acuoso (resultado detallado en los ensayos de estabilidad coloidal de NP-PEG). Adicionalmente, para los sistemas que modularon la liberación del TM, el modelo matemático de Korsmeyer-Peppas mostro que la difusión del TM a través de la matriz polimérica de ASH regula la liberación; dichos resultados fueron previamente observados también por Ramaiah y cols. (2016).

Por otro lado, los ensayos *ex vivo* mostraron que los nuevos nanosistemas fueron promotores de la permeación, lo cual fue reportado por otros autores para sistemas liposomales y de liposomas con quitosano (también llamado chitosán) cargados con TM o en nanosistemas poliméricos de Eudragit RS100 y Etilcelulosa con acetazolamida (Guoxin y cols., 2017, Quinteros y cols., 2016). Posteriormente, debido a que los ensayos de permeacion tras corneal son realizados solo en córnea y esta situación es diferente al comportamiento *in vivo*, se llevaron a cabo ensayos de farmacocinética en conejos. Dichos ensayos permitieron evaluar en forma más detallada la permeacion a través de la córnea del TM desde los diferentes nanosistema. Huang y cols. (2017) determinaron (por medio del ensayo farmacocinéticos en animales) que la T_{max} de TM tras la administración tópica de cubosomas fue a los 30 min pos administración, valor que coincidió con los obtenidos en la presente tesis doctoral para las NP-ASH. A partir de este ensayo también se confirmó que las NP fueron sistemas promotores de la absorción ya

que tuvieron un T_{max} de 30 min en comparación al T_{max} de 60 correspondiente a la STM 0,1 % (sin excipientes). Los parámetros farmacocinéticos (C_{max} y AUC) fueron difíciles de analizar en forma comparativa con los datos obtenidos de bibliografía debido a las diferentes concentraciones de TM, pero si fue posible la comparación de la C_{max} y el AUC entre las NP y la STM 0,1 %, cuyos valores fueron estadísticamente mayores en las formulaciones nanométricas. Los valores de C_{max} de los sistemas fueron menores al 1 % respecto a la dosis inicial instilada, valor que confirmó la baja biodisponibilidad ocular reportada por otros autores (Reimondez-Troitiño y cols., 2015; Patel y cols., 2015; Urtili, 2006).

Para el posterior análisis de los resultados de farmacodinamia, se tuvo en consideración lo publicado por La Sociedad Europea de Glaucoma quien reportó que la máxima reducción de la PIO producida por los antagonistas de los receptores beta es entre el 20 % y el 25 % respecto a los valores iniciales de PIO. Dicha disminución de PIO fue la observada en los conejos albinos normotensos bajo tratamiento con las NP de ASH con TM entrecruzadas con los nuevos AE. Resultados similares fueron encontrados por Wadhwa y cols. (2010) quienes realizaron NP de quitosano con ácido hialurónico y la disminución de la PIO fue superior a la FC. Los autores atribuyen la mayor disminución de la PIO a las excelentes propiedades mucoadhesivas del sistema portador, hecho que favoreció la permanencia de las NP en el sitio de aplicación.

A partir de lo anterior, se postuló que el efecto farmacológico superior de las NP-ASH obtenidas en comparación a la FC de TM son atribuidas a las propiedades bioadhesivas, cuyos resultados se mostraron anteriormente para algunos de los sistemas nanométricos.

La menor concentración de TM en los nanosistemas portadores se relaciona directamente con una disminución de los efectos adversos a nivel sistémico causados por la pérdida del TM luego de la administración tópica. Este fármaco, al ser una beta-bloqueante, está contraindicado en pacientes que sufren de asma bronquial, insuficiencia cardíaca crónica descompensada, bradicardia sintomática o bloqueo cardíaco y antecedentes de síncope sin diagnóstico (Lama, 2002.). Por lo tanto, la administración oftálmica de las NP-ASH con una

concentración de TM 5 veces menor a la FC supone menores efectos adversos sistémicos con una disminución de la PIO superior respecto a la FC. Esto se logró corroborar a partir de los resultados reportados por Uusitalo y cols. (2006) quienes cuantificaron el TM en plasma humano para evaluar la seguridad sistémica de hidrogeles de TM al 0,1 % (administrado 1 vez al día) en relación a una FC de TM al 0,5 % (administrada dos veces al día). Los resultados mostraron una disminución en el porcentaje de TM cuantificado en plasma luego del tratamiento en los pacientes tratados con el hidrogel y el efecto terapéutico fue similar para ambos grupos de estudio. Los autores atribuyen dichos resultados a un aumento en el tiempo de permanencia de la formulación en el sitio de aplicación (lo cual también sucedió con las NP-ASH obtenidas en el presente trabajo de tesis doctoral).

Por lo tanto, los nuevos sistemas nanométricos podrían ser sistemas capaces de lograr un efecto terapéutico óptimo con una disminución de los efectos adversos tras la administración oftálmica de NP cargadas con TM en pacientes con glaucoma.

6. CONCLUSIONES PARCIALES

Se obtuvieron nanosistemas para la vehiculización de TM utilizando nuevos AE con baja polidispersidad y PZ negativo. La mayoría de los nanosistemas modularon la liberación de TM en los ensayos *in vitro*.

Dichos sistemas nanométricos fueron promotores de la permeación y la cuantificación máxima de TM en HA fue a los 30 min pos administración. Los nuevos nanosistemas tuvieron un efecto farmacológico superior a la FC en una dosis 5 veces menor de TM, lo cual llevaría a una disminución de los efectos adversos a nivel sistémico y a un aumento en la adherencia al tratamiento de los pacientes con glaucoma.

Capítulo 4

NANOPARTÍCULAS DE ASH PARA LA VEHICULIZACIÓN DE BEVACIZUMAB

1. INTRODUCCION

En la última década la neovascularización corneal (NVC) ha despertado gran interés para los oftalmólogos ya que afecta a más del 4 % de los pacientes que se presenta en los servicios de cuidado visual y dicho valor representa aproximadamente 1.4 millones de personas por año (Bachmann y cols., 2008; Gonzalez y cols., 2013).

En condiciones normales el tejido corneal se encuentra libre tanto de vasos sanguíneos como de vasos linfáticos y la conservación de esta situación es fundamental para el mantenimiento de la transparencia de la córnea (necesaria para una buena agudeza visual). La neovascularización se caracteriza por la formación de nuevas estructuras vasculares en áreas que previamente eran avasculares como, por ejemplo, la córnea. Esta condición patológica puede estar producida por procesos inflamatorios e infecciosos, hipoxia o como consecuencia de cirugías de la superficie ocular (Schlereth y cols., 2014).

La principal causa de la NVC identificada es el incremento del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV o VEGF según sus siglas en inglés), tanto en modelos animales como en humanos (Papathanassiou y cols., 2008). Este factor puede ser excretado por: I) córneas inflamadas y vascularizadas; II) células endoteliales y epiteliales corneales; III) células endoteliales de los vasos límbicos y IV) en menor medida, por algunos queratositos, fibroblastos y macrófagos (Feijoó Lera y Duran de la Colina, 2009).

En la figura 1.1 se muestra el tejido ocular afectado por esta patología.

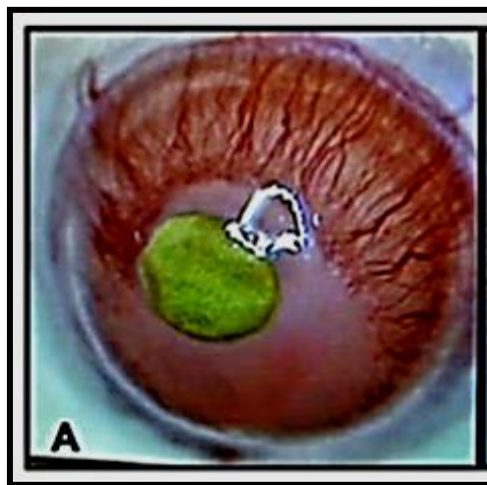


Figura 1.1. Tejido ocular con neovascularización corneal.

Los vasos anormales formados bloquean la luz causando cicatrices corneales que comprometen la agudeza visual, pudiendo provocar inflamación y edema, derivando generalmente en una pérdida importante de la visión (Chang y cols., 2012).

Para el tratamiento de esta patología, se han propuesto diferentes estrategias, incluyendo la administración de corticoides y antiinflamatorios no esteroideos en forma de gotas oculares (Monnier y cols., 2005), terapia fotodinámica y fotocoagulación (Baer y Foster, 1992). Otra estrategia que en la actualidad es muy estudiada (debido al rol central del VEGF en la patogénesis) consiste en la utilización de inhibidores del factor de crecimiento vascular endotelial los cuales son administrados como gotas oculares o mediante inyección subconjuntival (Zuo y cols., 2010).

En la actualidad existen varios fármacos inhibidores del VEGF aprobados por las autoridades sanitarias para la inyección intravítrea: a) Pegaptanib sódico (Macugen®), b) Ranibizumab (Lucentis®) y c) Aflibercept (Eylea®). Además, existe un cuarto fármaco de este tipo que es el bevacizumab (BVZ), el cual es un anticuerpo que no se encuentra aprobado para su uso intravítreo aunque su uso extra oficial (*off label*) se ha extendido en la práctica clínica oftalmológica.

El **bevacizumab** (BVZ, figura 1.2) es un anticuerpo monoclonal Anti-VEGF humanizado completo isotipo IgG₁ (con un peso molecular de 149 kD). El mismo fue diseñado para perfusión intravenosa y es producido por el sistema de expresión de células de ovario del hámster chino. Al unirse al VEGF-A humano inhibe la actividad biológica de todas sus isoformas impidiendo la formación de nuevos vasos anómalos y disminuyendo la permeabilidad vascular (Steinbrook, 2006). Este anticuerpo fue desarrollado por Genentech Inc/Roche® y aprobado el 26 de febrero de 2004 por la Food and Drug Administration (FDA, según sus siglas en inglés) para el tratamiento de primera línea del cáncer colorrectal metastásico, asociado al 5-fluorouracilo y al ácido fólico. Luego, se ha aprobado para el tratamiento de otros tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón o cáncer de mama metastásico (Perren y cols., 2011; Keating y Jacobs 2011) Recientemente, el BVZ ha comenzado a ser utilizado para el tratamiento de enfermedades

oftálmicas, incluyendo la neovascularización corneal y retinal, retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad (Keating y Jacobs 2011; Bakri y cols., 2007; Bock y cols.,2007). Como se mencionó anteriormente, debido al uso “off-label” del BVZ las aplicaciones oculares se realizan con consentimiento informado previamente firmado por el paciente.

El BVZ es comercializado bajo el nombre de Avastin® y presenta una estabilidad de 24 meses a $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ o de 45 días a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ (Ferrara, 2004).

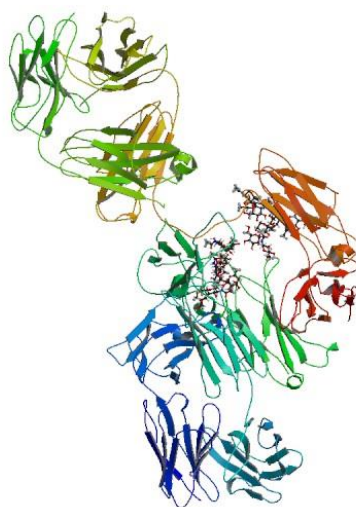


Figura 1.2: Estructura química del bevacizumab (extraído de DrugBank)

La vida media del bevacizumab en los tejidos oculares no se conoce con exactitud, pero se estima que es de aproximadamente entre 7 a 10 días; por tanto, no se conoce con precisión la posología, pero si se conocen las concentraciones que pueden ser tóxicas para el endotelio corneal. Con el fin de determinar la toxicidad sobre las células corneales, Yoeruek y cols., (2007) analizaron la exposición a diferentes concentraciones de bevacizumab (0,25 a 5 mg/mL) en cultivos celulares de queratositos, fibroblastos corneales y células endoteliales corneales. Tras 24h de exposición no se encontraron signos de citotoxicidad.

Los estudios de eficacia del BVZ para el tratamiento de NVC inducida se realizaron en conejos albinos mostrando una disminución en la formación de neovasos de hasta el 32 % (Hosseini y Nejabat, 2007).

El tratamiento actual en el servicio de oftalmología recomienda la administración subconjuntival debido a la mayor superficie de absorción que

ofrece esta vía y, generalmente, se requieren varias inyecciones para obtener resultados adecuados debido a la corta vida media del anticuerpo.

La eficacia de las terapias está lejos de ser óptima. Los inconvenientes asociados a los efectos secundarios tras la aplicación de este anticuerpo, así como el bajo cumplimiento por parte del paciente (en el caso de inyecciones), subraya la necesidad de nuevos sistemas de liberación capaces de superar las barreras fisiológicas del ojo, permitiendo la administración tópica y una posible disminución en la posología.

La encapsulación de anticuerpos en nanotransportadores se presenta como una alternativa para reducir la dosis administrada de anticuerpos (lo cual llevaría a una disminución general de la toxicidad), aumento de la vida media del anticuerpo y una reducción en el costo del tratamiento (Yadav y cols., 2011; Grainger 2004). Además, las nanopartículas pueden proteger al anticuerpo transportado evitando su degradación (Pérez-Martínez y cols., 2010) y producir una localización sitio específica del mismo.

Hay que poner especial atención en los procesos seleccionados para la encapsulación de los anticuerpos ya que al estar expuestos a condiciones extremas de pH y/o temperatura o en contacto con determinados solventes pueden desnaturalizarse perdiendo efectividad. Por lo tanto, es necesario evaluar la metodología de obtención de los nanosistemas (Frokjaer y Otzen, 2005).

En la actualidad hay pocos estudios sobre la nanoencapsulación de BVZ y en la tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de los mismos (Sousa y cols., 2017).

Tabla 1.1: Sistemas nanométricos estudiados para la vehiculización de BVZ

Nanotransportadores	Especificaciones
NP de Chitosan	Estudiadas para la rinopatía diabética. Las NP mostraron una disminución en la expresión del VGEF por tiempos más prolongados que la solución de BVZ (Lu y cols., 2014)
NP PLGA*	Las NP formuladas proporcionaron una liberación sostenida del BVZ durante aprox. 2 meses y una concentración vítrea del fármaco que se mantuvo por encima de la concentración mínima que bloquea la angiogénesis por 8 semanas (Varshochian y cols., 2015).
NP PLGA	Las NP de PLGA revestidas con quitosano (CS) mostraron una liberación sostenida y eficaz de BVZ a los tejidos oculares posteriores (Journal y cols., 2016).
Liposomas	Los resultados mostraron que los liposomas prolongaron el tiempo de residencia del BVZ en el vítreo (Abrishami y cols., n.d.).
SLNs**	Se observó un aumento en la actividad del BVZ en ensayos <i>in vitro</i> en células y un aumento en la permeación de BVZ (Battaglia y cols., 2015)

*PLGA: poli-ácido láctico-co-glicólico. **SLNs: NP Lipídicas solidas

Si bien no hay reportes de NP-ASH para el transporte de BVZ, estos sistemas mostraron ser prometedores para la administración oftálmica, y en muchos trabajos la ASH fue utilizada para proteger al BVZ frente a las condiciones desfavorables de la pre formulación que lo inactivaban (Varshochian y cols., 2013). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar y optimizar nanosistemas de albúmina sérica humana (ASH) para la liberación tópica de BVZ.

Si bien la administración tópica es el método preferido de administración ocular, dicha vía de administración para los anticuerpos como el BVZ (peso molecular de 149 kD) se considera típicamente ineficaz debido a que son moléculas grandes para penetrar en el epitelio corneal intacto. Sin embargo, sobre el área neovascularizada el epitelio puede ser defectuoso y como resultado la función barrera del epitelio es deficiente (Dastjerdi y cols., 2010).

En el presente capítulo se evaluó la encapsulación de BVZ en las NP-ASH para la administración tópica en córneas de ratas neovascularizadas. Los sistemas fueron evaluados (*in vitro* e *in vivo*) para determinar su efectividad en la reducción de los vasos corneales.

MATERIALES Y METODOLOGIA

2. MATERIALES

Para el diseño y elaboración de las NP-ASH se utilizó la ASH y las AE (glutaraldehído, Gantrez ES-425, Eudragit S100, ftalato de HPMC y PEG 35000) descritos en los materiales del capítulo 2.

2.1. Fármaco: BEVACIZUMAB

Se utilizó una solución comercial de bevacizumab (AVASTIN®, laboratorio ROCHE, España) que contiene 100 mg de bevacizumab (25 mg/ml) y los siguientes excipientes: 240 mg de dihidrato de trealosa, 4,8 mg de fosfato disódico, 23,2 mg de fosfato monosódico monohidratado, 1,6 mg de polisorbato 20 y agua para inyectables c.s.p. (cantidad suficiente para) 4 ml.

2.3. Animales de experimentación

Se desarrolló un modelo de neovascularización corneal utilizando 30 Ratas Wistar machos de aproximadamente 200 g los cuales se alojaron en estrictas condiciones de animalario en la sala de manipulación de animales de la Universidad de Navarra.

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Navarra (número de protocolo 172-14) de conformidad con la legislación europea sobre los experimentos con animales.

Los animales dispusieron de libre acceso a la comida y al agua durante todo el periodo de investigación. En ningún caso se procedió a un tratamiento simultáneo de los dos ojos que pudiera provocar la ceguera del animal.

3. METODOLOGÍA

3.1. Ensayos de pre formulación para la obtención de nanopartículas de ASH cargadas con BVZ

Las NP fueron obtenidas mediante el proceso de coacervación descrito en la metodología 3.1 del capítulo 2 y el BVZ fue añadido a la solución inicial de ASH al 2 %. Se estudiaron diferentes concentraciones de BVZ crecientes (1-5-7,5 y 15 mg) con la finalidad de determinar la concentración óptima de carga de BVZ en las NP.

El proceso de purificación de las NP fue modificado respecto al descrito para las NP sin fármaco. La obtención de NP purificadas fue mediante centrifugación de las NP en tubos tipo falcón de 5 mL con filtros de 30 kDa (Amicon®, España) los cuales se sometieron a dos ciclos de centrifugación de 4000 rpm durante 10 minutos. Lo retenido en el filtro fue re dispersado en una solución acuosa con 150 mg de sacarosa para la posterior liofilización de las NP.

Las condiciones de pH de la solución inicial, tiempo de incubación, volumen de agente de desolvatación agregada se mantuvieron sin modificar.

3.2. Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta

Los parámetros fueron determinados de acuerdo a los ensayos descritos en el capítulo 2: Metodología:3.2.

3.3. Rendimiento del proceso de obtención, rendimiento de encapsulación y capacidad de carga

La metodología para la determinación del rendimiento del proceso de obtención se describe en el capítulo 2: Metodología 3.5 y 3.6

En el caso de la determinación del RE, no se realizó por la técnica Bradford, debido a que el BVZ interfiere en la cuantificación de la ASH. De este modo, la determinación de ASH (en el sobrenadante) se realizó utilizando la técnica de HPLC explicada en el capítulo 3 ítem 3.4.1.

El porcentaje del RE se calculó según la ecuación 1:

$$\text{ec. 1.} \quad \text{RE} = \left[\frac{\text{ASH}_{\text{inicial}} - \text{ASH}_{\text{final}}}{\text{ASH}_{\text{inicial}}} \right] \times 100$$

Donde $\text{ASH}_{\text{inicial}}$ es el peso inicial de ASH y $\text{ASH}_{\text{final}}$ el peso de ASH cuantificado en el sobrenadante.

La **cuantificación de BVZ (CC)** se determinó utilizando un Kit de Elisa específico para BVZ (Q-Beva test procedure, Shikari Q-Beva, MatriksBiotek). Las NP fueron desnaturalizadas con NaOH y luego las muestras se colocaron en una microplaca de 96 pocillos cubierta con el factor de crecimiento vascular endotelial humano. Luego se añadieron diferentes reactivos según el protocolo del ELISA específico para BVZ. La lectura de la placa fue mediante espectroscopia U.V a 496nm.

Previa cuantificación de las muestras, se realizó una curva de calibrado en el rango entre 0,1 y 100 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 > 0.993$). Los límites de detección y cuantificación establecidos fueron de 3 y 80 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

La CC se calculó según la ecuación 2:

$$\text{ec. 2} \quad \text{CC} = \left(\frac{C_{\text{encap.}}}{C_{\text{total}}} \right) \times 100$$

Donde $C_{\text{encap.}}$ es la cantidad encapsulada y C_{total} es la cantidad total de fármaco.

Para descartar la posible desnaturalización del BVZ con la solución de NaOH se realizó una mezcla de ambos compuestos (en concentraciones similares a las utilizadas en el ensayo) y se cuantificó el BVZ mediante kit específico.

3.4. Liberación *in vitro* del BVZ

Los ensayos de liberación del BVZ desde las NP fueron realizados en condiciones sink a ($37 \pm 1^\circ$) C, bajo agitación constante (60 rpm) en una incubadora (VorTemp 56 Shaking Incubator, LabnetIncubator Inc.). Para el ensayo se pesaron 10 mg de las formulaciones seleccionadas (NP-GANTREZ-BVZ, NP-PEG-BVZ y NP-BVZ) en tubos eppendorf y se redispersaron en 1 mL de PBS

(pH: 7,4, medio receptor). A intervalos de tiempos seleccionados, se tomaron los tubos eppendorf y se centrifugaron a 21.000 rpm durante 10 min (Rotor 3336, BiofugeHeraeus, Hanau, Alemania). Del centrifugado se extrajo el sobrenadante y se cuantifico el BVZ mediante un test ELISA específico descrito anteriormente.

Cada ensayo se realizó por triplicado y los perfiles de liberación se expresaron como el promedio del porcentaje de BVZ liberado de los nanosistemas en función del tiempo.

3.5. Integridad del BVZ en las nanopartículas

Se realizó un estudio de la integridad del anticuerpo (BVZ) encapsulado en las diferentes nanopartículas seleccionadas mediante la técnica de electroforesis microfluídica. El objetivo de este ensayo fue evaluar la influencia de la metodología de obtención en la integridad del anticuerpo. Para ello se utilizó el sistema de electroforesis ExperionSystem Pro 260 (Bio-Rad Lab., EEUU), que utiliza chips microfluídicos para la separación y el análisis de proteínas. Esta técnica analítica es permite la separación e identificación de proteínas de manera rápida, precisa, con alta resolución mediante la aplicación de un campo eléctrico sobre la muestra.

Para el ensayo se tomaron muestras de las diferentes nanopartículas redispersadas en agua (NP-BVZ, NP-PEG, NP-GANTREZ, NP-PEG-BVZ, NP-BVZ-GANTREZ) y de los compuestos puros (ASH y BVZ). Las diferentes muestras se inyectaron en un chip microfluídico (según especificaciones del protocolo del sistema) el cual se introdujo en la estación de electroforesis Experion y se obtuvieron los resultados mediante un software determinado (software Experion System). El mismo procedimiento fue llevado a cabo para las muestras desnaturalizadas, con la diferencia que fueron sometidas a un proceso de desnaturalización específico previo al sembrado.

3.6. Caracterización fisicoquímica del sólido

Se realizaron estudios de espectroscopia infrarroja y difracción de rayos X para estudiar los cambios que se producen en la estructura de la ASH por la formación de las NP con BVZ. Los estudios se realizaron según lo descrito en la metodología 3.8 del capítulo 2.

3.7. Pruebas in-vivo: MODELO DE NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL(NVC)

3.7.1. Modelo de neovascularización corneal

El modelo de neovascularización corneal fue realizado por la Farmacéutica Ines Luis de Redin del grupo de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra en colaboración con el Dr. Sergio Recalde, del Dpto. de Oftalmología del Hospital de la Universidad de Navarra (España) según el modelo ya desarrollado por (Figuroa-ortiz et al. 2016) donde la NVC afectó principalmente el tercio externo del estroma próximo al epitelio corneal.

Para el desarrollo del modelo las ratas se mantuvieron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de 100 µL de una solución Xylacina (5 mg /kg, Xilagesic, Laboratorio Calier®) y 200 µL de una solución de ketamina (Imalgene, Merial®). Luego se les instiló una gota de un Tropicamida (Coliricusi Tropicamida, laboratorio Alcon®) y, 5 minutos después, las córneas de ratas fueron agredidas mediante la aplicación de una barra de nitrato de plata (Argepenal, Braun®) en la superficie de los ojos durante 5 segundos. Por último, los ojos fueron lavados con una solución estéril de NaCl 0,9 % p / v.

La aparición de los neovasos se dio a las 12 horas luego de realizar la quemadura y a las 24h pos-quemadura se comenzó con el esquema de tratamiento.

3.7.2. Tratamiento de la NVC y obtención de datos

Para llevar a cabo el tratamiento los animales fueron divididos en diferentes grupos y anestesiados con isofluorano (Isovet, España). En la tabla 3.7.2 se detalla el esquema de tratamiento.

Tabla 3.7.1. Esquema del tratamiento utilizado para el modelo de neovascularización corneal.

	PBS	NP-PEG	AVASTIN	NP-BVZ	NP-PEG-BVZ
DOSIS (mg/mL)	+	+*	4	4	4
POSOLOGIA(h)	12	24	12	24	24
DURACION(días)	7	7	7	7	7

+ significa que se añadieron 8 µL de una solución de PBS y de una redispersión de NP-PEG.

Los datos fueron procesados mediante el software ImageJ (dominio público, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) utilizando las imágenes digitales de las córneas. Las imágenes se analizaron en modo binario, convirtiéndolas a un formato en blanco y negro. A partir de estas imágenes, se determinó el área total de la córnea, superficie de la córnea ocupada por el daño con nitrato de plata (lesión) y la zona afectada por la generación de nuevos vasos (neovascularización de la córnea). Estos parámetros fueron calculados mediante el recuento de píxeles. A partir de dichos valores fue calculada el área invasiva (IA, ec. 1) y la neovascularización corneal normalizado por la superficie de la lesión (NVC, ec.2).

ec. 1

$$AI = \frac{\text{Área afectada por la genesis de nuevos vasos}}{\text{Área de la córnea total}} \times 100$$

ec.2

$$NVC = \frac{AI}{\text{Superficie del ojo afectada por la quemadura}}$$

Se graficó el promedio del valor de NVC con sus respectivas desviaciones estándar y el tratamiento estadístico de los datos fue mediante la prueba ANOVA de un solo factor para un nivel de significación de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos de pre formulación para obtención nanopartículas de ASH cargas con BVZ

A partir de los datos detallados en la tabla 4.1.1 se observó que con el agregado de BVZ y sin el agregado de AE se formaron nanosistemas monodispersos con estabilidad coloidal en el tiempo. El BVZ es una molécula con numerosos grupos funcionales los cuales, por algún mecanismo no conocido (el cual puede ser puente de hidrógeno) interaccionaron con la ASH actuando como AE. En la tabla también se muestran los valores de TMP, IP y PZ de las NP-BVZ utilizando los diferentes AE para evaluar la influencia de los entrecruzantes en las NP-BVZ.

En la tabla 4.1.1 se especificaron los resultados del TMP, IP y PZ obtenidos de las NP con BVZ re dispersadas en agua y de las NP sin anticuerpo.

Tabla 4.1.1. TMP, IP y PZ de los nanosistemas con BVZ y las NP sin BVZ.

Formulaciones	TMP (nm)	IP	PZ (mV)
NP-BVZ	310 ± 3	0,14 ± 0,02	-14 ± 1
NP- GLUT	163 ± 2	0,17 ± 0,01	-26 ± 1
NP- GLUT -BVZ	180 ± 3	0,11 ± 0,01	-36 ± 1
NP -GANTREZ	231 ± 2	0,14 ± 0,02	-21 ± 2
NP-GANTREZ-BVZ	282 ± 4	0,12 ± 0,08	-29 ± 1
NP-EUD S100	269 ± 2	0,13 ± 0,02	-21 ± 1
NPS -EUDS100-BVZ	270 ± 21	0,14 ± 0,09	-26 ± 1
NP-HPMCF	376 ± 1	0,17 ± 0,01	-16 ± 1
NP- HPMCF -BVZ	369 ± 1	0,15 ± 0,01	-13 ± 1
NPS-PEG	207 ± 1	0,10 ± 0,01	-26 ± 1
NP- PEG-BVZ	301 ± 2	0,13 ± 0,03	-17 ± 1

Los TMP de los diferentes nanosistemas con el agregado de los AE fueron similares a los valores reportados para las NP-ASH sin anticuerpo, excepto las NP-PEG-BVZ cuyo TMP fue levemente mayor.

En relación al PZ, los nanosistemas con BVZ entrecruzados con glutaraldehído, Gantrez y EDU s100 mostraron un PZ mayor a las NP sin BVZ mientras que el PZ fue menor en los nanosistemas con HPMCF y PEG. Las diferencias en los PZ indicaron una modificación de la superficie de las NP por el agregado del BVZ debido a la presencia de una porción del BVZ añadido en la superficie del sistema (Win y cols., 1994).

Las fotografías MEB de los diferentes sistemas mostraron que las NP fueron esféricas. A modo ilustrativo, a continuación, solo se muestra una figura MEB de los sistemas NP-BVZ.

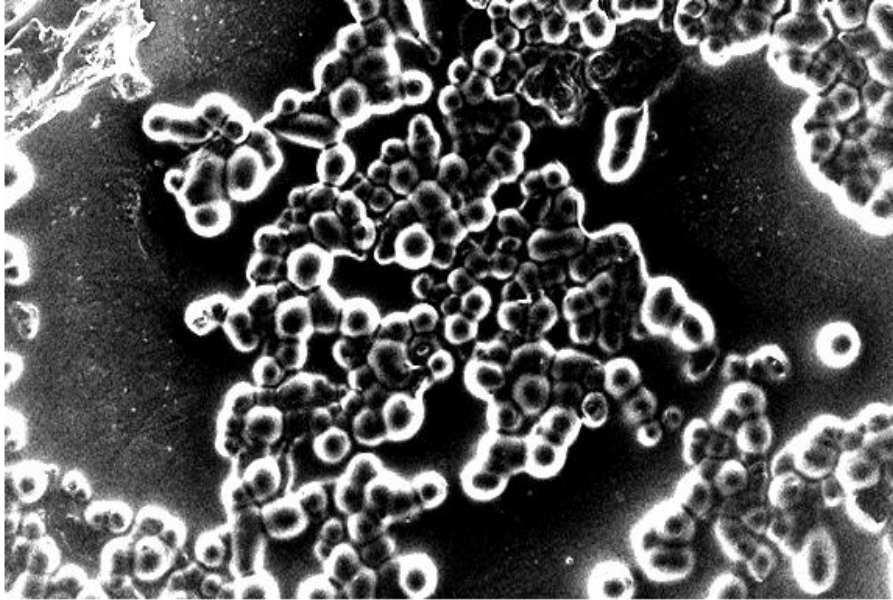


Figura 4.1.1. Microfotografía obtenida por MEB de NP-BVZ.

En la tabla 4.2.1 se detallan las diferentes concentraciones de BVZ con la finalidad de determinar la concentración óptima para obtener alto rendimiento del proceso, siendo la relación 0,15 BVZ/ASH la elegida para los ensayos. A concentraciones mayores de BVZ se observó la precipitación del sistema.

Tabla 4.1.2. Estudio de la concentración de BVZ óptima para la obtención de NP con estabilidad coloidal

BEVA/HSA	TMP (nm)	IP	PZ (mV)	RP (%)
0,01	240 ± 3	0,27 ± 0,01	-18,9 ± 0,9	75±5
0,03	326 ± 7	0,21 ± 0,03	-14,1 ± 0,3	78±3
0,05	353 ± 6	0,26 ± 0,01	-11,7 ± 0,2	78±2
0,08	304 ± 4	0,16 ± 0,03	-15,5 ± 0,3	80±3
0,15	306 ± 4	0,22 ± 0,01	-16,1 ± 0,3	85±3

4.2. Rendimiento del proceso de obtención, de encapsulación y capacidad de carga

En la tabla 4.2.1 se muestran RP, RE y CC. Se estudiaron las NP-BVZ sin AE y con AE, para evaluar si la utilización de AE de las NP interfieren o no en dichos parámetros. Tanto el RP como el RE son mayores al 60 % en todos los nanosistemas.

A partir de los datos de CC se observó que la utilización de Gantrez como AE aumento significativamente la CC de BVZ en las NP respecto NP-BVZ, mientras que para los otros sistemas formulados dicho valor fue menor.

Tabla 4.2.1. Porcentaje del RP, RE y CC de los nanosistemas.

Formulaciones	RP (%)	RE (%)	CC BVZ (% BVZ)
NPS-BVZ	85 ± 3	75 ± 4	66 ± 1
NPS-BVZ-GANTREZ	70 ± 2	66 ± 1	90 ± 4
NPS- BVZ-EUDS ₁₀₀	86 ± 3	80 ± 3	48 ± 8
NPS-BVZ- HPMCF	76 ± 4	70 ± 4	52 ± 1
NPS-BVZ- PEG	63 ± 7	60 ± 2	61 ± 5

A partir de los datos expresados en la tabla, se seleccionaron para los posteriores ensayos las NP-BVZ, NP-GANTREZ-BVZ y NP-PEG-BVZ, ya que fueron las formulaciones con mayor CC.

4.3. Integridad del anticuerpo

La electroforesis en base gel permitió identificar la integridad del anticuerpo en las formulaciones y, de este modo, asegurar que el proceso de desolvatación no afecto la integridad del anticuerpo en las NP.

En la figura 4.4.1 se observó que las bandas correspondientes a la ASH y al BVZ aparecieron a los 66 kDa y 149 kDa, respectivamente y dichas bandas aparecen en las NP con BVZ, lo cual significa que el BVZ se encontró sin desnaturizar. Para corroborar dichos resultados se realizó una electroforesis microfluídica sometiendo las muestras a una serie de reacciones para asegurar la desnaturalización del anticuerpo y de la proteína (figura 4.4.2).

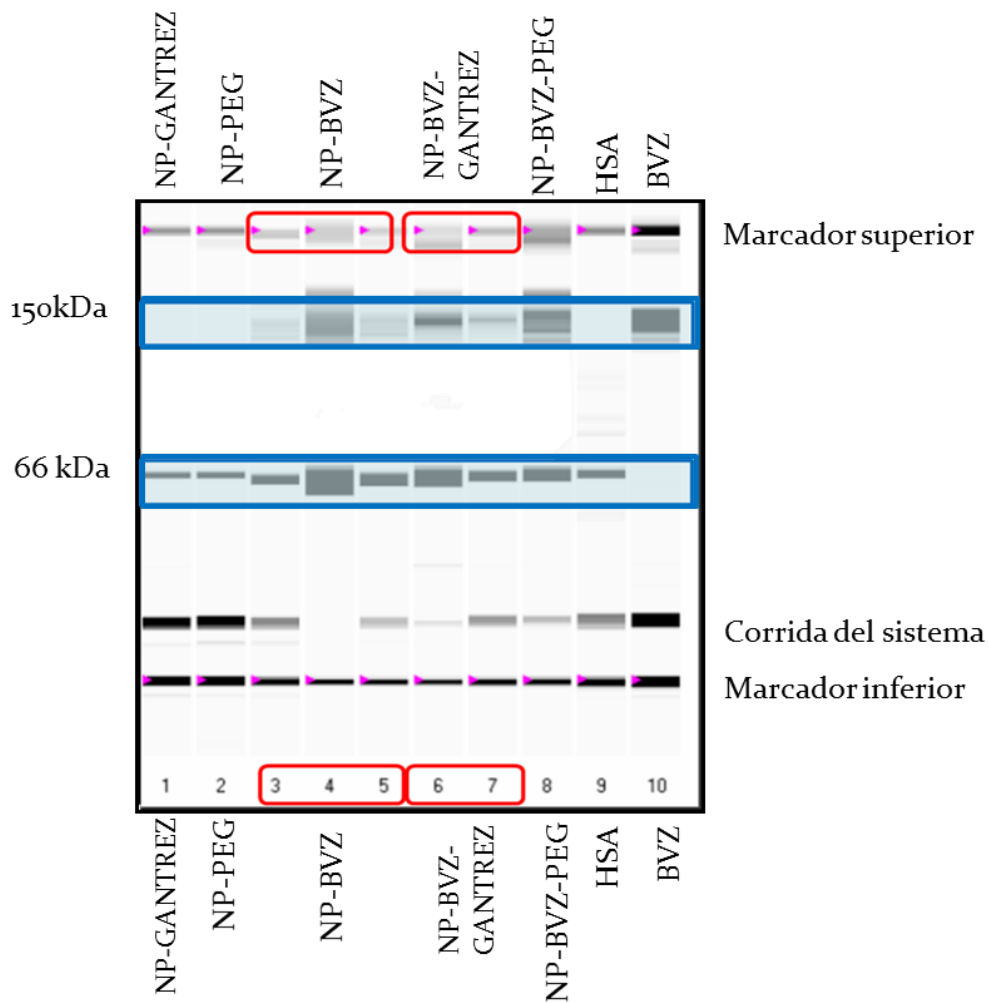


Figura 4.4.1. Electroforesis microfluídica de los sistemas nanométricos, la ASH y BVZ puros sin desnaturalización de las muestras.

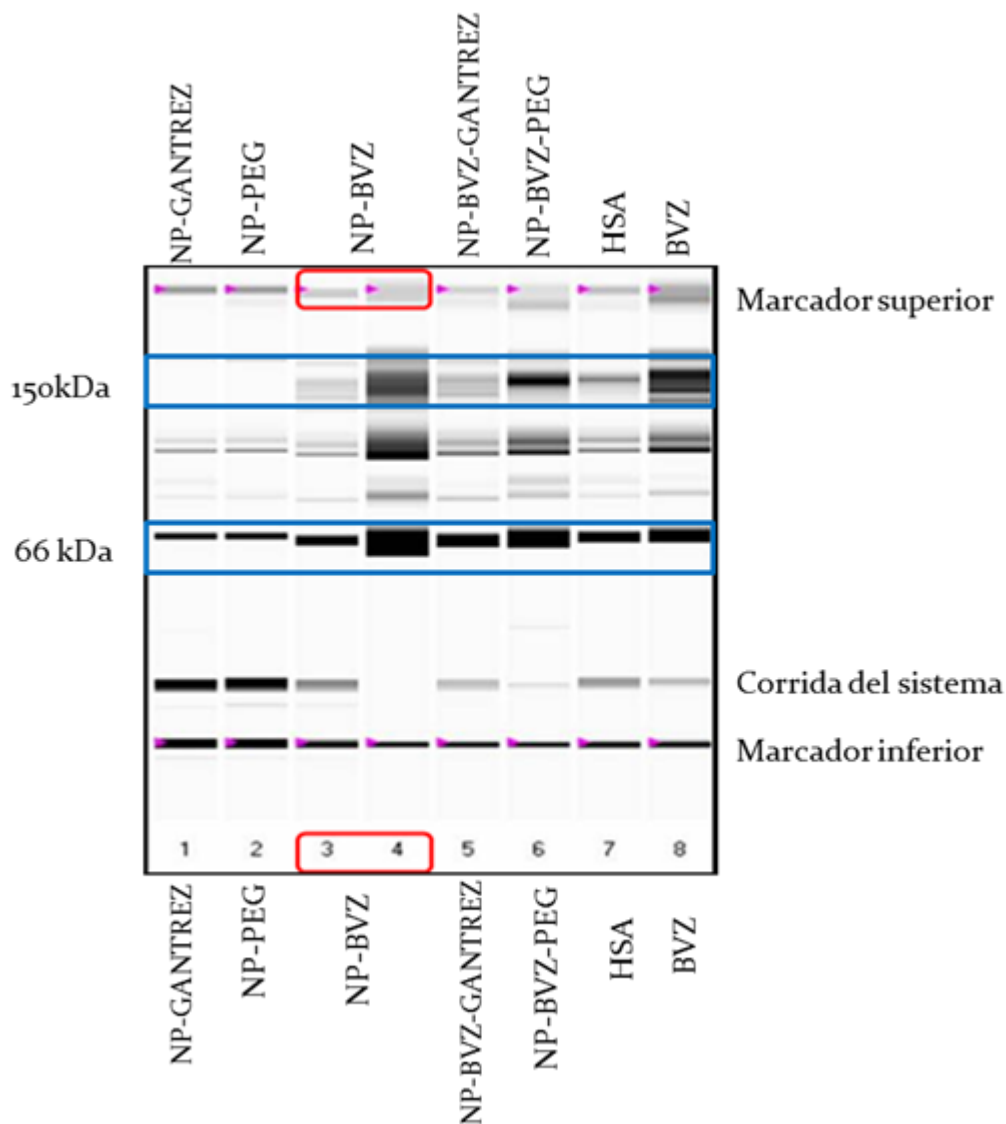


Figura 4.4.2. Electroforesis microfluídica de los sistemas nanométricos, la ASH y el BVZ desnaturalizados.

4.5. Estudio fisicoquímico del polvo

Los resultados de los XRD (anexo 1) mostraron que los sistemas estabilizados con BVZ fueron amorfos, no mostraron cristalinidad, al igual que los resultados obtenidos en el capítulo 2 para las NP sin anticuerpo. Del mismo modo los espectros infrarrojos (figura 4.5.1) arrojaron resultados similares a lo estudiado en el capítulo 2 con una disminución en las intensidades de las bandas amida I y II en las NP- BVZ respecto al espectro de la ASH.

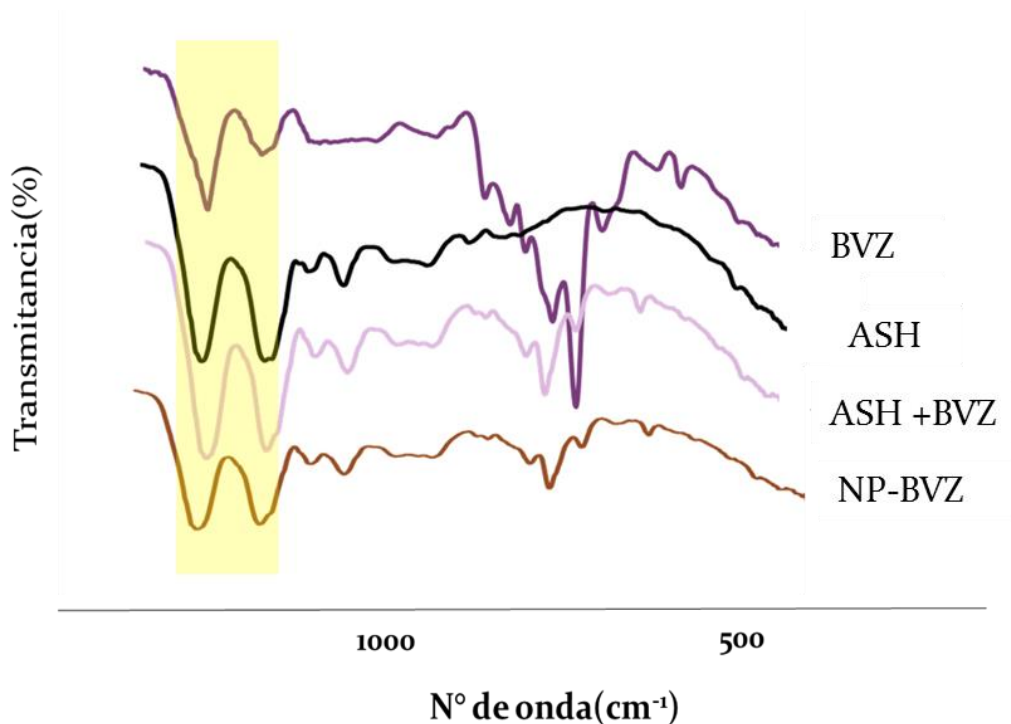


Figura 4.5.1: Espectro IRFT de NP-BVZ, mezcla física, BVZ y ASH sola.

4.3. Ensayos de liberación *in vitro* de BVZ

A partir de los datos graficados (figura 4.3.1) los sistemas mostraron una liberación inicial rápida del anticuerpo en las primeras horas del ensayo y dicha liberación se mantuvo en el tiempo. Esto es lo que otros autores denominan efecto “burst” o liberación bifásica y fue ampliamente reportado para las NP-ASH (Das et al. 2005; Kumar y Jain 2007). Dichos autores postularon que la liberación inicial rápida se debe al fármaco presente en la superficie de las NP y la fase lenta al fármaco encapsulado.

Al comparar los diferentes perfiles, se determinó que los sistemas modificados en la superficie con PEG mostraron una liberación más rápida del anticuerpo debido a que el PEG favorece la difusión del BVZ mediante la formación de canales en la matriz polimérica, los cuales facilitaron la salida del BVZ desde el interior de las NP (Quinteros y cols.,2016). Por el contrario, los sistemas estabilizados con Gantrez mostraron una liberación lenta el BVZ, cuyo porcentaje fue del 10 %. Mientras que la liberación fue aproximadamente del 40 % del BVZ en los sistemas sin el agregado de AE.

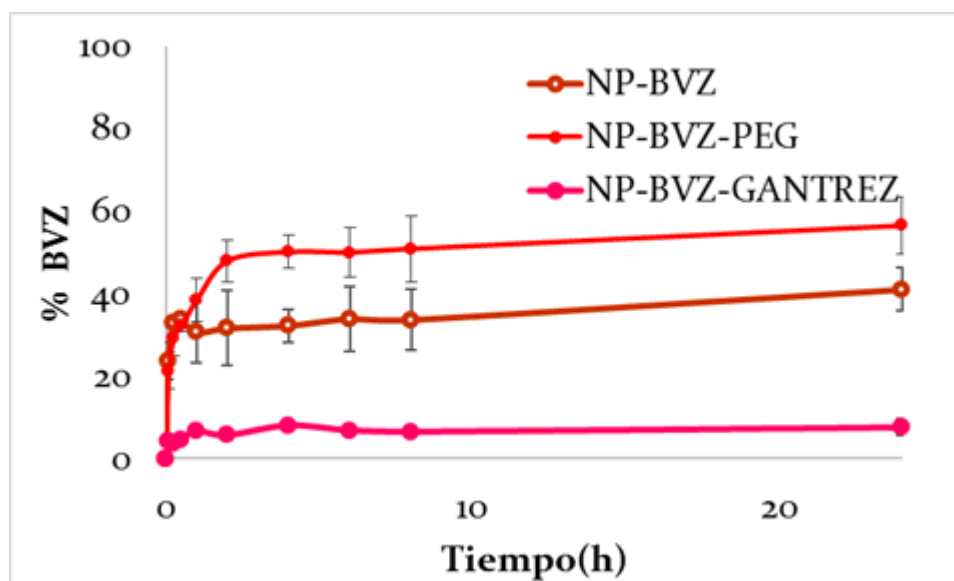


Figura 4.3.1. Porcentaje de BVZ liberado en función del tiempo desde las NP-BVZ, NP-PEG-BVZ y NP-Gantrez-BVZ.

4.6. Ensayos *in vivo* de eficiencia terapéutica en un modelo de NVC

Para evaluar la efectividad terapéutica de las NP con BVZ respecto a la solución de bevacizumab comercial se realizaron ensayos *in vivo* en un modelo de neovascularización corneal en ratas. La dosis elegida estuvo por debajo de la dosis tóxica reportada para el BVZ (Yoeruek y cols., 2007). Para los ensayos *in vivo* se seleccionaron las NP-BVZ y la NP-BVZ-PEG. Los sistemas NP-BVZ-GANTREZ fueron descartados debido a los resultados de los ensayos *in vitro*.

En la figura 4.6.1 se detallan los resultados obtenidos luego del tratamiento de los neovasos formados por aplicación tópica de las diferentes formulaciones (solución salina: CONTROL NEGATIVO, NP-BVZ-PEG, AVASTIN®, NP-BVZ y NP-BVZ-PEG). Hubo una marcada disminución en el área afectada por la lesión (CNV) en las corneas tratadas con NP-BVZ y NP-BVZ-PEG respecto al control negativo y las NP-PEG sin anticuerpo. Además, ambos sistemas nanométricos con BVZ mostraron mejores resultados respecto a las corneas tratadas con AVASTIN®. Pero, a su vez, la solución de AVASTIN® mostró diferencia respecto a las corneas

controles (CON NEG y NP-PEG). Asimismo, las córneas tratadas con NP-BVZ fueron las que mostraron mayor disminución del área afectada por los neovasos.

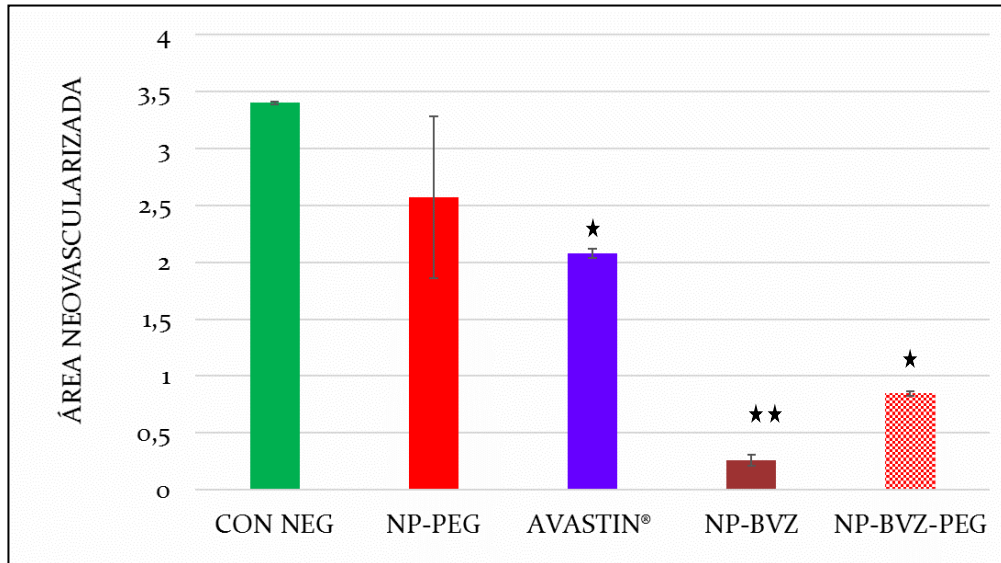


Figura 4.6.1. Área afectada por la neovascularización corneal (NVC) en función del tratamiento utilizado.

El mayor efecto terapéutico de las NP con BVZ fue a una dosis diaria menor respecto la solución de AVASTIN®.

En la figura 4.6.1 se presentaron las fotografías de las corneas luego de los respectivos tratamientos: CON-NEG (A), AVASTIN (B), NP-BVZ (C) y NP-BVZ-PEG(D).

En dichas imágenes se pudo observar la disminución en los neovasos en las corneas tratadas con las diferentes formulaciones de BVZ, respecto el control negativo.

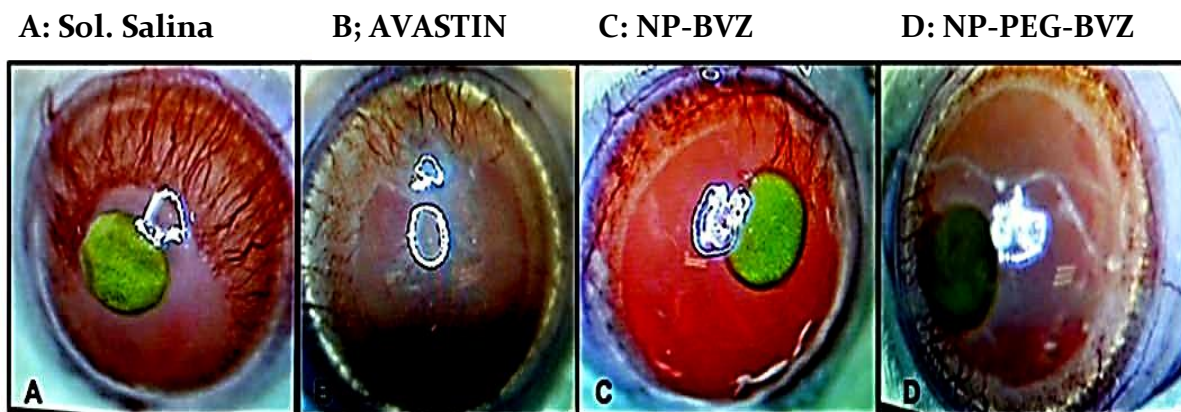


Figura 4.9.1: fotografías del tejido ocular luego del tratamiento con las diferentes formulaciones.

Luego de una semana de tratamiento, al ser suspendido, hubo una regeneración de la angiogénesis.

5. DISCUSIÓN

La mayoría de los métodos reportados para la encapsulación de anticuerpos en sistemas poliméricos nanoparticulados o microparticulados impone considerables efectos sobre la integridad y la función de las proteínas o de los anticuerpos (Bilal y cols., 2005; Tamber y cols., 2005). Por ejemplo, en el trabajo de investigación de Varshochian y cols. (2015) tuvieron que añadir un agente protector para prevenir la desnaturalización del BVZ al utilizar el proceso de emulsificación para la obtención de NP poliméricas de PLGA. Por tal motivo, el proceso de coacervación para el desarrollo de NP de ASH fue novedoso ya que no afectó la estabilidad de BVZ. Esto fue corroborado mediante la técnica de electroforesis microfluídica que confirmó la integridad del BVZ en los nanosistemas de ASH por la aparición de la banda correspondiente al anticuerpo a los 149 kDa (Yandrapu y cols. 2013).

EL BVZ es una molécula con numerosos grupos funcionales los cuales interacciones con la ASH y, sin el agregado de AE, las NP mantuvieron su estabilidad coloidal en el tiempo lo cual confirmó un entrecruzamiento. Posteriormente, se desarrollaron NP-BVZ con los AE para determinar posibles

cambios respecto a las NP-BVZ. En los todos los nanosistemas formulados se observó que el BVZ se encontró parte encapsulado y otro porcentaje en la superficie de las NP, lo cual fue confirmado por los cambios en el PZ y, posteriormente por los ensayos de liberación. Del mismo modo que lo reportado por Merodio y cols. (2002) los perfiles de liberación del BVZ de los NP-ASH fue bifásica, lo cual fue atribuido a una liberación inicial del BVZ adsorbido en la superficie de la NP, mientras que la liberación lenta corresponde al anticuerpo encapsulado. Esto también fue reportado para NP-ASH cargadas con doxorubicina (Das y cols., 2005) o azitromicina (Ramaiah y cols., 2016). Adicionalmente las NP-BVZ-PEG mostraron una liberación del BVZ mayor que los otros sistemas estudiados, lo cual fue explicado por la formación de canales en la red polimérica que favorecen la liberación (Quinteros y cols., 2016)

Numerosos estudios reportaron que la administración tópica de BVZ mostró ser efectiva para la terapia de la NVC (Cheng y cols., 2012; Uy y cols., 2008; Yoeruek y cols., 2008; Kim y cols., 2008; DeStafeno y Kim, 2007; Manzano y cols., 2007), lo cual presenta una gran ventaja ya que es potencialmente más segura que la inyección subconjuntival (Gadkari, 2007). Este fenómeno puede explicarse, según lo investigado por Dastjerdi y cols. (2010) a que el epitelio sobre el área neovascularizada puede ser defectuoso y, por lo tanto, el BVZ puede penetrar la córnea vascularizadas favoreciendo la acción farmacológica. De caso contrario, debido al tamaño del anticuerpo sería imposible que atravesara la córnea. A lo largo de los últimos años, fueron estudiados numerosos sistemas nanométricos para la encapsulación de BVZ y los resultados respecto al efecto terapéutico fueron, en su mayoría, favorables ya que mostraron una disminución de la angiogénesis superior a la solución comercial (AVASTIN®). Por ejemplo, Lu y cols. (2014) observaron que el bevacizumab y las nanopartículas de quitosano con bevacizumab inhibieron eficazmente la expresión del VEGF, siendo la duración de la acción más prolongada en las NP. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para las NP-ASH con BVZ ya que se observó una disminución de los neovasos superior en las córneas tratadas con NP-BVZ respecto las córneas tratadas con la solución de BVZ. Además, dicha disminución fue a una dosis diaria de BVZ menor en las NP respecto a la solución de BVZ.

El efecto terapéutico superior de las NP fue atribuido a la capacidad de las NP en permanecer por tiempos prolongados en la superficie ocular, lo cual coincide los resultados obtenidos en la presente tesis para las NP con maleato de timolol.

6. CONCLUSIONES

Los nanosistemas de ASH con BVZ mostraron resultados prometedores para el tratamiento de la NVC.

El proceso de desolvatación no afecta la integridad del BVZ y las NP-BVZ sin el agregado de AE mantuvieron su estabilidad coloidal en el tiempo. Las modificaciones con los AE se realizaron para evaluar la diferencia entre las NP con AE y las NP-BVZ solas.

Los ensayos de liberación mostraron que el BVZ se liberó lentamente de las NP-GANTREZ en comparación a las NP-PEG y NP-BVZ. Por otro lado, los ensayos *in vivo* (en un modelo de NVC de corneal en ratón) han mostrado una disminución de los neovasos superior en las córneas tratadas con NP cargadas con BVZ respecto la formulación de BVZ comercial.

***CONCLUSIONES
FINALES***

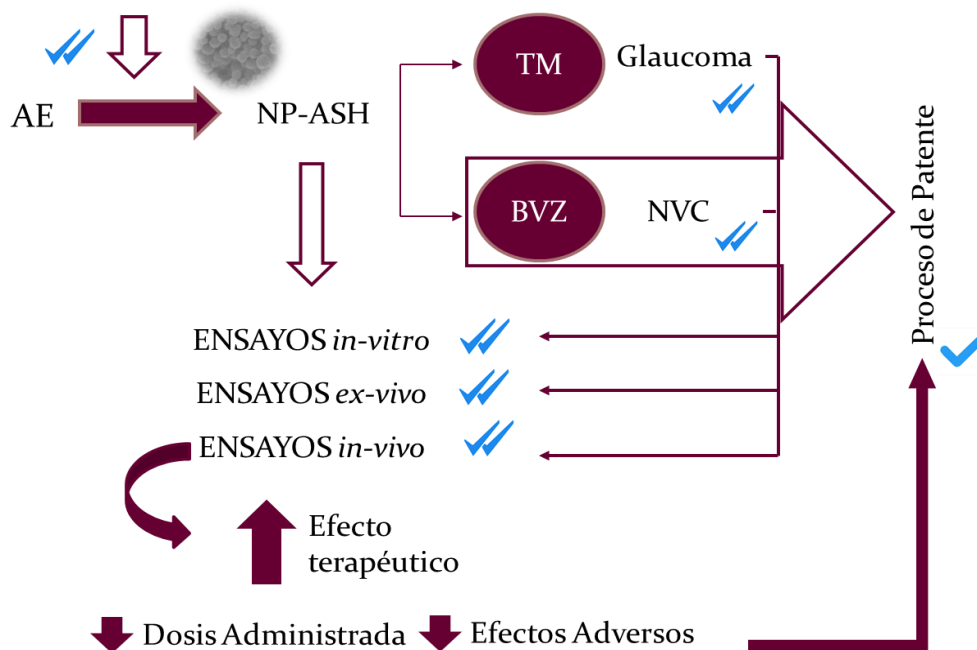
CONCLUSIONES FINALES

La albumina sérica humana mostro excelentes propiedades para la formulación de nanopartículas poliméricas, lo cual se suma a las ventajas de ser un polímero no toxico, biodegradable, sin actividad antigénica y con numerosos grupos funcionales

El proceso de coacervación utilizado para la obtención de las NP fue sencillo, rápido, reproducible (Weber, Coester, et al. 2000) y la estabilidad coloidal de las NP obtenidas se logró al añadir un AE. En este trabajo de tesis se evaluaron cuatro AE nuevos para sustituir al glutaraldehído y la estabilidad coloidal se logró por algún tipo de interacción entre AE y la ASH. Mediante ensayos FTIR se corrobora una modificación en las bandas amida I y II (características de la ASH) en el espectro de las NP respecto al espectro de la proteína, lo cual confirma un cambio en la estructura secundaria de la ASH al formar NP.

A forma de resumen en la siguiente figura se esquematizo la metodología de trabajo realizado.

Ensayos pre formulación



Esquema del trabajo realizado para el desarrollo de NP de ASH

De las NP-ASH obtenidas podemos concluir que:

✚ Las NP sin F obtenidas fueron sistemas con TMP aprox. a de 200nm, monodispersos, esféricas, con una superficie homogénea y un rendimiento del proceso alto. Mediante el proceso de liofilización se obtuvieron NP sólidas, hecho que favoreció la estabilidad fisicoquímica a largo plazo del sistema. Al ser redispersado el polvo en medio acuoso, los NP mostraron una estabilidad coloidal de 20 días, excepto el caso de los sistemas estabilizados con PEG (hecho atribuido a las características hidrosolubles del PEG como AE).

A su vez, las NP-ASH mostraron una osmolaridad y pH en el rango adecuado para no causar molestia tras la administración ocular, hecho confirmado mediante los ensayos *in vivo* en conejos que mostraron ausencia de irritación o daño en la superficie ocular tras la administración de las formulaciones.

Mediante los ensayos *in vivo* en ratas de los sistemas estudiados mostraron excelentes propiedades bioadhesivas ya que permanecieron en el tejido ocular al menos 17 h pos administración, y no hay acumulación de la formulación en otros órganos del cuerpo por tiempo prolongados.

✚ Las NP-ASH para la vehiculización de TM fueron sistemas monodispersos de un tamaño medio de aprox. de 200nm.

En los ensayos *in vitro* las NP modularon la liberación del TM a excepción de los sistemas NP-PEG-TM (ya que fueron sistemas inestables en medio acuoso).

Por otro lado, las NP con TM entrecruzadas con los nuevos AE estudiados mostraron ser promotores de la permeación en los ensayos *ex vivo* de permeación tras corneal. Este resultado fue confirmado mediante los ensayos *in vivo* de farmacocinética, los cuales mostraron que el TM permear hacia el interior del ojo dentro de los 30 min pos instilación en comparación a la solución de TM, cuyo valor fue a los 60 min. Posteriormente, mediante los

ensayos de farmacodinamia se observó que el TM permeado disminuye considerablemente la PIO (con una máxima de disminución entre el 20-25 %) y dicha disminución fue comparativamente más prolongada en el tiempo respecto a la FC (5 veces más concentrada).

✚ Respecto las NP con BVZ, al ser el BVZ un anticuerpo con numerosos grupos funcionales, sin el agregado de AE se obtuvieron NP-BVZ con adecuada estabilidad coloidal cuyo TMP fue de aproximadamente 300nm. Paralelamente, se formularon nanosistemas de BVZ con los AE, cuyos sistemas mostraron un TMP menor a las NP sin AE. A su vez, el proceso de coacervación no afectó la integridad del BVZ lo cual fue confirmado por electroforesis microfluídica.

El perfil de liberación del BVZ desde los sistemas nanométricos fue bifásico, cuya liberación inicial correspondió al BVZ en la superficie de la NP y la liberación lenta al anticuerpo encapsulado.

Por último, en los ensayos *in vivo* en un modelo de NVC las NP-PEG-BVZ y NP-BVZ mostraron una disminución más pronunciada del área afectada por los neovasos en comparación con la FC tras una semana de tratamiento y en una menor concentración diaria.

Por lo tanto, los sistemas nanométricos formulados mostraron un efecto farmacológico y un efecto terapéutico superior a las respectivas FC en menores concentraciones, lo cual llevaría a una disminución de los efectos adversos y una mayor adherencia al tratamiento.

*Referencias
Bibliográficas*

A

- Abrishami, M. y cols., 2009. Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (avastin) for intravitreal administration. *The journal of retinal and vitreous diseases* ,29(5), pp.699-703.
- Aggarwal, D. y Kaur, I.P., 2005. Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1-2), pp.155-159.
- Agüeros, M.y cols., 2009. Bioadhesive properties and biodistribution of cyclodextrin-poly(anhydride) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3-4), pp.231-240.
- Anhchuong, L. y cols., 2003. Open-Angle Glaucoma: The Visual Impairment Project. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44 (9), pp. 3783-3789
- Andres-Guerrero, V. y Herrero, V.R., 2008. Absorción de fármacos por vía tópica, papel de la conjuntiva. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, pp.683-685.
- Anhorn, M.G. y cols., 2008. Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1-2), pp.162-169.
- Arnedo, A. y cols., 2002. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1-2), pp.59-72.

B

- Bachmann, B.O. y cols., 2008. Promotion of graft survival by vascular endothelial growth factor a neutralization after high-risk corneal transplantation. *Archives of ophthalmology*, 126(1), pp. 71-77.
- Bae, S y cols., 2012. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles surface-modified with TNF-related apoptosis-inducing ligand and transferrin for targeting multiple tumor types. *Biomaterials*, 33, pp. 1536-46.
- Baer, J.C., Foster, C.S., 1992. Corneal laser photocoagulation for treatment of neovascularization. Efficacy of 577 nm yellow dye laser. *Ophthalmology*, 99(2), pp. 173-179.

- Bakri, S.J. y cols., 2007. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology*, 114(5), pp.855-859.
- Banker G., 2002. Drug Products: Their Role in The tratment of disease, their quality, and their status as drug delivery systems. En: Banker G, Rhodes C. *Modern Pharmaceutics*. 4ra ed. Editorial Marcel Dekker. Nueva York: 1-20.
- Battaglia, L. y cols., 2015. Bevacizumab loaded solid lipid nanoparticles prepared by the coacervation t echnique: preliminary *in vitro* studies. *Nanotechnology*, 26(25), pp. 255102.
- Bock, F. y cols., 2007. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(6), pp.2545-2552.
- Boiero, C. y cols., 2015. RP-HPLC method development for the simultaneous determination of timolol maleate and human serum albumin in albumin nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, pp.186-189.
- Bourlais, C.L. y cols., 1998. Ophthalmic drug delivery systems--recent advances. *Biochemistry*, 72, pp. 248-254
- Bradford, A. , 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254
- Bronze-Uhle, E.S. y cols., 2017. Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid. *Nanotechnology, Science and Applications*,10, pp. 11-21.
- Bosquillon, C. y cols., 2004. Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders. *Journal of Controlled Release*, 99, pp. 357-367.
- Burstein, N.L., 1997.Ophthalmic drug formulations. En: Clinical Ocular Pharmacology. Ed: Barletty Jaanus, p. 21-45.

C

- Carlsson, N. y cols., 2011. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. *Analytical Biochemistry*, 411(1), pp.116–121.
- Chang, J.H. y cols., 2012. Corneal neovascularization: An anti-VEGF therapy review. *Survey of Ophthalmology*, 57(5), pp.415–429.
- Cheng SF y cols., Short-term topical bevacizumab in the treatment of stable corneal neovascularization. *American Journal of Ophthalmology*, pp. 154, pp. 940–948.
- Conley, R.T., 1979. Espectroscopia infrarroja. Editorial Alhambra S.A. Madrid – España.
- Costa, P. y Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), pp.123–133.
- Costa, B.C. y cols., 2017. Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid,. *Nanotechnology, Science and Applications*, 10, pp.11–21.
- Couvreur, P., 2013. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), pp.21–23.

D

- Das, S. y cols., 2005. Aspirin loaded albumin nanoparticles by coacervation: Implications in drug delivery. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 18(2), pp.203–212.
- Das, S. y cols., 2012. Protein based nanoparticles as platforms for aspirin delivery for ophthalmologic applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, pp.161–168.

- Dastjerdi, M.H. y cols., 2011. Corneal penetration of topical and subconjunctival bevacizumab. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(12), pp.8718-8723.
- Dastjerdi, M.H. y cols., 2010. Topical bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study. *Arch Ophthalmol*, 127(4), pp.381-389.
- De Ascentiis, A. y cols., 1995. Mucoadhesion of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) is improved when linear poly (ethylene oxide) chains are added to the polymer network. *Journal of Controlled Release*, 33, pp.197-201.
- DeStafeno, J.J. y Kim, T., 2007. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Archives of ophthalmology*. 125, pp. 834-610.
- Del Amo, E.M y Urtti, A., 2008. Current and future ophthalmic drug delivery systems. *Drug Discovery Today*. 13 (3), pp. 135-143.
- Diebold, Y. y Calonge, M., 2010. Progress in Retinal and Eye Research Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(6), pp.596-609.
- Díez Gomez, M., 1999. Tratamiento del glaucoma. *Sistema Nacional de Salud* ,23, pp.1-6.
- Dikstein S, Maurice DM. 1972. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *Journal of Physiology*, 221 (1), pp. 29-41.
- Doane, M.G. y cols., 1978. Penetration routes of topically applied eye medications. *American Journal of Ophthalmology*, 85, pp. 383-386.
- Dreis, S. y cols., 2007. Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 341(1-2), pp.207-214.
- DrugBank. (2013). Bevacizumab. Consultado el 13 de junio de 2017 de <https://www.drugbank.ca/drugs>
- Duraira, C., 2016. Ocular Pharmacokinetics. En: Barrett, James E. ed.: Part of the series Handbook of Experimental Pharmacology. Ed.: Handbook of Experimental Pharmacology. San Diego, E.E.U.U. SpringerLink: pp. 1-25

E

Elzoghby, A.O. y cols., 2012. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157(2), pp.168-182.

F

Feinstein, S.B. y cols., 1990. Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *Journal of the American College of Cardiology*, 16, pp. 316-324.

Ferrara, N., 2004. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25(4), pp.581-611.

Figueroa-ortiz, L.C. y cols., 2016. Crecimiento neovascular en un modelo experimental de quemadura corneal por álcali. *Archivos de la sociedad Española de oftalmología*, 89(8), pp.303-307.

Fraga López, F y cols., 2009. Estudio calorimétrico de la reticulación del copolímero metilviniléter y anhídrido maleico. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(2), pp.95-109.

Frokjaer, S. y Otzen, D.E., 2005. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(4), pp.298-306.

Fukumori, Y. y Ichikawa, H., 2006. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Advanced Powder Technology*, 17(1), pp.1-28.

G

Gadkari, S.S., 2007. Evaluation of 19 cases of inadvertent globe perforation due to periocular injections. *Indian Journal of Ophthalmology*, 55, pp. 103-7

Gaihre, B. y cols., 2009. Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and *in vitro* drug release study. *International Journal of Pharmaceutics*, 365(1-2), pp.180-189.

- Gaumet, M. y cols., 2008. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), pp.1-9.
- Gibaldi, M. y Perrier, D., 1982. Pharmacokinetics, revised and expanded 2nd Ed. Editorial Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp.45-109
- Gómez-gaete, C., 2014. Polymeric nanoparticles : technologie and pharmaceutical applications . *Revista farmacologica de Chile*, 7(2), pp.7-16
- Gómez, S. y cols. ., 2006. Development of a novel vaccine delivery system based on Gantrez nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 6(9-10), pp.3283-9
- Gonzalez, L. y cols., 2013. Nanotechnology in Corneal Neovascularization Therapy— A. Review. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(2):124-34.
- Gosh, P. y cols., 2017. Preparation of albumin based nanoparticles for delivery of fisetin and evaluation of its cytotoxicactivity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, pp. 408-417.
- Grainger, D.W., 2004. Controlled-release and local delivery of therapeutic antibodies. *Expert opinion on biological therapy*, 4(7), pp.1029-1044.
- Guerrero, A.V. y cols., n.d. Formulaciones oftálmicas y nuevos vehículos en el tratamiento médico hipotensor y neuroprotector del glaucoma. [en línea], consultado: 20 de mayo 2017, www.oftalmoseoformacion.com.

H

- Hosoya, K., Lee, V.H. y Kim, K.J., 2005. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, pp. 227-240
- Huang, J. y cols., 2017. Ocular Cubosome Drug Delivery System for Timolol Maleate: Preparation, Characterization, Cytotoxicity, *ex vivo*, and *in vivo* Evaluation. *AAPS PharmSciTech*,

I

- Ibrahim, N.K., y cols., 2002. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor- free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel, *Clinical Cancer Research*, 8, pp. 1038–1044
- InnovaOcular. Clinica del Dr. Soler. [en linea], consultado: 20 de abril de 2017, disponible en: www.drsoles.com.
- Initiative, N.N. y Society, R., 2008. Nanomedicinas: La disrupción de la nanotecnología en el mundo farmacéutico pp.13–26.
- Irache, J.M. y cols. , 2011. Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2), pp.47–71.

J

- Jain, A. y cols. , 2008. PEGylation: an approach for drug delivery. A review. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 25, pp. 403–447.
- Jarvinen, K. y cols., 1995. Ocular absorption following topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, pp. 3–19.
- Jahanshahi, M., Najafpour, G. y Rahimnejad, M., 2008. Applying the Taguchi method for optimized fabrication of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles as drug delivery vehicles. *African Journal of Biotechnology*, 7(4), pp.362–367.
- Jesus Mallol, 2008. *Manuela de Radio farmacia*. ed. Diaz de Santos España pag 79.
- Journal, A.I. y cols., 2016. Chitosan-coated PLGA nanoparticles of bevacizumab as novel drug delivery to target retina : optimization , characterization , and *in vitro* toxicity evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 0(0), pp. 1–10.
- Jun, J. y cols., 2011. Preparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method. *Food Chemistry*, 127(4), pp. 1892–189

K

- Keating, A.M. y Jacobs, D.S., 2011. Anti-VEGF treatment of corneal neovascularization. *The Ocular Surface*, 9(4), pp.227–238.
- Khutoryanskiy, V., 2011. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromolecular Bioscience* 11:748–64.
- Kim, J.H. y cols., 2005. Stability of bovine serum albumin complexed with PEG-poly(L-histidine) diblock copolymer in PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, 109(1–3), pp.86–100.
- Kim, S.H. y cols., (2008) Drug elimination kinetics following subconjunctival injection using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Pharmaceutical Research*, 25(3), pp-512–520.
- Korsmeyer, R.W.y cols., 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), pp.25–35.
- Kratz, F., 2008. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), pp.171–183.
- Kumar, P.V. y Jain, N.K., 2007. Suppression of agglomeration of ciprofloxacin-loaded human serum albumin nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, 8(1), pp.17.
- Kumari, S., y cols., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, pp. 1–18.

L

- Lama, P.J. Systemic adverse effects of beta-adrenergic blockers: an evidence-based assessment. *American Journal of Ophthalmology*, 134, pp.749–760.
- Langer, K. y cols., 2008. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1–2), pp.109–117.
- Langer, K. et al., 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1–2), pp.169–180.

- Lavik, E., Kuehn, M.H. & Kwon, Y.H., 2011. Novel drug delivery systems for glaucoma. *Eye(Lond)*, 25(5), pp.578–586.
- Lee, P.I., 1985. Kinetics of drug release from hydrogel matrices. *Journal of Controlled Release*, 2(C), pp.277–288.
- Lee, V.H.L. y Robinson, J.R., 1979. Mechanistic and quantitative evaluation of precornea pilocarpine disposition in albino rabbits. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68: 673–684.
- Lera, R. y Duran, J.A., 2009. Nevascularización corneal: aspectos etiopatológicos y nuevas perspectivas de tratamiento. *Superficie Ocular y corneal*, 3: 5-15.
- Lin, W. y cols., 1999. Preparation and in vitro characterization of HSA-mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 189(2), pp.161–170.
- Lin, W. et al., 1994. Preparation of Sterically Stabilized Human Serum Albumin Nanospheres Using a Novel Dextranox-MPEG Crosslinking Agent. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 11(11), pp.1588–1592.
- Li, V.H. y cols., 1986. Ocular drug delivery of progesterone using nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, 3: 213-218.
- Lora, M. y Andr, I., 2005. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Ámbito Farmacéutico: Oftalmología*, 24(2),pp:88-96.
- Lu, Y. y cols., 2014. Effect of intravitreal injection of bevacizumab-chitosan nanoparticles on retina of diabetic rats. *International journal of ophthalmology*, 7(1), pp. 1–7.
- Lu, X. y Pikal, M., 2004. Freeze-drying of mannitol–trehalose–sodium chloride-based formulations: the impact of annealing on dry layer resistance to mass transfer and cake structure. *Pharmaceutical Development and Technology*, 9, pp. 85–95.

M

- Maghsoudi, A. y cols., 2008. 5-Fluorouracil-loaded BSA nanoparticles: Formulation optimization and *in vitro* release study. *AAPS PharmSciTech*, 9(4), pp. 1092–1096.
- Manzano, R.P. y cols., 2007. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *British Journal of Ophthalmology*, 91, pp. 804–807
- Mari, K. y cols., 2015. Characterization of Paracellular and Aqueous Penetration Routes in Cornea , Conjunctiva , and Sclera. *Investigative Ophthalmology Visual Scienc*, 38(3), pp.627–634.
- Maul, E. y Puente, D., 2011. Glaucoma. Escuela de Medicina: Departamento de Oftalología, Barcelo, España.
- Merodio, M. y cols., 2000. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: Characterization and *in vitro* release properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), pp.251–259.
- Merodio, M. y cols., 2002. Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats. *Biomaterials*, 23(7), pp.1587–1594.
- Migneault, I. y cols., 2004. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), pp.790–802.
- Mohamed, A.M.I., Abdel-Wadood, H.M. y Mousa, H.S., 2014. Simultaneous determination of dorzolomide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid-liquid microextraction combined with HPLC. *Talanta*, 130, pp.495–505.
- Moisseiev, E. y cols., 2014. Pharmacokinetics of bevacizumab after topical and intravitreal administration in human eyes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 252(2), pp.331–337.
- Monnier, Y., Zaric, J. y Rüegg, C., 2005. Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti inflammatory drugs: from the bench to the bedside and back. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 4(1):31–38.

Moosa, R.M. y cols., 2014. In vivo evaluation and in-depth pharmaceutical characterization of a rapidly dissolving solid ocular matrix for the topical delivery of timolol maleate in the rabbit eye model. *International Journal of Pharmaceutics*, 466(1-2), pp.296-306.

N

Nagarwal, R.C. y cols., 2009. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 136(1), pp.2-13.

Nahar, M. y cols., 2006. Functional polymeric nanoparticles: An efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 23 (4):259-318,

Nasir, F. y cols., 2011. Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(30), pp.3434-3443.

Naveenraj, S. y Anandan, S., 2013. Binding of serum albumins with bioactive substances - nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 14, pp. 53-71.

O

Ob, V. y cols., 2015. Corneal neovascularization and biological therapy. , 8(4), pp.444-448.

Ofri, R. y Narfström, K., 2007. Light at the end of the tunnel? Advances in the understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration. *Veterinary journal*, 174(1), pp.10-22.

P

- Paik, S.Y.R y cols., 2013. Robust size control of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by intermittent addition of a desolvating agent and the particle formation mechanism. *Food Chemistry*, 141(2), pp.695–701.
- Palma, S.D. y cols., 2009. An efficient ternary complex of acetazolamide with HP- β -CD and TEA for topical ocular administration. *Journal of Controlled Release*, 138(1), pp.24–31.
- Pan, C.K. y cols., 2011. Comparison of long-acting bevacizumab formulations in the treatment of choroidal neovascularization in a rat model. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 27(3), pp.219–24.
- Papathanassiou, M. y cols., 2008. Inhibition of Corneal Neovascularization by Subconjunctival Bevacizumab in an Animal Model. *American Journal of Ophthalmology*, 145(3).
- Patel, A. y cols., 2015. Ocular drug delivery systems: An overview. *World journal of pharmacology*, 2(2), pp.47–64.
- Patel, D.J. y Patel, J.K., 2010. Mucoadhesive effect of polyethyleneoxide on famotidine nanosuspension prepared by solvent evaporation method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2:122–7.
- Pérez-Martínez, D. y cols., 2010. Intracellular antibodies and cancer: New technologies offer therapeutic opportunities. *BioEssays*, 32(7), pp.589–598.
- Perren, T. y cols., 2011. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *The New England journal of medicine*, 365(26), pp.2484–96.
- Pignatello, R. y cols., 2002. Ocular Tolerability of Eudragit RS100 and RL100 Nanosuspensions as Carriers for Ophthalmic Controlled Drug Delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 91(12), pp. 2636–41.
- Piñero, R.T y cols., 2005. Glaucoma: Patogenia, diagnóstico y tratamiento, *Ámbito farmacéutico: Oftalmología*, 24 (2), pp. 88–96
- Podaralla, S. K., y Perumal, O. P., 2009. Design and Formulation of Protein-Based NPDDS. en: *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. Ed. por: Pathak, Y. S. y Thassu, D., Nueva York: Informa Healthcare, 69–91.

Prausnitz, M.R. y Noonan, J.S., 1998. Permeability of Cornea, Sclera, and Conjunctiva: A Literature Analysis for Drug Delivery to the Eye. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(12), pp.1479–1488.

Podaralla, S.K y cols.,2009.Design and Formulation of Protein-Based NPDDS en: Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization. ED por: Pathak Y y Thassu D. New York: 69-91

Q

Quinteros, D. y cols., 2016. Novel Polymeric Nanoparticles Intended for Ophthalmic Administration of Acetazolamide. *Journal of Pharmaceutical*, 105(10):3183-90

R

Ramaiah, B.y cols, 2016. High azithromycin concentration in lungs by way of bovine serum albumin microspheres as targeted drug delivery: lung targeting efficiency in albino mice. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, pp.1–11.

Reimondez-Troitiño, S. y cols., 2015. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 95, pp.279–293.

Resnikoff, S. y cols., 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(11), pp. 844–51

Rohiwal S.S. y Pawar S.H., 2014. Synthesis and Characterization Of Bovine Serum Albumin Nanoparticles As A Drug Delivery Vehicle. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(4), pp.51–57.

Rohiwal, S.S. y cols., 2015. Investigating the influence of effective parameters on molecular characteristics of bovine serum albumin nanoparticles. *Applied Surface Science*, 334(11), pp.157–164.

Rowe, R., Sheskey, P.J. y Owen, S.C. 2006. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Edición 5ta. Editorial: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. USA, pp. 159,553.

S

- Sah, A.K. y Suresh, P.K., 2017. Medical management of glaucoma: focus on ophthalmologic drug delivery systems of timolol maleate. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(3), pp.448–459.
- Sanchez-Martanez, M. et al., 2013. Radiolabeling and biodistribution studies of polymeric nanoparticles as adjuvants for ocular vaccination against brucellosis. *Revista Espanola de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*, 32(2), pp.92–97.
- Schmidl, D. y cols., 2015. Pharmacotherapy of glaucoma. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 31(2), pp.63–77.
- Schlereth, S.L. y cols., 2014. Absence of lymphatic vessels in the developing human sclera. *Experimental Eye Research*, 125, pp.203–209.
- Sena, D. y Lindsley, K. 2013 Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 28;(2), pp. 1- 36
- Simón-Yarza, T. y cols. , 2013. PEGylated-PLGA microparticles containing VEGF for long term drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 440(1), pp.13–18.
- Shulin D. 1998.Recent developments in ophthalmic drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1 (8), pp.328-335.
- Smart, J.D., 2005. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, pp. 1556–68
- Sommer A. y cols., 1991. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. *Archives of ophthalmology*, 109(8), pp. 1090-5.
- Sosnik, A., Das Neves, J. y Sarmiento, B., 2014. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Progress in Polymer Science*, 39(12), pp.2030–2075.
- Sousa, F. y cols., 2017. Nanoparticles for the delivery of therapeutic antibodies : Dogma or promising strategy ? *Expert Opinion on Drug Delivery*, 0(0).
- Sunil, A. y cols., 2007. Chitosan Nanoparticles for Prolonged Delivery of Timolol Maleate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 33, pp. 1254–1262.

T

- Tamber, H.y cols., 2005. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, pp. 357-376.
- Tan, G. y cols., 2017. Bioadhesive chitosan-loaded liposomes: A more efficient and higher permeable ocular delivery platform for timolol maleate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, pp.355-363.
- Tártara, L.I., 2013. Efecto del sistema portador sobre la biodisponibilidad intraocular de fármacos. Doctor en Medicina y Cirugía. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Tártara, L.I. y cols. , 2012. Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 28(2), pp.102-109.
- Tártara, I. y cols., 2008. Uso racional de tecnologías sanitarias: Tratamiento del glaucoma. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(2), pp.297-302.
- Tártara, L.I. y cols., 2012. Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 28(2), pp.102-109.
- Thakkar, H.y cols., 2005. Albumin microspheres as carriers for the antiarthritic drug celecoxib. *AAPS PharmSciTech*, 6(1), pp. 65-73
- Toutain, PL y Bousquet-Mélou, A., 2004. Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27 (6), pp. 455-66.

U

- Urtti, A., 2006. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(11), pp.1131-1135.
- USP 31-NF 26 ,2008. The United Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville, Maryland: The United Pharmacopeial Convention.

Uusitalo, H. y cols., 2006. Improved systemic safety and risk–benefit ratio of topical 0.1 % timolol hydrogel compared with 0.5 % timolol aqueous solution in the treatment of glaucoma. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244, pp. 1491–1496.

Uy HS y cols., 2008. Topical bevacizumab and ocular surface neovascularization in patients with Stevens-Johnson Syndrome. *Cornea*, 27, pp. 70–3.

V

Valls, O. y del Castillo, B., 1998. *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de La Salud*. 4ta Edición Ediciones Piro. Barcelona. España

Van Miller, J.P. y cols., 2002. Chronic toxicity and oncogenicity study with glutaraldehyde dosed in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology*, 175(1–3), pp.177–189.

Varshochian, R. y cols., 2015. Albuminated PLGA nanoparticles containing bevacizumab intended for ocular neovascularization treatment. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(10), pp.3148–3156.

Varshochian, R. y cols., 2013. The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(3–4), pp.341–352.

Villafuerte-Robles, L., 2009. Nanotecnología Farmacéutica. *Razón y Palabra*, 68(1), pp.1–20.

W

Wacker, M. y cols., 2011. A toolbox for the upscaling of ethanolic human serum albumin (HSA) desolvation. *International Journal of Pharmaceutics*, 414, pp. 225–232.

Wang, G. y Uludag, H., 2008. Recent developments in nanoparticle-based drug delivery and targetingsystems with emphasis on protein-based nanoparticles. *Expert Opinion Drug Delivery*, 5:499–515.

Weber, C. y cols., 2000. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 194(1), pp.91–102.

Weber, C. y cols., 2000. Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. *International Journal of Pharmaceutics*, 211(1–2), pp.67–78.

Weber, C. y cols., 2000. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(2), pp.197–200.

Webster, TJ. 2006. Nanomedicine: what's in a definition. *Journal of International Journal of Nanomedicine*, 1, pp. 115–116.

Y

Yadav, S.C. y cols., 2011. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*, 32(1), pp.173–187.

Yandrapu, S.K. y cols., 2013. Nanoparticles in porous microparticles prepared by supercritical infusion and pressure quench technology for sustained delivery of bevacizumab. *Molecular Pharmaceutics*, 10(12), pp.4676–4686.

Yoncheva, K., 2005. Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): preparation and evaluation of their bioadhesive properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, pp. 411–419

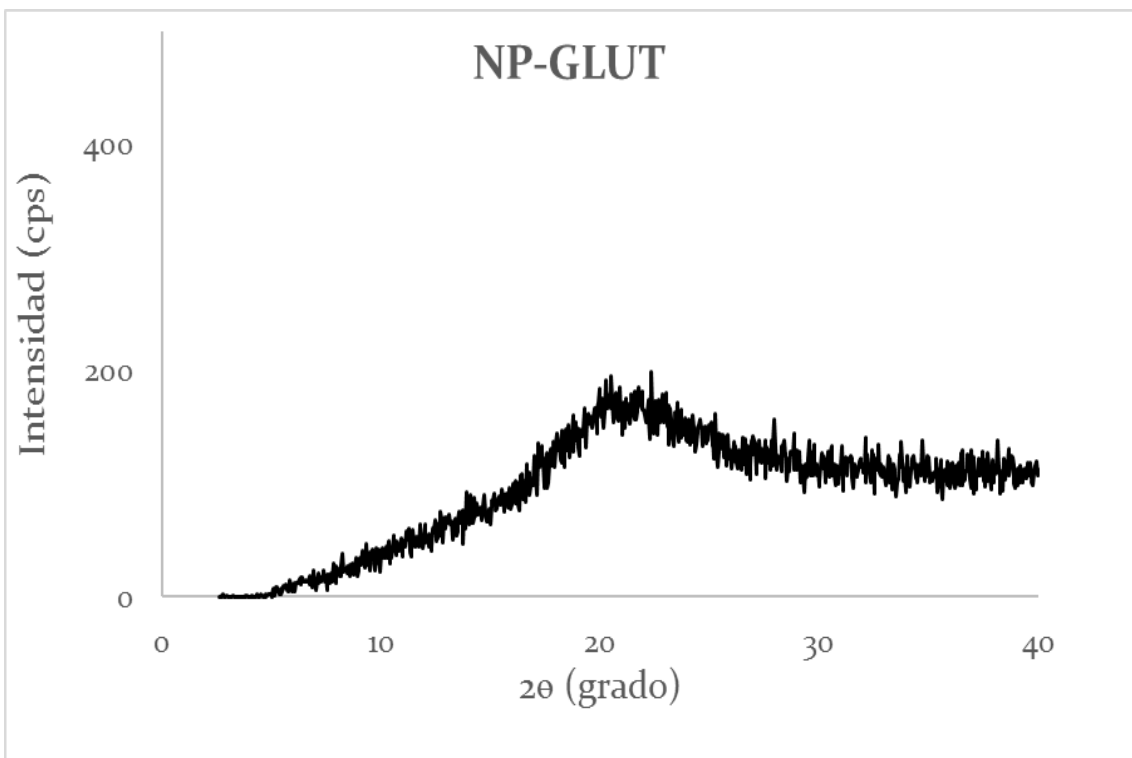
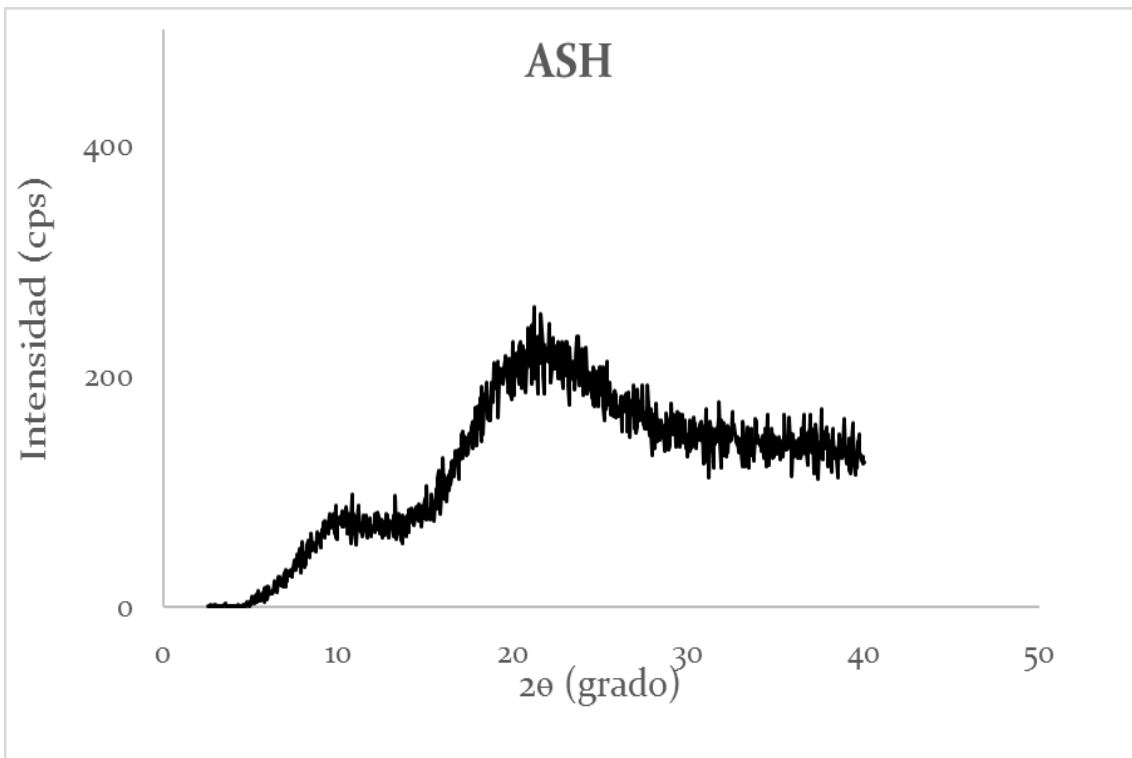
Z

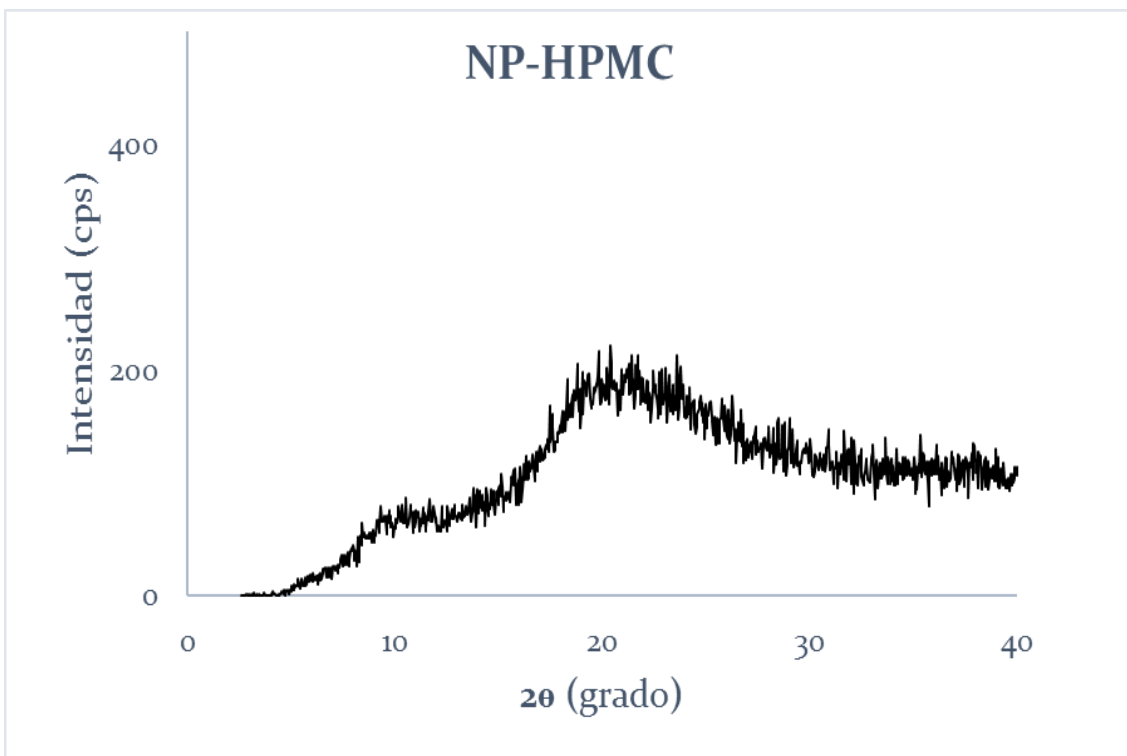
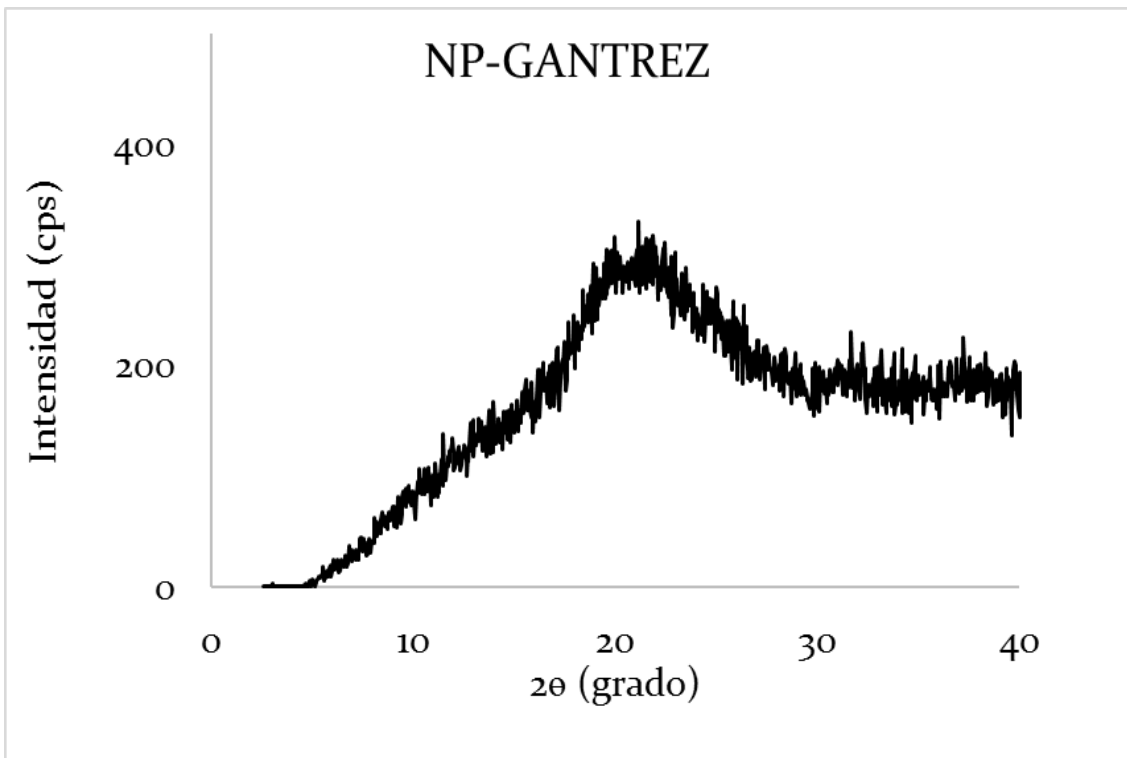
Zhao, D. y cols., 2010. Preparation, characterization, and *in vitro* targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 20(5), 669–677.

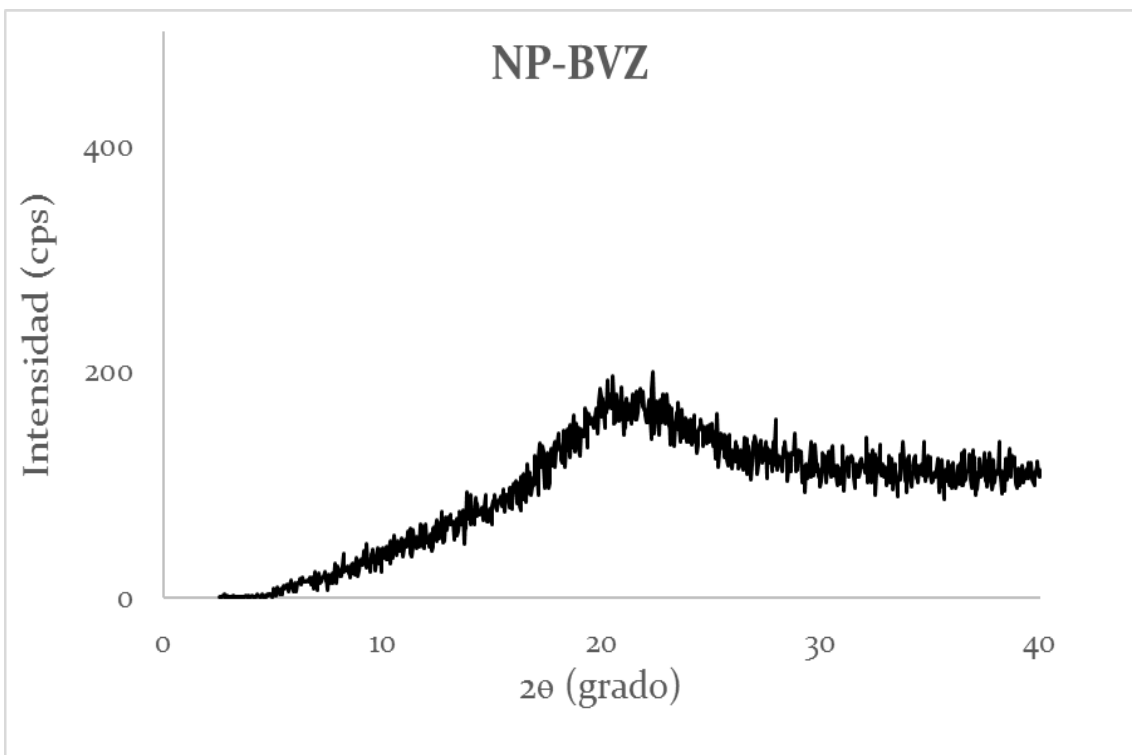
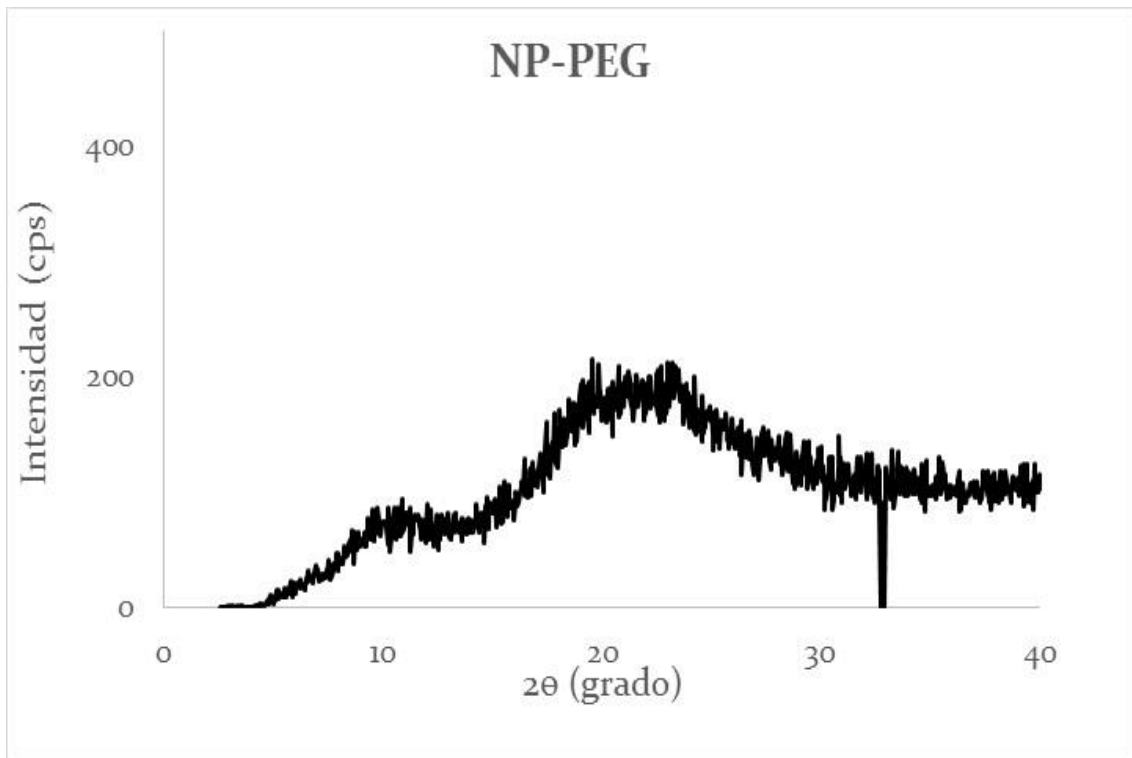
Zhu, Q. Y cols., 2008. Vitreous Levels of Bevacizumab and Vascular Endothelial Growth Factor-A in Patients with Choroidal Neovascularization. *Ophthalmology*, 115(10) 1750–1755.

Zuo, L. Y cols., 2010. A siRNA targeting vascular endothelial growth factor-A inhibiting experimental corneal neovascularization. *Current Eye Research*. 35 (5), pp. 375-384.

Anexo 1
Difractogramas







Publicaciones generadas a partir de esta tesis

Boiero, C., Allemandi, D.A., Longhi, M. y Llabot, J.M., 2015. RP-HPLC method development for the simultaneous determination of timolol maleate and human serum albumin in albumin nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, pp. 186-189.

Battistini F.D., Tártara, L.I, **Boiero, C.**, Guzmán, M.L., Luciani-Giacobbe, L.C., Palma, S.D., Allemandi, D.A., Manzo, R.H., Olivera M.E., 2017. The role of hyaluronan as a drug carrier to enhance the bioavailability of extended release ophthalmic formulations. Hyaluronan-timolol ionic complexes as a model case. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 121(5), pp. 188-194.

Patentes generadas a partir de esta tesis

Patente en trámite. N° de solicitud: **EP17382383.2**. **Titulo:** ALBUMIN NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF CANCER AND OCULAR DISEASES