



«DISEÑO Y EVALUACIÓN DE
NUEVOS SISTEMAS
FARMACÉUTICOS
NANOPARTICULADOS PARA EL
MEJORAMIENTO DEL
TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA»

Farm. Carolina Del Valle Bessone

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

*Departamento de Ciencias Farmacéuticas - Unidad de
Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica –*

CONICET

•2021•



Departamento de
CIENCIAS
FARMACÉUTICAS



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas



Universidad
Nacional
de Córdoba

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE NUEVOS SISTEMAS FARMACÉUTICOS NANOPARTICULADOS PARA EL MEJORAMIENTO DEL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA

Trabajo de Tesis Doctoral para acceder al grado de
Doctor en Ciencias Químicas de

Farm. Carolina Del Valle Bessone

Director

Prof. Dr. Daniel Allemandi

Comisión Evaluadora

Prof. Dra. Daniela Alejandra Quinteros

Prof. Dra. Marisa Martinelli

Prof. Dr. Dante Beltramo

Prof. Dra. Romina Glisoni

*A mi amor Maxi,
a mis padres Lucy y Nito...*

AGRADECIMIENTOS

“Los grandes logros de cualquier persona generalmente dependen de muchas manos, corazones y mentes ”

Quiero agradecer de corazón a todas las personas que me acompañaron durante todos estos años de tesis, quienes, de una manera u otra, estuvieron presente en este largo camino y formaron parte de este logro académico, que me permitió crecer tanto a nivel profesional como personal.

A mi director, Dani, por darme la posibilidad de desarrollar este proyecto de tesis e iniciar una nueva etapa en el mundo de la investigación. Gracias por su enseñanza y por la libertad de ir eligiendo mi propio camino y apoyarme en las decisiones que se iban presentando.

A Dani, mi mentora, por confiar en mi desde el principio, por guiarme y acompañarme durante todo el recorrido. Gracias por transmitirme tus conocimientos, experiencias, ideas y dedicación constante. También, agradecerte por aceptar ser miembro propuesto de mi comisión asesora, tus aportes fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la comisión evaluadora, Dra. Marisa Martinelli y Dr. Dante Beltramo por sus valiosos aportes durante el desarrollo de la tesis, por su acompañamiento y buena predisposición para ayudar a mi formación académica. A la Dra. Romina Glisoni por haber aceptado participar como evaluadora externa del presente trabajo doctoral.

Al Dr. Watson Loh por recibirme y dejarme formar parte de su laboratorio, por sus grandes aportes a este trabajo de tesis y por su predisposición ante cada consulta. A Parinaz, por compartir conmigo su experiencia y sabiduría, por guiarme en cada experimento y por su compromiso con este proyecto. También, por acompañarme en todo momento durante mi estadía en Campinas.

Al Dr. Hugo Fajreldines y Dr. José Luna, por su tiempo y ayuda desinteresada, por la buena predisposición y dedicación en contribuir a este trabajo. A la Dra. Ágata Carpentieri por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme sus conocimientos.

Al Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas (UNC) y UNITEFA, unidad ejecutora del CONICET, por brindarme el espacio físico para desarrollar esta tesis doctoral y, a las instituciones y programas que realizaron el aporte económico para poder llevarla a cabo: CONICET, FONCYT y SECyT-UNC. A los organismos que brindaron apoyo económico en mi estadía de investigación mediante el programa de movilidad de posgrado de la Red de Macrouiversidades de América Latina y el Caribe.

A Meli, mi gema/hermana del corazón, mi amiga incondicional, agradecida a la vida de cruzarte en mi camino. GRACIAS por cada momento compartido juntas, por tus abrazos y charlas eternas, por acompañarme y apoyarme siempre sin importar de tiempos ni distancias. Gracias por esta amistad incondicional.

Al team 209, Aye y Ceci, por el tiempo que pudimos compartir en nuestra vuelta al laboratorio, las charlas y la buena onda para trabajar; y en especial, a mi co-equiper Sofi, por tu hermosa amistad, por estar siempre dispuesta ayudarme y acompañarme en cada ensayo/conejada, sin importar el día ni la hora, y porque además de ser una excelente compañera, encontré una amiga de corazón.

A Flori, Juli, Romi, Li, Lu, Euge y Sofi's, amigas que me regaló el doctorado durante todos estos años, gracias por todos los momentos compartidos y por su hermosa amistad. A Flori, Li, y Lu, gracias por su ayuda incondicional desde el momento que comencé mis días en el laboratorio, por las charlas eternas, catarsis, juntadas y por estar siempre presentes. A Euge y Sofi's, gracias por las risas, salidas, juntadas, after office, encuentros virtuales, por hacer más lindos los días en el laboratorio. En especial a Euge, gracias por tu cariño, mensajitos de aliento y por regalarme la posibilidad de ser tía del corazón de Tomi ♥!

A mis amigos del 114 (ex 209) por el aguante diario, la ayuda en los ensayos, los mates pre-pandemia, la empatía y la buena onda para trabajar. A Juampi y Tamy, porque encontré en ustedes una amistad más allá del laboratorio. A Carito Boie y Gringuis, por su contención, sus consejos, su ayuda incondicional y la linda amistad que construimos. A mis compañeros de docencia Fran, Nahue, Romi y Sofi, por enfrentar juntos este desafío de la virtualidad, siempre con buenas energías y poniendo lo mejor, a pesar del contexto de pandemia.

A todo el equipo del 210, por su compañerismo y buena predisposición en todo momento. A los profes del grupo de farmacotecnia por todos los momentos compartidos. A los compañeros del departamento de Ciencias Farmacéuticas, en especial, a Sole y Esteban, por los mates y ayuda desinteresada con el HPLC.

A mis amigas que me regaló la vida, Gabi, Ely y Fa, gracias por estar siempre presentes, por tantos años de amistad que no conoce de tiempos ni distancias, por compartir su vida conmigo.

A mi familia, por acompañarme siempre y alegrarse de mis logros: a mis tíos y tías, a mis primos y primas, y a mi madrina. A mi abuela, mi apoyo incondicional, gracias por tanto amor y cariño.

A mis padres, por haberme dado la posibilidad de formarme en esta hermosa profesión, por apoyarme desde el inicio de esta carrera y durante este camino. Gracias por formarme con los valores del esfuerzo y sacrificio para lograr alcanzar las metas en la vida. A mi hermano, por estar siempre a mi lado y brindarme todo su apoyo.

A mi familia política, por todo su cariño y apoyo incondicional, por dejarme ser parte de esta hermosa familia. En especial a Carlos y Rosa, por estar siempre presentes, ayudarme y acompañarme en todo momento, por su calidez y bondad. A Moni, por tu compromiso en acompañarme en cada paso, en cada momento, por tu apoyo incondicional.

Al amor de mi vida, mi compañero de ruta, Maxi, agradecida eternamente con vos mi amor, por ser tan incondicional conmigo, por confiar en mí y apoyarme siempre sin dudarlo, por enseñarme a enfrentar la vida con otra mirada, por ser mi cable a tierra, mi sostén más grande, por demostrarme que siempre se puede a pesar de las adversidades, por no soltarme la mano nunca y acompañarme en todo momento para que esto sea posible. Gracias infinitas por hacer que las cosas sean más simples a tu lado, por estar pendiente siempre de cada detalle, por tu amor puro e incondicional... TE AMO!

El presente trabajo de Tesis Doctoral aborda el desarrollo de nuevas plataformas nanotecnológicas de liberación de fármacos para la optimización de la farmacoterapia de patologías neurodegenerativas oculares, como el glaucoma. Este trabajo plantea como estrategia optimizar dos pilares fundamentales del tratamiento de esta patología. En primer lugar, atenuar los principales síntomas por períodos prolongados de tiempo, como es el aumento de la presión intraocular (PIO) y, adicionalmente, generar una terapia alternativa de neuroprotección sobre las principales células oculares afectadas, con el objetivo final de evitar el progreso de la enfermedad y preservar el campo visual. Para ello, el trabajo de tesis comprendió el desarrollo tecnológico de dos sistemas portadores de fármacos: cristales líquidos nanoparticulados (cubosomas) para la vehiculización de latanoprost (LN) como fármaco hipotensor; y nanocápsulas de etilcelulosa cargadas con melatonina (ME) como agente antioxidante.

Por un lado, se obtuvieron los cristales líquidos nanoparticulados cargados con diferentes concentraciones de LN (CubLnp), que oscilaron entre 0,00125% - 0,02000%, mediante la técnica *top-down*. La caracterización fisicoquímica comprendió el estudio de las propiedades, estructura y composición del sistema coloidal, incorporación del fármaco, estabilidad de las formulaciones. Los CubLnp mostraron tamaños de partícula (TMP) menor a 220 nm; un índice de polidispersidad cercano a 0,1; potencial electrocinético (PZ) negativo y una eficiencia de encapsulación (EE) de LN cercana al 90%. Al mismo tiempo, presentaron una estructura cristalina líquida de fase cúbica, la cual no muestra modificaciones con la incorporación de diferentes concentraciones de LN. Estudios *in vitro* evidenciaron que CubLnp modula la liberación de fármaco de manera sostenida en el tiempo. Asimismo, la administración subconjuntival de una única dosis de CubLnp en conejos *New Zealand* normotensos, no ocasionó irritación ni lesiones en la superficie ocular, y mostró efectos hipotensores con reducción de la PIO de hasta un 30%. El efecto farmacológico se observó durante 9 días posteriores a la aplicación, favorecido por el prolongado tiempo de permanencia de las formulaciones en la superficie ocular, aún en menores concentraciones de fármaco que la fórmula comercial (Louten®).

En una segunda etapa, se obtuvieron las nanocápsulas de etilcelulosa cargadas con ME (NCECME), en concentraciones de 1 y 2 mg.mL⁻¹, mediante un método de evaporación-emulsificación. Las NCECME mostraron ser sistemas monodispersos con TMP entre 150-180 nm, valores de PZ entre -25 y -30 mV y una EE de ME cercana al 70%. Mediante estudios *in vitro* y *ex vivo*, las NCECME demostraron ser promotores de la permeación y capaces de modular la liberación del fármaco de manera sostenida en el tiempo.

Para evaluar la eficacia terapéutica *in vivo* de ME, se desarrolló un modelo de degeneración retiniana (DR) en conejos *New Zealand*, mediante la administración intravítrea de una dosis combinada de glutamato (GLUT) y butionina sulfoximina (BSO) (Bessone *et al.*, 2019). Esta combinación de agentes oxidantes induce estrés oxidativo y

citotoxicidad celular, principalmente de células ganglionares de la retina (CGR). Este mecanismo reproduce las características de una degeneración progresiva de los tejidos celulares de la retina, simulando la patogenia que se presenta en las enfermedades neurodegenerativas oculares.

Finalmente, se estudió el efecto neuroprotector de ME tras su administración intravítrea y tópica (vehiculizada en las NCECME) en un modelo de DR *in vivo*. En ambos casos, se demostró que ME otorga una protección eficiente sobre las CGR frente al estrés oxidativo generado por el modelo inducido. Este efecto se evidenció por una notable reducción en la muerte celular por apoptosis, un aumento significativo de la viabilidad de CGR, y mejoras tanto en la integridad como en la estructura retinal.

El trabajo aborda con éxito, tanto la optimización de la terapia convencional como la incorporación de nuevas terapias de neuroprotección para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares, como el glaucoma. De esta manera, se expone el potencial uso de ambas plataformas nanotecnológicas como estrategias innovadoras para optimizar la entrega de fármacos a los tejidos oculares, mejorar la acción terapéutica y la seguridad de los tratamientos.

SUMMARY

The thesis project approaches the development of novel nanotechnological drug delivery platforms to optimize the pharmacotherapy of ocular neurodegenerative pathologies, such as glaucoma. The work proposes to improve two fundamental approaches as a strategy for the treatment of this pathology. First, to attenuate the main symptoms for long periods of time, such as the increase in intraocular pressure (IOP). Additionally, generate an alternative neuroprotective therapy on the principal affected ocular cells, with the final goal of preventing the progression of the disease and preserving the visual field. For this, two nanotechnological drug delivery systems were developed: nanoparticulate liquid crystals (cubosomes) as a carrier for latanoprost (LN), a hypotensive drug; and ethylcellulose nanocapsules loaded with melatonin (ME) as an antioxidant agent.

On the one hand, nanoparticulate liquid crystals loaded with different concentrations of LN (CubLnp), which ranged from 0.00125% - 0.02000%, were obtained using the top-down method. The physicochemical characterization included the study of the properties, structure, and composition of the colloidal system, incorporation of the drug, and stability of the formulations. CubLnp showed particle sizes (TMP) less than 220 nm; a polydispersity index of about 0.1; negative electrokinetic potential (PZ) and encapsulation efficiency (%EE) of LN close to 90%. Likewise, the systems showed a liquid crystalline structure in cubic phase, without modifications with the incorporation of different concentrations of LN. CubLnp modulates drug release in a sustained manner over time, demonstrated by *in vitro* studies. Subconjunctival administration of a single dose of CubLnp in normotensive *New Zealand* rabbits did not cause irritation or lesions on the ocular surface and showed hypotensive effects with a reduction of IOP of up to 30%. The pharmacological effect was observed for 9 days after the application, favored by the prolonged residence time of the formulations in the cornea, even at lower drug concentrations than the commercial formulation (Louten®).

In a second stage, ethylcellulose nanocapsules loaded with ME (NCECME) were obtained, in concentrations of 1 and 2 mg.mL⁻¹, by means of an evaporation-emulsification method. The NCECME were shown to be monodisperse systems with TMP between 150-180 nm, PZ values among -25 and -30 mV, and an %EE of ME close to 70%. Through *in vitro* and *ex vivo* studies, NCECME proved to be promoters of permeation and capable of modulating drug release in a sustained manner over time.

To evaluate the *in vivo* therapeutic efficacy of ME, a retinal degeneration (RD) model was developed in *New Zealand* rabbits by intravitreal administration of a combined dose of glutamate (GLUT) and buthionine sulfoximine (BSO) (Bessone *et al.*, 2019). This combination induces oxidative stress and cellular cytotoxicity, mainly of retinal ganglion cells (RGC). This mechanism reproduces the characteristics of progressive degeneration of

retinal cell tissues, simulating the pathogenesis that occurs in ocular neurodegenerative diseases.

Finally, the neuroprotective effect of ME was studied *in vivo* RD model after its intravitreal and topical administration (by NCECME). In both cases, ME was shown to provide effective protection in RGCs against oxidative stress generated by the induced model. This effect was evidenced by a notable reduction in apoptosis cell death, a significant increase in RGC viability, and improvements in both retinal integrity and structure.

The research project successfully approaches both the optimization of conventional therapy and the incorporation of novel neuroprotective therapies for the treatment of glaucoma. In this way, the potential use of nanotechnological platforms is exposed as innovative strategies to optimize drug delivery to ocular tissues, improve therapeutic action and safety of treatments.

LISTADO DE ABREVIATURAS

%EE	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
%IR	Porcentaje de irritación ocular
%IA	Porcentaje de índice apoptótico
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
ACN	Acetonitrilo
AUC	Área bajo la curva (del inglés " <i>Area Under the Curve</i> ")
BSO	Butionina sulfoximina
CCD	Dispositivo de carga acoplada (del inglés " <i>Charge-Coupled Device</i> ")
CCG	Capa de Células Ganglionares
CD	Coefficiente de difusión
CGR	Célula Ganglionar de Retina (CGRs , células ganglionares de retina)
Cmax	Concentración máxima
Cryo-TEM	Microscopio electrónico de transmisión criogénica (del inglés " <i>Transmission Electron Cryomicroscopy</i> ")
CUB/CubB	Cubosomas blanco
CubLnp	Cubosomas cargados con latanoprost
DE	Desviación Estándar
DLS	Dispersión dinámica de luz (del inglés " <i>Dynamic Light Scattering</i> ")
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DO	Densidad Óptica
DR	Degeneración Retiniana
EC	Etilcelulosa
EPR	Epitelio Pigmentario de la Retina
ERG	Electroretinografía
FC	Formulación comercial
FIT	Fitantriol
GLUT	Glutamato
GMO	Monooleato de glicerilo (del inglés " <i>Glyceryl Monooleate</i> ")
GSH	Glutación reducido
HA	Humor Acuoso
HPLC	Técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (del inglés " <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ")

IP	Índice de Polidispersidad
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica (del inglés " <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> ")
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo/s
kV	Kilovoltio/s
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas (del inglés " <i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometric</i> ")
LN	Latanoprost
mbar	Milibar
MCT	Triglicéridos de cadena media (del inglés " <i>Medium Chain Triglyceride</i> ")
ME	Melatonina
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitro/s
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
mOsm	Miliosmoles
NaCl	Cloruro de sodio
NCEC	Nanocápsula de Etilcelulosa (NCECs , nanocápsulas de etilcelulosa; NCECME , nanocápsulas de etilcelulosa de melatonina)
ng	Nanogramos
NSP	Nanopartículas Sólidas Poliméricas
OCT	Tomografía de coherencia óptica (del inglés " <i>Optic Coherence Tomography</i> ")
Papp	Permeabilidad aparente
PBS	Solución amortiguadora fosfato salina (del inglés " <i>Phosphate Buffered Saline</i> ")
PIO	Presión Intraocular
PZ	Potencial Zeta
p/v	Peso en volumen
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (del inglés " <i>Reactive Nitrogen Species</i> ")
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés " <i>Reactive Oxygen Species</i> ")

SAXS	Dispersión de rayos X a bajo ángulo (del inglés " <i>Small-Angle X-ray Scattering</i> ")
SEM	Error estándar de la media (del inglés " <i>Standard Error of the Mean</i> ")
Sol. ME	Solución de Melatonina
SPF	Sistemas Portadores de Fármacos
TEM	Microscopía de transmisión electrónica (del inglés " <i>Transmission Electron Microscopy</i> ")
TD	Método <i>Top-Down</i>
TMP	Tamaño Medio de Partícula

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS PROPUESTOS	23
1.1. Introducción	23
1.1.1. Nanotecnología y Nanomedicina	25
1.1.2. Anatomofisiología Ocular. Aspectos Generales	29
1.1.3. Abordaje de la administración Ocular de Fármacos.....	34
1.1.4. Patologías oculares seleccionadas	40
1.1.5. Proyecto de Tesis Doctoral.....	43
1.2. Hipótesis y Objetivos Propuestos	44
Capítulo 2: OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE CRISTALES LÍQUIDOS NANOPARTICULADOS (CUBOSOMAS) DE LATANOPROST	49
2.1. Introducción	49
2.2. Materiales	53
2.2.1. Latanoprost y excipientes	53
2.3. Animales	54
2.4. Metodología	54
2.4.1. Método <i>Top-Down</i>	54
2.4.2. Caracterización de CubLnp	56
2.4.3. Estudios de Liberación <i>in vitro</i> de LN.....	60
2.4.4. Estudios de Eficacia <i>in vivo</i>	62
2.4.5. Análisis estadístico.....	66
2.5. Resultados	66
2.5.1. Estudios de caracterización fisicoquímica de CubLnps	66
2.5.2. Difracción de Rayos X a bajos ángulos (SAXS)	68
2.5.3. Microscopía Electrónica de Transmisión Criogénica	69
2.5.4. Calorimetría de Titulación Isotérmica	70
2.5.5. Estudios de liberación <i>in vitro</i> de LN.....	71
2.5.6. Estudios de eficacia <i>in vivo</i>	74
2.6. Discusión	78
2.7. Conclusiones Parciales	83
Capítulo 3: EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE MELATONINA EN MODELO ANIMAL DE DEGENERACIÓN RETINIANA EN CONEJOS	87
3.1. Introducción	87
3.2. Materiales	90
3.2.1. Melatonina y excipientes	90

3.3. Animales	90
3.4. Metodología.....	91
3.4.1. Estudios <i>in vitro</i>	91
3.4.2. Estudios <i>in vivo</i>	92
3.4.3. Análisis estadístico.....	96
3.5. Resultados.....	96
3.5.1. Estudios <i>in vitro</i>	96
3.5.2. Estudios <i>in vivo</i>	98
3.6. Discusión.....	105
3.7. Conclusiones Parciales.....	108
Capítulo 4: OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCÁPSULAS DE ETILCELULOSA DE MELATONINA	113
4.1. Introducción	113
4.2. Materiales.....	117
4.2.1. Melatonina y excipientes	117
4.3. Animales	118
4.4. Metodología.....	119
4.4.1. Obtención de las suspensiones de nanocápsulas	119
4.4.2. Caracterización NCECMs.....	120
4.4.3. Ensayos de Liberación <i>in vitro</i> de ME.....	122
4.4.4. Ensayos <i>ex vivo</i> de Permeación Transcorneal.....	124
4.4.5. Estudios <i>in vivo</i>	125
4.4.6. Análisis Estadístico.....	130
4.5. Resultados.....	130
4.5.1. Caracterización Físicoquímica de NCECMs.....	130
4.5.2. Ensayos <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> : Estudios de Liberación y Permeación Transcorneal de ME desde las NCECMs.....	133
4.5.3. Estudios <i>in vivo</i>	136
4.6. Discusión.....	141
4.7. Conclusiones Parciales.....	144
Capítulo 5: CONCLUSIONES FINALES.....	149
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	179

Capítulo 1:

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS PROPUESTOS



Capítulo 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS PROPUESTOS

1.1. INTRODUCCIÓN

La terapia farmacológica, por su impacto en la preservación de la salud y en la prevención de la enfermedad, constituye uno de los avances científicos y tecnológicos más relevantes en las últimas décadas. La tecnología farmacéutica ha ocupado un lugar relevante a nivel mundial en el desarrollo de medicamentos. Los avances en investigación, desarrollo e innovación (I+D+i) tecnológica en la producción de medicamentos, constituyen pilares fundamentales para asegurar la eficacia y seguridad de una nueva alternativa terapéutica. Los medicamentos, considerados un elemento esencial de la asistencia sanitaria, conforman una herramienta indispensable para mejorar la calidad de vida de los pacientes, prevenir numerosas enfermedades, como es el caso de las vacunas, y aumentar la expectativa de vida de la población mundial (Domínguez-Gil Hurlé and Martín Suárez, 1997; Nell *et al.*, 2018).

La investigación y el descubrimiento de nuevos fármacos que mejoren la terapéutica actual, es la base de la industria farmacéutica a nivel internacional. Durante muchos años, la I+D+i farmacéutica se ha enfocado en resolver dos aspectos críticos en la terapia farmacológica: la búsqueda y descubrimiento de nuevas moléculas activas de comprobada seguridad con nuevos efectos farmacológicos, como en el estudio de modificaciones funcionales de estructuras químicas conocidas con el fin de aumentar su potencia y lograr acciones terapéuticas más selectivas, duraderas o que presenten menor toxicidad para el organismo (Cirilo *et al.*, 2003; Schuhmacher *et al.*, 2021).

Para obtener una respuesta terapéutica tras la administración de un medicamento al organismo, una cantidad adecuada de fármaco activo debe ser absorbido y transportado por circulación sistémica al sitio de acción para producir un efecto farmacológico deseado, objetivo final de la terapia farmacológica. El sistema biológico posee numerosos mecanismos para proteger al organismo de cualquier sustancia extraña. Las barreras bioquímicas asociadas con las estructuras fisiológicas forman la primera línea de defensa que, los fármacos administrados por diferentes vías, deberán superar para alcanzar el sitio de acción (Mohammed *et al.*, 2020; Vila Jato, 2007). Por lo tanto, los aspectos relacionados con la forma farmacéutica utilizada para la administración de los medicamentos, como el recorrido que éste pueda tomar en su paso por el organismo, pueden afectar la efectividad de la farmacoterapia. Las formas de dosificación convencionales se caracterizan por tener una eficacia limitada en el tratamiento de numerosas enfermedades, principalmente por la baja absorción en las membranas biológicas, una biodistribución y/o liberación inespecífica, metabolismo o aclaramiento rápido. Dichos mecanismos impiden que esté disponible en el órgano diana

una concentración suficiente de fármaco (Zierden *et al.*, 2020). Por estos motivos, para lograr niveles terapéuticos efectivos se requiere de una administración frecuente y en altas dosis, aumentando los riesgos de efectos adversos sistémicos y, en consecuencia, un incumplimiento por parte del paciente.

Existe evidencia que el ritmo general de innovación lo marca la industria farmacéutica, ya que estos sectores dedican recursos significativos a la investigación y la industria basada en I + D. La innovación farmacéutica vinculada al desarrollo de nuevos medicamentos en el mercado actual, ha tenido un impacto positivo en la salud pública a nivel mundial. Los beneficios tanto sociales como individuales derivados de un tratamiento farmacológico eficaz, superaron ampliamente los costos económicos de los generados por los propios medicamentos. Se estima que las mejoras en el área de la salud relacionadas con la introducción de nuevos medicamentos tecnológicos han reducido la mortalidad de la población en más del 50% entre los años 1960 y 1990 (Better and Patients, 2004; Foulkes *et al.*, 2020; Stegemann, 2016).

Por tal motivo, en los últimos años la investigación en tecnología farmacéutica centró su interés en el desarrollo de nuevos medicamentos candidatos desde una perspectiva orientada en optimizar el sistema portador en el cual el fármaco es vehiculizado y así mejorar los inconvenientes asociados a las formas de administración convencionales. Los recientes avances científicos se han centrado en comprender y superar los obstáculos químico-biológicos para la entrega eficaz de fármacos. En este sentido, el desarrollo galénico de nuevos sistemas portadores de fármacos (SPF) se ha convertido en una estrategia de procesos o dispositivos, diseñados para mejorar la eficacia de los agentes terapéuticos mediante la liberación controlada sobre los tejidos biológicos, donde han de ejercer su acción farmacológica (Dogra *et al.*, 2020; Hollinger *et al.*, 2004; Nikezić *et al.*, 2020).

Un SPF se compone por un sistema portador de diversa naturaleza capaz de vehiculizar uno o varios ingredientes farmacéuticos activos o fármacos e ingredientes no activos, como excipientes funcionales y aplicación de nuevas tecnologías, con la finalidad de modular la liberación y/o direccionamiento del fármaco hacia el objetivo terapéutico (Formica, 2018). Generalmente, dichos sistemas tienen la capacidad de ajustar la velocidad de liberación del fármaco en respuesta a una necesidad fisiológica y pueden ser modulados por estímulos internos (pH, presencia de enzimas o cambios del potencial redox), externos (luz, temperatura, campo magnético) o procesos de autorregulación (Paolino and Fresta, 2006; Sur *et al.*, 2019). El término "liberación controlada de fármacos" describe un nuevo significado en el diseño de formas farmacéuticas cuyas características de disolución son moduladas en el tiempo y/o espacio, y el cual involucra la liberación de una cantidad adecuada de fármaco en un intervalo de tiempo regular y en el sitio de acción correcto (Ratnaparkhi and Gupta, 2013). Los SPF son nuevos productos farmacéuticos cuyo objetivo es optimizar la farmacoterapia mediante mejoras en la

biodisponibilidad y eficacia del fármaco, mediante su localización sitio-específica, control de la concentración, aumento de la duración de la acción y reducción de la dosis requerida (Li *et al.*, 2017). Asimismo, estas plataformas están diseñadas para proteger al fármaco de una rápida degradación durante su distribución y transporte por el organismo hacia el sitio de acción, reduciendo su influencia sobre los tejidos biológicos, controlando su liberación en dosis específicas y, por ende, reduciendo los efectos secundarios no deseados (Tiwari *et al.*, 2012).

De esta manera, el desarrollo de SPF requiere la consideración de numerosos factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, la naturaleza del sistema portador, el mecanismo de liberación del fármaco, la capacidad de direccionamiento y la biocompatibilidad como así también, la vía de administración seleccionada. El énfasis se centra en la necesidad de diseñar “medicamentos optimizados” que equilibren todos los factores y logren una máxima efectividad, con la mejor seguridad y confiabilidad posible, con el objetivo final de lograr los mayores beneficios en la terapia farmacológica y aumentar la aceptación o cumplimiento por parte del paciente (Banker and Rhodes, 2002; Hartl *et al.*, 2021).

Actualmente, el desarrollo de nuevos SPF de liberación controlada como medicamentos innovadores es tendencia en el mercado farmacéutico. Estos dispositivos desempeñan un papel crucial en el manejo de afecciones crónicas al lograr tratamientos farmacológicos más eficaces y con menores efectos secundarios, debido a que administran eficazmente el fármaco en el órgano diana donde se origina la enfermedad. Un estudio reciente publicado por *Fortune Business Insights™* indica que el mercado global y desarrollo de sistemas de administración de medicamentos proyecta un alcance de USD 45.20 mil millones para el año 2027, debido a la creciente prevalencia de múltiples afecciones crónicas y las mejoras significativas en la salud y la calidad de vida de los pacientes (Fortune Business Insights, 2019). En los últimos años, esta creciente demanda llevó al sector farmacéutico a la incorporación de la nanotecnología como herramienta y tecnología central para la obtención de medicamentos innovadores.

1.1.1. Nanotecnología y Nanomedicina

La nanotecnología, considerada la ciencia de la nanoescala, es una de las tecnologías más pioneras y avanzadas del siglo XXI. La “*National Nanotechnology Initiative Program*” (NNI, según sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, define la nanotecnología como “la comprensión y el control de la materia en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros (nm), donde fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas. La nanotecnología abarca la ciencia, la ingeniería y la tecnología a nanoescala, implicando el procesamiento de imágenes, medición, modelado y manipulación de la materia a esta escala de longitud” (National Science and Technology Council and Society, 2014). De acuerdo a esta definición y en base al conocimiento científico y técnico actual de los nanomateriales, la Administración de Alimentos y

Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés "*The Food and Drug Administration*") del mismo país, considera un producto que implica la aplicación de nanotecnología como "aquellos materiales o productos diseñados para obtener una dimensión en el rango de la nanoescala aproximadamente de 1 a 100 nm; y aquellos que exhiben características o fenómenos, incluidas propiedades físicas o químicas o efectos biológicos, atribuibles a su tamaño, incluso si estas dimensiones caen fuera del rango de nanoescala, hasta un micrómetro (1000 nm)" (The U.S. Food and Drug Administration, 2020). Este enfoque regulatorio fue emitido en una guía para la industria, donde se identifica y aborda las implicaciones en seguridad, efectividad e impacto, tanto para la salud pública como para el estado regulatorio de los productos nanotecnológicos (The U.S. Food and Drug Administration, 2011).

La nanotecnología ha demostrado gran potencial para lograr avances significativos en el área de las ciencias biomédicas con aplicaciones directas en el campo de la medicina (Pakzad *et al.*, 2020). La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología para lograr la innovación en el cuidado de la salud. Esta disciplina utiliza tecnologías y materiales a escala nanométrica para el diseño y evaluación de sistemas innovadores, formados por al menos un principio activo o molécula biológicamente activa y el propio sistema, con propiedades específicas que permiten una función concreta relacionada al diagnóstico, tratamiento y/o prevención de una enfermedad (Irache, 2008; Vila Jato, 2007). La Plataforma Tecnológica Europea de Nanomedicina (ETPN, por sus siglas en inglés "*Nanomedicine European Technology Platform*") hace referencia a la nanomedicina como un instrumento clave para el avance de la medicina personalizada, dirigida y regenerativa, como así también para el desarrollo de nuevos medicamentos, tratamientos y dispositivos médicos innovadores con efectivos avances en todos los campos de la medicina actual (ETPN Association, 2021). En este sentido, la nanomedicina ofrece numerosas ventajas en el avance de farmacoterapias efectivas basados en sistemas nanotecnológicos de administración de fármacos controlada y dirigida hacia células o tejidos específicos para la entrega selectiva de su carga terapéutica (Rojas-aguirre *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2013).

Esta tecnología permitió el diseño de sistemas nanoparticulados o nanoportadores con propiedades fisicoquímicas y biológicas optimizadas para ser utilizadas como plataformas apropiadas para la administración de compuestos bioactivos para mejorar la seguridad y eficacia de los actualmente disponibles (Nikezić *et al.*, 2020; Wilczewska *et al.*, 2012). La forma de relacionar el fármaco con el sistema portador y las estrategias utilizadas para su vehiculización son factores muy importantes para lograr una terapia dirigida en diversas enfermedades y reducir los efectos adversos asociados. Los nanosistemas coloidales presentan un rango de tamaño de 10 a 1000 nm y, dependiendo del objetivo final, la molécula bioactiva o el fármaco, puede encontrarse absorbido, disuelto, encapsulado o atrapado en la matriz de la nanopartícula (Nagarwal *et al.*, 2009). En función de la morfología y las propiedades fisicoquímicas, las

nanopartículas pueden lograr aumentar la solubilidad de los fármacos, mejorar su eficacia y tolerabilidad, protegerlo de la degradación temprana al controlar su biodistribución, mejorar la captación en el tejido objetivo y, finalmente, proporcionar una liberación sostenida en el objetivo terapéutico (Meng *et al.*, 2019; Wilczewska *et al.*, 2012). De esta manera, se podría modular la farmacocinética y farmacodinamia de los nanoportadores mediante el direccionamiento específico al sitio de acción y liberación controlada del agente terapéutico en una dosis reducida, con el objetivo de minimizar los efectos secundarios y aumentar el índice terapéutico de la molécula en cuestión mejorando su biodisponibilidad (Sahoo *et al.*, 2008).

La modificación de las propiedades fisicoquímicas como tamaño de partícula, índice de polidispersidad, capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación del fármaco mediante el uso de diferentes tecnologías, pueden influir en la eficacia y seguridad del sistema portador (Li *et al.*, 2017). Asimismo, debido a su tamaño reducido, tienen la capacidad adicional de prolongar los tiempos de circulación sanguínea sin ser reconocidos por las células inmunitarias y así, superar las barreras fisiológicas para direccionar al fármaco hacia células o tejidos específicos (Andrés-Guerrero *et al.*, 2017). El direccionamiento de los sistemas portadores puede efectuarse a través de mecanismos de transporte pasivos (estímulos físicos) o mediados por ligandos de reconocimiento como macromoléculas o anticuerpos de receptores específicos (Pakzad *et al.*, 2020). Algunos nanoportadores, dependiendo de las características de los materiales que lo componen, pueden diseñarse para ser activados por estímulos externos tales como variaciones en el pH, cambios químicos, aplicación de un campo magnético o una fuente de calor externa (Tiwari *et al.*, 2012; Torchilin, 2006).

En este sentido, la nanotecnología aplicada en el desarrollo de SPF como medicamentos innovadores, ha recibido aprobación por la FDA para su comercialización o se encuentran en las últimas etapas de estudios clínicos para el tratamiento de muchas enfermedades, entre las cuales se encuentra con mayor prevalencia el cáncer y el SIDA (Etheridge *et al.*, 2013). Sin embargo, debido al gran avance y las numerosas ventajas en la terapia clínica, existen considerables desafíos en la aplicación de este campo en la terapia clínica.

En los últimos años, la investigación y el desarrollo de nanosistemas como SPF se han enfocado en los tratamientos de patologías oculares como posibles alternativas a los sistemas de administración convencionales (Patra *et al.*, 2018). Los tratamientos con base nanotecnológica son desarrollados con el objetivo de superar las desventajas asociadas a las formas de dosificación ocular convencionales y con ello, mejorar la aceptación y adherencia al tratamiento por parte del paciente (Weng *et al.*, 2017). Se han explorado numerosas nanoformulaciones biocompatibles con diversas propiedades para la administración ocular de fármacos.

Dentro de los sistemas más estudiados para la vía oftálmica, se encuentran las nanopartículas basadas en lípidos, formulados a partir de lípidos sólidos o líquidos o mezcla de ambos. Estos sistemas nanoestructurados tienen el potencial de generar una liberación controlada y sostenida, la capacidad de incorporar fármacos de diversa naturaleza, poseen baja toxicidad y una estabilidad mejorada a largo plazo (Beloqui *et al.*, 2016; Dogra *et al.*, 2020; Farid *et al.*, 2017). Asimismo, las nanopartículas poliméricas han sido ampliamente estudiadas y utilizadas como agentes terapéuticos para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos oculares debido a su capacidad para atravesar las barreras fisiológicas que presenta el ojo, las cuales obstaculizan el paso de los medicamentos convencionales. Están compuestos por polímeros biocompatibles y biodegradables que los convierten en formas farmacéuticas seguras y tolerables para la vía ocular. Además, presentan tamaños ajustables y propiedades de superficie diseñados para alcanzar el órgano diana y generar un perfil de liberación controlada del fármaco, reduciendo la frecuencia de administración (Imperiale *et al.*, 2018; Quinteros *et al.*, 2016; Swetledge *et al.*, 2021). Otro nanosistema ampliamente estudiado y desarrollado para la administración ocular de fármacos se conoce como nanoemulsión y consta de dispersiones coloidales finas y transparentes de tamaño nanométrico. Debido a su facilidad de formulación, estabilidad cinética, carga mejorada de fármaco tanto lipofílicos como hidrofílicos, y su potencial modificable, han sido explorados ampliamente como nanotransportadores no invasivos, viables y rentables para mejorar la biodisponibilidad del fármaco oftálmico. Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente nanoemulsiones aprobadas por la FDA para el tratamiento de la enfermedad del ojo seco y la queratitis severa, conocidas como Restasis® e Ikervis® respectivamente (Moghimpour *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2020). Por otra parte, los liposomas constituyen los sistemas coloidales más estudiados con finalidad clínica para la administración ocular de fármacos. Se presentan como vesículas esféricas formadas por fosfolípidos que se ensamblan en bicapas con un interior acuoso, tienen la capacidad de encapsular fármacos de diferente polaridad, y presentan la particularidad de proporcionar protección al fármaco cargado contra la degradación de enzimas metabólicas presentes en el líquido lagrimal y en la superficie del ojo (Arroyo *et al.*, 2018; Bhattacharjee *et al.*, 2019; Quinteros *et al.*, 2014).

Estos lineamientos exponen la gran relevancia y avance en el desarrollo de sistemas innovadores de base nanotecnológica para el direccionamiento de fármacos hacia el tejido ocular, con mejoras significativas en la biodisponibilidad de los fármacos administrados, toxicidad reducida y una eficacia terapéutica mejorada en comparación con los enfoques de terapias convencionales.

En este sentido, el presente Trabajo de Tesis Doctoral centró su interés en la optimización de la farmacoterapia de patologías oculares, debido al entorno crítico y farmacocinéticamente específico que limita la biodisponibilidad de los fármacos, y utilizó

a la nanotecnología como estrategia para superar las limitaciones que presenta esta vía de administración.

1.1.2. Anatomofisiología Ocular. Aspectos Generales

El ojo es uno de los órganos más especializados del cuerpo humano responsable de la visión. El proceso de fotorrecepción ocurre cuando la energía luminosa del entorno produce cambios en las células nerviosas especializadas de la retina (conos y bastones), las cuales generan potenciales de acción transmitidos por el nervio óptico hacia la corteza cerebral, donde la información es recibida y procesada, para que se produzca el fenómeno de la visión (Forrester *et al.*, 2016). El globo ocular se ubica en la porción anterior de la órbita, tiene un diámetro aproximadamente de 2,5 cm y se encuentra protegido por grasa, tejidos blandos y paredes óseas de las cavidades orbitarias donde, además, es sostenido por seis músculos que colaboran con el movimiento. Estructuralmente, el globo ocular se compone de tres capas concéntricas: una capa externa fibrosa *corneo-escleral* compuesta por la córnea y esclerótica; una capa intermedia *túnica vascular* formada por el iris, coroides y cuerpo ciliar; y, una capa interna *túnica nerviosa* constituida por la retina y tejido nervioso (Ver Figura 1.1). La capa fibrosa proporciona soporte estructural para el contenido interno ocular y la unión de los músculos extraoculares.

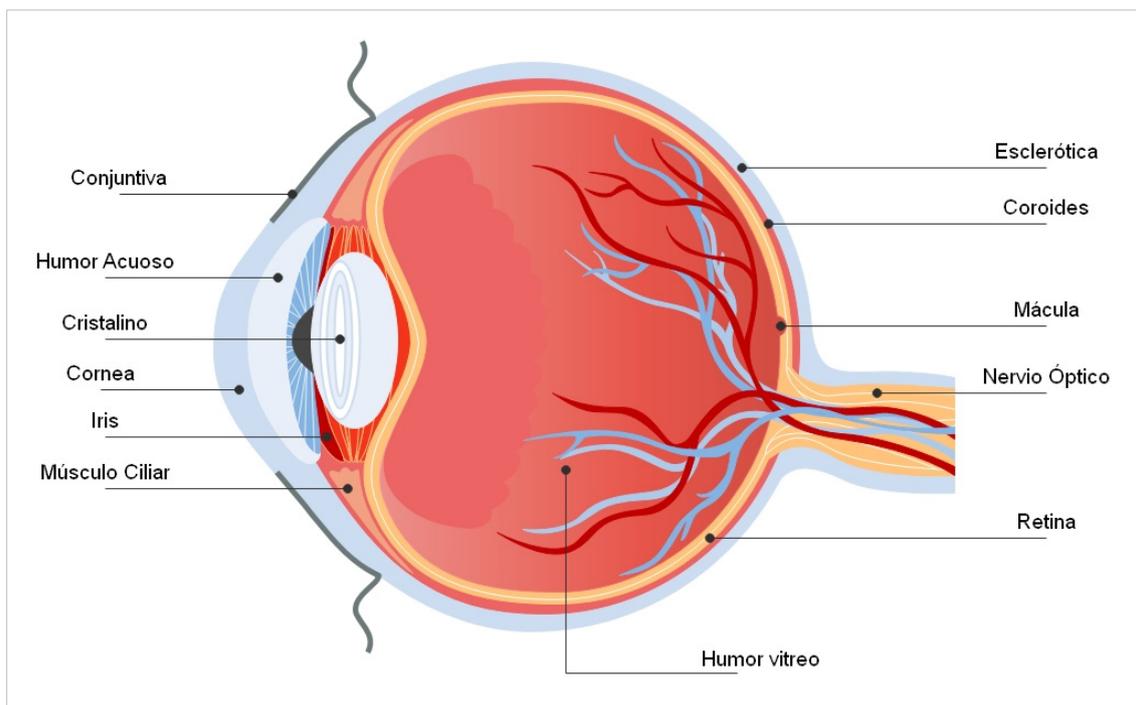


Figura 1.1. Diagrama esquemático de las estructuras internas del globo ocular.

Por otra parte, anatómicamente el ojo se divide en dos compartimentos como segmento anterior y posterior; siendo un tercio y dos tercios de la arquitectura ocular, respectivamente, los cuales son detallados a continuación (Agarwal *et al.*, 2018).

1.1.2.1. Segmento Anterior

El segmento anterior comprende de la córnea, conjuntiva, cámara anterior y posterior, iris, cuerpo ciliar, cristalino y humor acuoso. Además, incluye los párpados y el aparato lagrimal. La función principal del segmento anterior es regular, enfocar y refractar la luz que recibe el ojo (Nayak and Misra, 2018).

Córnea

La córnea es la principal superficie refractiva del ojo, se ubica delante del iris y la pupila. Es una estructura transparente, avascular y su carga neta de superficie es negativa. Está compuesta por tres capas celulares: el *epitelio*, una multicapa rica en lípidos; el *estroma*, una matriz acuosa formada por colágeno y queratinocitos; y el *endotelio* una estructura rica en lípidos que mantiene la hidratación de la córnea; y dos capas de interfaz denominadas *membranas de Bowman* y *Descemet* (Nacucchio and Manzo, 2019). Su función principal es de barrera protectora contra lesiones físicas y patógenas (Sharma *et al.*, 2016). El epitelio corneal es el tejido más importante de la barrera ocular. Está constituido por multicapas de células epiteliales con uniones estrechas, así como el abundante colágeno hidratado presente en las células del estroma, que sirven como barrera selectiva limitando la permeabilidad de biomoléculas, especialmente para fármacos hidrófilos (Dogra *et al.*, 2020; Pakzad *et al.*, 2020).

Película lagrimal

Anterior a la córnea, se encuentra la película lagrimal, la cual se compone de tres capas funcionales distintas (lipídica, acuosa y mucina). La producción y el recambio lagrimal son fundamentales para mantener saludable la superficie ocular (Nayak and Misra, 2018). La capa de mucina es secretada de forma continua por las células corneales y de la conjuntiva, para mantener la humectación y lubricación de la superficie ocular. Asimismo, la película lagrimal es fundamental en funciones de nutrición, humectación, protección de la córnea frente a posibles daños por materiales externos y prevención de infecciones bacterianas (Janagam *et al.*, 2017).

Conjuntiva

Por su parte, la conjuntiva es una membrana mucosa delgada, transparente y vascularizada que recubre la superficie interna de los párpados y el tercio anterior del globo ocular hasta la córnea, los cuales componen la superficie expuesta del ojo (Bourlais *et al.*, 1998). A su vez, la conjuntiva se divide en conjuntiva bulbar, fondo de saco conjuntival y conjuntiva palpebral y son abastecidas por abundante suministro de vasos sanguíneos (Agarwal *et al.*, 2018).

Cámara anterior y posterior

La cámara anterior está situada entre el iris y la córnea, mientras que la cámara posterior está situada entre los lentes, el iris y el cuerpo ciliar. Ambos se conectan por medio de la pupila y se encuentran drenados y lubricados por humor acuoso (HA), líquido transparente secretado por el cuerpo ciliar de composición similar al plasma sanguíneo, pero con baja concentración de proteína. Por su parte, contribuye al

mantenimiento de la presión intraocular (PIO) y facilita el metabolismo del cristalino y la córnea, quienes carecen de vasos (Nayak and Misra, 2018). El HA fluye desde la cámara posterior hacia la cámara anterior a través de la red trabecular, un tejido esponjoso ubicado alrededor la base de la córnea, para luego drenar hacia el canal de Schlemm y desembocar en el sistema venoso constituido por las venas intraesclerales, episclerales y, finalmente, conjuntivales (Yadav *et al.*, 2019). El lente o cristalino es una estructura sólida transparente, situada entre la cara posterior del iris y la cavidad vítrea. Es un instrumento importante para la formación de la visión, permite el fenómeno de acomodación con una potencia refractiva que varía entre 16 a 20 dioptrías, controlado por los músculos ciliares (Washington *et al.*, 2001).

1.1.2.2. Segmento Posterior

El segmento posterior comprende los dos tercios posteriores del ojo e incluye la esclera, coroides, retina y nervio óptico, los cuales enclaustran la cavidad vítrea. Este segmento facilita la conversión de la luz recibida en una señal electroquímica, la cual es transmitida hacia el cerebro a través del nervio óptico, para ser percibida como visión (Agarwal *et al.*, 2018).

Esclera y coroides

La esclera es un tejido fibroso blanco e hidratado, de gran extensión que constituye aproximadamente el 95% de la superficie total del ojo (Sharma *et al.*, 2016). Está compuesta por tejido conectivo y fibras elásticas que le permiten conservar la forma del globo ocular, mantener la PIO y proteger a las estructuras intraoculares de traumatismos y desplazamientos mecánicos (Fong *et al.*, 1991). La coroides se ubica por debajo de la esclera, es una estructura altamente vascularizada e inervada, nutre la parte posterior del ojo y forma una barrera dinámica por la alta circulación sanguínea. Es un tejido fibroso incompleto, que sirve como membrana basal del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y regula el intercambio de metabolitos (Piguet *et al.*, 1993).

Retina

La retina es una lámina delgada, semitransparente y muy organizada, que consta de múltiples capas de tejido neural y vasos sanguíneos. Es una extensión del sistema nervioso central, por tanto, es una estructura compleja. Su superficie se extiende desde el disco del nervio óptico hasta la pupila, revistiendo internamente a la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La retina neural se compone de distintos tipos de neuronas sensoriales que inician la vía visual, transformando la energía luminosa en impulsos nerviosos para transmitirlos hacia la corteza visual a través del nervio óptico. Como se observa en la *Figura 1.2*, histológicamente la retina puede dividirse en diez estratos, los cuales pueden identificarse desde el interior hacia el exterior como (Francine Behar-Cohen *et al.*, 2020; Ross and Wojciech Pawlina, 2015):

- (i) *Membrana Limitante Interna*. Formada por procesos celulares de las células de Müller.

- (ii) *Capa de fibras del nervio óptico*. Las fibras del nervio óptico están formadas por axones amielínicos de las CGR. Alrededor de estas fibras y vasos sanguíneos se encuentran los procesos celulares de los astrocitos y las células de Müller.
- (iii) *Capa de Células Ganglionares de Retina (CGR)*. Se encuentran los cuerpos celulares de las CGR, los astrocitos y algunas células amacrinas.
- (iv) *Capa Plexiforme Interna (CPI)*. Matriz donde se produce la sinapsis entre células bipolares, CGR y amacrinas.
- (v) *Capa Nuclear Interna (CNI)*. Está compuesta por los cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales, amacrinas y de Müller.
- (vi) *Capa Plexiforme Externa (CPE)*. Formada por la sinapsis entre los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares y horizontales.
- (vii) *Capa Nuclear Externa (CNE)*. Se compone por los cuerpos celulares de los fotorreceptores.
- (viii) *Membrana limitante externa*. Sector de conexión entre las células de Müller y los segmentos de fotorreceptores.
- (ix) *Capa de fotorreceptores*. Formada por segmentos externos e internos de conos y bastones.
- (x) *Epitelio pigmentario de la retina (EPR)*. Capa celular más externa adyacente a la coroides, situada por debajo de las células fotorreceptoras. Es una monocapa de células epiteliales pigmentadas conectadas con uniones estrechas, la cual desempeña un papel importante en el mantenimiento de la función de los fotorreceptores y el transporte de nutrientes entre la coroides y la retina, así como en la producción de factores de crecimiento, secreción de citocinas y fagocitosis de segmentos externos de fotorreceptores desechados o desgastados (Patel *et al.*, 2016).

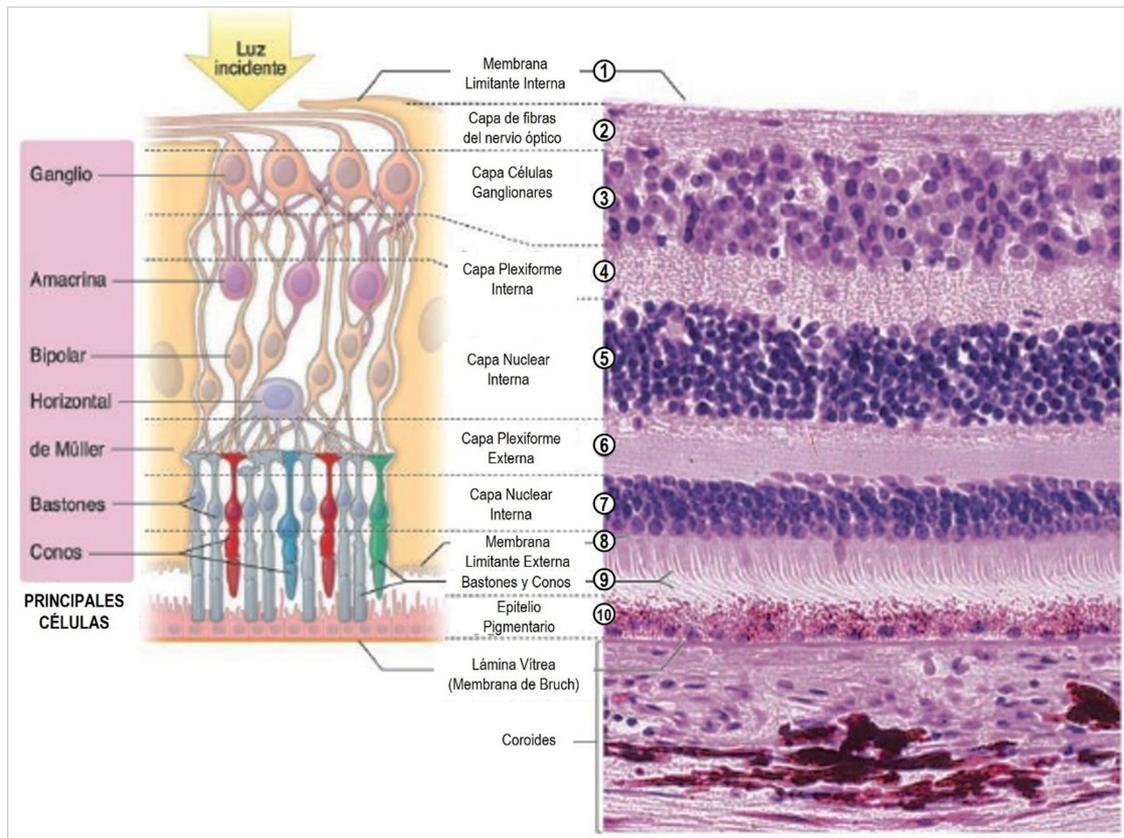


Figura 1.2. Diagrama representativo y corte histológico de las capas de retina. (Ilustración adaptada y extraída de Ross y co.)

La región central de la retina es un área especializada, de límites imprecisos, denominada mácula o mácula lútea. En el centro con una ligera depresión en la superficie, se ubica la fovea, una estructura no vascularizada formada únicamente por una capa de fotorreceptores. Se caracteriza por presentar progresivamente mayor concentración de conos con ausencia completa de bastones a nivel central, responsable de la agudeza visual. La capa de células de fotorreceptores, ubicada a un lado de la coroides, conducen el estímulo luminoso hacia las células bipolares y, estas últimas, establecen sinapsis con las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares confluyen en el bulbo ocular por el disco óptico y abandonan el ojo como nervio óptico. De esto se desprende que las células del nervio óptico llegan directamente al cerebro. La cabeza del nervio óptico se visibiliza como un disco rosado, alrededor del cual emergen las fibras, arterias y venas retinianas, denominada papila óptica (Barret *et al.*, 2010; Francine Behar-Cohen *et al.*, 2020; Hildebrand and Fielder, 2011).

Cavidad vítrea

La cavidad situada entre el cristalino y la retina, se encuentra cubierta de humor vítreo viscoso, un gel transparente y avascular, compuesto principalmente por fibras colágeno y ácido hialurónico que forman parte de dos tercios del volumen ocular. Es producido de manera constante por los procesos ciliares y participa activamente en el transporte de nutrientes y ayuda a mantener la estructura ocular (Agarwal *et al.*, 2018).

1.1.3. Abordaje de la administración Ocular de Fármacos

La administración y direccionamiento de fármacos oculares es una de las áreas más desafiantes de la ciencia farmacéutica, debido a la naturaleza anatómica, fisiológica y bioquímica única que presenta el ojo. El entorno crítico y farmacocinéticamente específico y los mecanismos de defensa oculares, restringen y dificultan el acceso de fármacos o moléculas bioactivas hacia las estructuras internas oculares para generar la acción terapéutica (Gaudana *et al.*, 2010; Janagam *et al.*, 2017).

El objetivo de la farmacoterapia ocular es maximizar la cantidad de fármaco que alcanza las estructuras internas del ojo, en una concentración suficiente durante un período de tiempo apropiado, para lograr una respuesta farmacológica efectiva. La concentración y el tiempo de permanencia del fármaco en el sitio terapéutico es un determinante crítico de la intensidad y duración del efecto farmacológico. Estos factores dependen de los procesos farmacocinéticos (absorción, distribución y eliminación) que deba atravesar el fármaco en el organismo una vez administrado (Januleviciene *et al.*, 2012).

La administración de fármacos por la vía ocular puede realizarse tanto a nivel local como sistémico, según la patología a tratar. Para el tratamiento de patologías oculares del segmento anterior, los fármacos son comúnmente administrados por instilación tópica, o mediante inyecciones intracamerales o subconjuntivales; mientras que, para patologías del segmento posterior, los fármacos pueden ser administrados por vía sistémica, inyecciones perioculares o intravítreas, o menos frecuente, por instilación tópica. Dependiendo la vía de administración, es necesario superar numerosas barreras oculares para que los fármacos alcancen el órgano diana para ejercer su acción.

Por su parte, la administración tópica es la vía de elección para el tratamiento de numerosas enfermedades oculares. Es una vía muy ventajosa debido a su bajo costo, naturaleza no invasiva, autoadministrable y de fácil aplicación que le confiere conformidad al paciente. Asimismo, es un método de administración local que evita la barrera hemato-acuosa, los efectos secundarios y el metabolismo de primer paso asociados a la administración sistémica de algunos fármacos (Janagam *et al.*, 2017). La terapia tópica ocular posee dos propósitos fundamentales, por un lado, el tratamiento de afecciones de la superficie externa del ojo, como infecciones bacterianas o víricas como conjuntivitis, blefaritis, queratitis seca; y proporcionar tratamiento intraocular a través de la córnea u otros tejidos para patologías que afectan las estructuras más internas oculares, tales como glaucoma, uveítis u endoftalmitis (Bourlais *et al.*, 1998). Las formulaciones oftálmicas convencionales actualmente disponibles para la terapia tópica son colirios, suspensiones, lentes de contactos blandas, geles y ungüentos, entre las cuales, el 90% se comercializa como soluciones y suspensiones. Esto se debe al bajo costo de producción, simplicidad en el desarrollo, buena aceptación por parte del paciente (Janagam *et al.*, 2017)

Sin embargo, la administración de fármacos convencionales por vía tópica implica varios procesos biológicos y fisiológicos complejos propios de la anatomía ocular, que

dan como resultado una baja absorción y biodisponibilidad deficiente. Dependiendo de la ubicación del órgano diana de las diferentes patologías oculares y la solubilidad y permeabilidad del fármaco en la superficie ocular, éste puede ser retenido en la córnea y/o conjuntiva o ser absorbido y atravesar las barreras biológicas para ejercer su efecto farmacológico (Reimondez-Troitiño et al., 2015a). De la dosis de fármaco disponible en la superficie ocular, la permeación hacia el interior del órgano se produce principalmente por vía corneal, y en menor proporción ocurre a través de la zona límbica y la esclerótica.

Generalmente, las formulaciones tópicas son administradas en el saco conjuntival, la cual contiene un volumen aproximadamente de 7-8 μL y solo puede expandirse hasta una capacidad máxima de 30 μL . Los colirios instilados mediante un frasco gotero, tienen un volumen de gota promedio de 40 μL , lo que resulta en una pérdida y eliminación inmediata de una fracción de dosis aplicada (Agarwal *et al.*, 2018). Además, se suma el reflejo al lagrimeo y el parpadeo excesivo post-aplicación de los colirios oculares limitando la cantidad de formulación que queda en la superficie ocular. De esta forma, la película lagrimal forma la primera barrera para la administración tópica de fármacos. En condiciones normales, el líquido lagrimal tiene una tasa de renovación del 15% -30% por minuto con una rápida restauración del volumen total en 2-3 minutos, lo que resulta en una eliminación del medicamento oftálmico administrado dentro de los primeros 15-30 segundos (Barar *et al.*, 2016). La rápida y extensa pérdida precorneal causada por el drenaje de la solución, factores como el parpadeo, unión a proteínas o metabolización por enzimas, afectan aún más el tiempo de contacto con las membranas biológicas, la absorción, penetración y biodisponibilidad de la terapia localizada (Pakzad *et al.*, 2020).

La córnea, constituye una barrera relativamente impermeable, que limita la penetración y transporte pasivo de moléculas bioactivas y iones. El epitelio corneal debido a su conformación de múltiples capas celulares lipófilas y la presencia de uniones epiteliales estrechas, limitan el paso de moléculas hacia el estroma y forman una barrera altamente eficiente principalmente para fármacos hidrófilos o de gran tamaño molecular (Gaudana *et al.*, 2010). El estroma es una capa altamente hidrófila de colágeno que representa una barrera significativa para la permeación de moléculas de fármacos lipófilos, los cuales tienden a retenerse en el epitelio y liberarse muy lentamente (Agarwal *et al.*, 2018). La capa más interna es el endotelio corneal, posee uniones que contienen fugas denominadas desmosomas, las cuales favorecen el paso de moléculas lipófilas y de gran tamaño. Por tanto, es importante considerar la naturaleza anfipática que debe tener el fármaco para poder atravesar las capas corneales (Sharma *et al.*, 2016).

La conjuntiva debido a su naturaleza hidrófila, la gran superficie (varias veces superior a la córnea) y abundante vasculatura, se convierte en una barrera física pasiva capaz de absorber parte significativa de los fármacos administrados en el epitelio corneal. Esto lo convierte en una posible ruta de absorción de grandes biomoléculas, como proteínas y péptidos. Sin embargo, es considerada una vía improductiva, ya que una parte significativa del fármaco es eliminada por circulación sistémica, reduciendo en gran medida la biodisponibilidad ocular (Reimondez-Troitiño et al., 2015b).

En consecuencia, la producción de fluido lagrimal, la baja permeabilidad del epitelio corneal y la absorción no productiva, dificultan la capacidad de absorción, limitan el tiempo de residencia con la superficie corneal y facilitan la rápida eliminación de los medicamentos oftálmicos. Por esta razón, sólo del 1-7% de los fármacos administrados atraviesan la córnea y alcanzan los tejidos intraoculares, mientras que una fracción importante de la dosis es absorbida por vía sistémica a través del conducto nasolagrimal, aumentando el riesgo de ocasionar efectos adversos (Alvarez-Trabado *et al.*, 2017). A continuación, en la *figura 1.3* se esquematizan las barreras biológicas mencionadas asociadas a la superficie externa ocular.

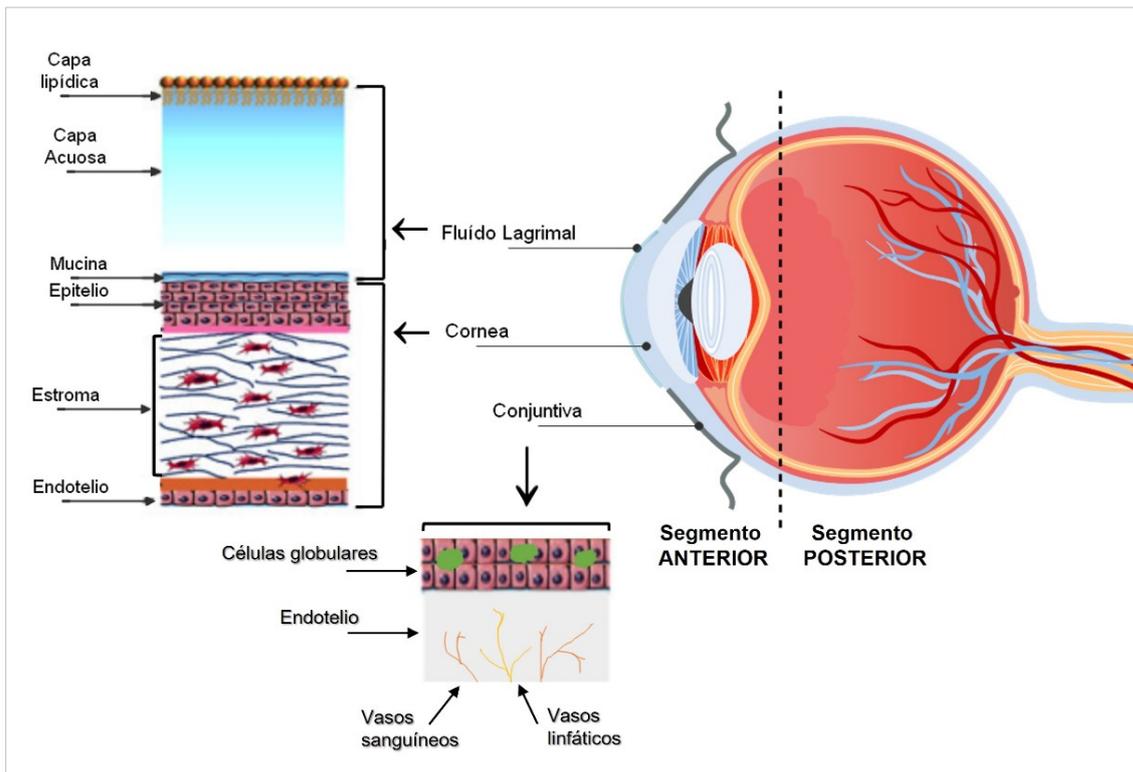


Figura 1.3. Esquema representativo de la estructura ocular y las barreras biológicas presentes en la permeación de fármacos administrados de manera tópica.

(Ilustración adaptada de Singh y co. 2020)

Como se evidencia, la biodisponibilidad ocular de los fármacos administrados tópicamente a partir de formulaciones convencionales es limitada y deficiente. El mecanismo y la capacidad de penetración del fármaco y su distribución en los tejidos oculares, dependen en gran medida de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y el vehículo por el cual el fármaco es administrado (Agarwal *et al.*, 2018). Con el propósito de obtener terapias oculares más eficientes y optimizadas, se han explorado estrategias tecnológicas superadoras para el desarrollo de sistemas portadores innovadores, seguros y biocompatibles, capaces de superar las barreras fisiológicas oculares y lograr una biodisponibilidad mejorada (Souto *et al.*, 2019).

En función de lo expuesto, los objetivos farmacotécnicos que debería cumplir un SPF óptimo para administración tópica son: (i) aumentar el tiempo de residencia del fármaco en la superficie ocular; (ii) proteger el fármaco de la degradación o

metabolización enzimática; (iii) direccionar el fármaco hacia el sitio de acción, aumentando la concentración efectiva y minimizando la absorción no productiva; (iv) promover la penetración corneal del fármaco, lo que le permite actuar como un sistema de liberación controlada (Nacucchio and Manzo, 2019).

De esta manera, se lograría aumentar la disponibilidad y reducir la frecuencia de dosificación y, con ello, reducir los efectos secundarios no deseados en beneficio del paciente. Además, los SPF deben cumplir con los requisitos generales para las formulaciones oftálmicas, como ser biocompatibles, estériles, biodegradables y estables en la superficie ocular, para asegurar la máxima comodidad y minimizar la irritación local (Alvarez-Trabado *et al.*, 2017). En este contexto, la nanotecnología ofrece la posibilidad de desarrollar sistemas de administración especialmente adaptados para superar las barreras oculares, permitir el acceso a las estructuras internas oculares y alcanzar el sitio de acción terapéutico.

1.1.3.1. Implicancia de la Nanomedicina en la Farmacoterapia Oftalmológica

En las últimas décadas, el progreso científico en el surgimiento de la nanomedicina aplicada a compuestos farmacológicos, fue muy enriquecedor en cuanto al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para la optimización del tratamiento de enfermedades oculares. El estudio de sistemas nanoparticulados para administración oftálmica ha crecido sustancialmente, llevando al conocimiento de una amplia variedad de nanoestructuras con resultados exitosos y una mejor comprensión de su potencial como SPF oculares (Meng *et al.*, 2019).

Estos sistemas han demostrado la capacidad de incorporar una amplia variedad de fármacos, reducir su degradación, aumentar el tiempo de residencia y la interacción con el epitelio corneal. Asimismo, diversos autores han evidenciado la capacidad de los sistemas nanométricos de aumentar la penetración corneal y la biodisponibilidad de los fármacos administrados, mediante su liberación continua en el sitio objetivo del tejido intraocular (Agarwal *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2016). Esto respalda el potencial de las formulaciones para alcanzar las estructuras intraoculares minimizando la circulación sistémica y, además, eliminan la necesidad de administrar inyecciones repetidas e implantes intravítreos para lograr los niveles terapéuticos efectivos en tratamientos de patologías oculares del segmento posterior (Boiero, 2017). Además, demostraron ser sistemas versátiles en adaptar las propiedades de los fármacos como tamaño de partícula, solubilidad, potencial de superficie, conformación estructural y modificación en su superficie, lo que conduce a un mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas y su capacidad para vehicular fármacos. A su vez, debido su disminuido tamaño en orden de los nanómetros, estos sistemas presentan una mejorada compatibilidad con los tejidos oculares, baja irritación, menor efecto inflamatorio y ausencia de efectos adversos, con respecto a las formulaciones convencionales (Xu *et al.*, 2013).

En la actualidad, se han desarrollado numerosos SPF nanoparticulados con resultados positivos y auspiciosos en el tratamiento clínico de patologías oculares, con gran potencial para abordar los desafíos de la farmacoterapia ocular, proporcionando una administración local y sostenida del fármaco al tiempo que reducen la probabilidad de efectos secundarios. De esta manera, existe un gran potencial para optimizar la terapia al paciente y, fundamentalmente, los resultados clínicos.

En el presente trabajo de investigación se estudió el uso de sistemas nanoparticulados de diferente naturaleza, polimérica y basados en lípidos, como estrategia tecnológica de vectorización de fármacos destinado a la optimización de la farmacoterapia ocular. Se detallan a continuación, las principales características que presentan estos SPF nanotecnológicos.

1.1.3.2. Cristales líquidos nanoparticulados: Cubosomas

Los cubosomas (cristales líquidos nanoparticulados) se forman mediante procesos de estabilización estéricos o electrostáticos, modulados por el autoensamblaje de lípidos polares capaces de formar fases no laminares en exceso de agua y en presencia de un agente estabilizador (Madheswaran *et al.*, 2019). Estos lípidos formadores de estructuras son capaces de absorber una cierta cantidad de agua para luego formar espontáneamente fases tipo gel con estructuras internas únicas, formadas por una bicapa lipídica continua de recorrido sinuoso, con dos canales de agua congruentes que no se entrecruzan (Huang *et al.*, 2017). Como se observa en la *Figura 1.4*, estos sistemas presentan gran área superficial dada por la mayor proporción de lípidos que forma la nanopartícula, característica que le proporciona mayor capacidad para encapsular fármacos de diversa naturaleza (Tilekar *et al.*, 2014). Debido a la alta repulsión electrostática y el contenido de membrana lipídica, estos sistemas exhiben una alta estabilidad fisicoquímica y, además, tienen la capacidad de liberación sostenida, que puede permitir el direccionamiento de fármacos hacia órganos y tejidos específicos, facilitando la penetración celular. La microestructura de los cubosomas es similar a la de las membranas biológicas, lo que facilita la interacción del sistema portador con las bicapas lipídicas de la piel o las células epiteliales de la córnea (Rizwan *et al.*, 2013). Por la naturaleza de los materiales que lo componen, los cubosomas presentan propiedades no tóxicas, biodegradables y bioadhesivas que contribuyen a su aplicación como sistemas de administración de fármacos. En la actualidad, los cubosomas están siendo investigados como potenciales candidatos para la administración de fármacos por vía bucal, gastrointestinal, intravenosa, pulmonar, nasal, oral, rectal y vaginal con resultados favorables (Guo *et al.*, 2010; Madheswaran *et al.*, 2019).

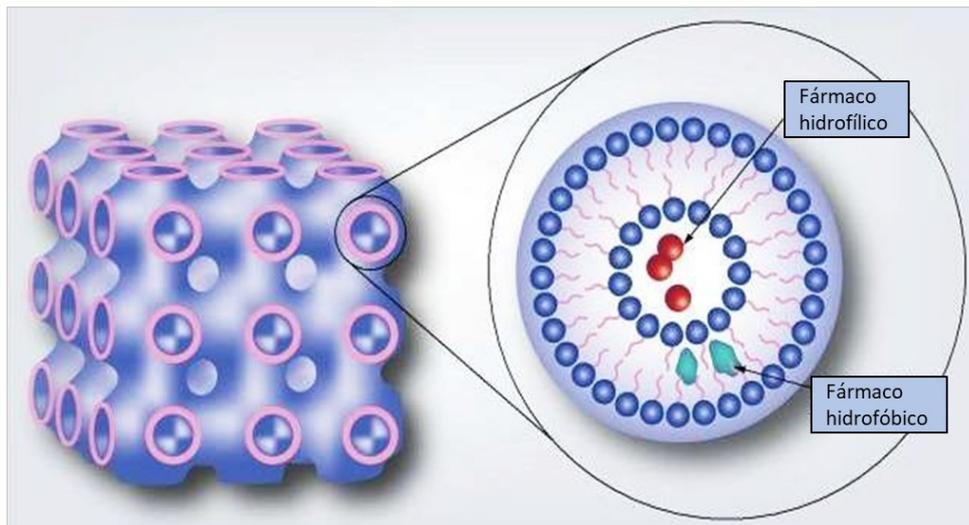


Figura 1.4. Cubosomas con diferentes modalidades de carga de fármacos
(Ilustración extraída de Tilekar y co. 2014).

1.1.3.3. Nanopartículas sólidas poliméricas

Las nanopartículas sólidas poliméricas pueden definirse como partículas coloidales sólidas que se obtienen a partir de polímeros naturales o sintéticos y dependiendo del método de preparación utilizado, pueden obtenerse como nanoesferas o nanocápsulas (Figura 1.5). Las nanoesferas son sistemas matriciales donde el fármaco se dispersa sobre toda la estructura o se adsorbe en la superficie. En cambio, las nanocápsulas, pueden compararse con sistemas vesiculares en el cual el fármaco se encuentra confinado dentro de una cavidad formado de un núcleo interno líquido recubierto por una membrana polimérica (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Una de sus características fundamentales es su tamaño, el cual generalmente se obtiene en un rango entre 100 a 500 nm. La formulación de polímeros biodegradables o bioerosionables como nanosistemas coloidales es muy prometedora para la administración de fármacos oftálmicos (Nagarwal *et al.*, 2009).

Diversos autores evidencian la capacidad de liberación controlada de estos nanosistemas y los presentan como prometedores portadores de fármacos para ser administrados por diferentes vías. Además, pueden mejorar la estabilidad de las sustancias activas y lograr una alta encapsulación del fármaco debido a la solubilidad optimizada en el núcleo interno (Gagliardi *et al.*, 2021; J. M. Llabot *et al.*, 2008). En cuanto a la administración por vía ocular, proporciona una mayor penetración y una mejora del tiempo de residencia en la superficie ocular promoviendo la absorción del fármaco a través de las barreras oculares. La utilización de polímeros biodegradables le confiere propiedades mucoadhesivas al nanosistema que minimiza el drenaje de la superficie ocular al interactuar con la mucina presente en la película lagrimal, mejorando el tiempo de contacto y la biodisponibilidad del fármaco (Gholizadeh *et al.*, 2021). Dependiendo de las propiedades del polímero y fármaco utilizados, estos nanosistemas pueden

obtenerse mediante diferentes técnicas, como coacervación, gelificación ionotrópica y emulsificación seguida de la eliminación del disolvente (Grassiri *et al.*, 2021).

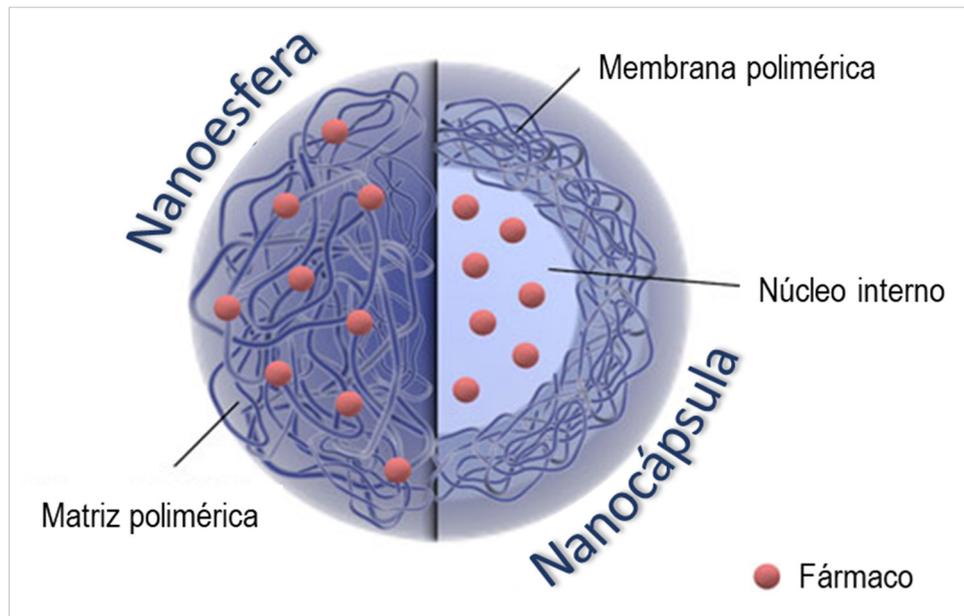


Figura 1.5. Nanopartículas sólidas poliméricas
(Ilustración extraída y adaptada de Gagliardi y co. 2021).

1.1.4. Patologías oculares seleccionadas

Las patologías neurodegenerativas afectan principalmente al segmento posterior del ojo, son de diversa etiología y se caracterizan por ser la principal causa de disfunciones visuales en la población mundial. Estas enfermedades degenerativas de carácter crónico, generan daños progresivos en la integridad neuronal y el nervio óptico, causando una pérdida irreversible de las células neuronales de la retina, principalmente de CGR, desencadenando una pérdida gradual del campo visual (Osborne *et al.*, 2016). En la actualidad, las neuropatías ópticas de afección visual con mayor prevalencia son la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada con la edad y el glaucoma (Xu and Chen, 2016).

1.1.4.1. Glaucoma

El glaucoma se considera un trastorno ocular neurodegenerativo que se caracteriza, por una pérdida progresiva de las CGRs y la aparición de lesiones y daños irreversibles a nivel de la cabeza del nervio óptico, que conducen a una pérdida del campo visual (Andrés-Guerrero *et al.*, 2017). Es una de las principales causas de ceguera en todo el mundo, junto con la enfermedad de cataratas y la degeneración macular asociada con la edad. En la actualidad, existen aproximadamente 76 millones de personas que padecen esta patología con una prevalencia entre 1-4% en personas mayores de 40 años, y se estima que este número ascenderá a 111.8 millones en el año 2040 (Hoffy *et al.*, 2020). Esta patología se define como una neuropatía óptica multifactorial y progresiva, de carácter crónico, que produce una pérdida gradual de la visión periférica.

Existen varios tipos de glaucoma, que se definen según las causas y la gravedad con la que transcurre la enfermedad. El *glaucoma de ángulo abierto*, es la forma más frecuente de glaucoma, se desarrolla con lentitud y es totalmente asintomático. Por este motivo, frecuentemente se retrasa el diagnóstico hasta una etapa avanzada de la patología, donde la función visual se encuentra seriamente comprometida (Lavik *et al.*, 2011). Uno de los factores claves en el desarrollo del glaucoma es la elevada PIO, la cual suele acompañarse de un daño estructural en el nervio óptico y la activación de vías relacionadas con el estrés oxidativo, que resulta en una degeneración irreversible de las CGRs (Reimondez-Troitiño *et al.*, 2015b).

Aunque la PIO no es el único parámetro involucrado en el glaucoma, es el factor de riesgo más importante en el inicio y la progresión de la enfermedad. Los valores de PIO en pacientes sanos oscilan entre 10 y 21 mmHg, mientras que, en estados patológicos el rango varía de 5 a 40 mmHg (Alm, 2014). Estos valores dependen del balance entre la velocidad de producción de HA en el cuerpo ciliar y la velocidad de eliminación, principalmente por la red trabecular (denominada vía convencional, es la principal vía de eliminación) o, en menor medida, por vía uveoescleral. Cuando este sistema de drenaje se desequilibra por un bloqueo parcial o total, se genera una acumulación de HA en la cámara anterior que provoca el aumento de la PIO (*Figura 1.6*). Este incremento desencadena un compromiso en el suministro de sangre a la retina por el exceso de presión, causando daños directos en el tejido neuronal (Tian *et al.*, 2015). Además, la presión elevada genera una obstrucción del flujo axo-plásmico a nivel de la fibra óptica, bloqueando el transporte retrógrado de factores neurotróficos al cuerpo neuronal de las CGRs desde sus axones. En consecuencia, estas células desencadenan un proceso de degeneración y muerte celular programada (Bua and Supuran, 2019; Xu and Chen, 2016).

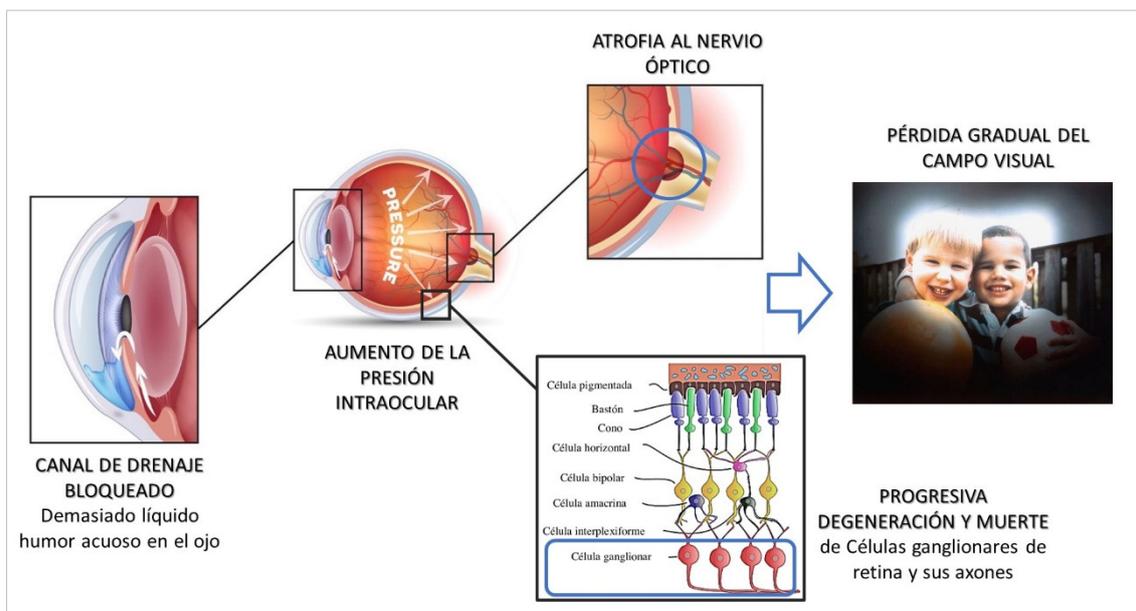


Figura 1.6. Esquema básico del proceso patológico de la enfermedad del glaucoma (Ilustración adaptada de [<https://anamariavasquez.com/glaucoma/>]).

El objetivo de la farmacoterapia del glaucoma es mantener la función y el campo visual mediante la protección de las estructuras intraoculares afectadas. Actualmente, el control de la PIO representa el objetivo principal del tratamiento del glaucoma para prevenir la pérdida de visión, retrasar la progresión de la enfermedad y preservar la calidad de vida de los pacientes (Yadav *et al.*, 2019). Estudios clínicos en pacientes glaucomatosos, han evidenciado que la reducción eficaz de la PIO da como resultado un retraso en el inicio y la progresión en la enfermedad en un 80-90% de los pacientes tratados (Nordmann *et al.*, 2003; Phu *et al.*, 2020). Para lograr este objetivo, se han desarrollado diversas estrategias médicas que incluyen medicamentos hipotensores, láser y cirugía. Dependiendo del tratamiento de elección, la PIO puede reducirse mediante tres mecanismos básicos: por supresión de la formación de humor acuoso, aumento del flujo de salida trabecular o aumento del flujo de salida uveal (Naik *et al.*, 2020). En la clínica médica, la primera línea de tratamiento es la utilización de medicamentos hipotensores de administración tópica, los cuales reducen la PIO mediante dos vías principales: (i) mejorando el drenaje del líquido ocular a través de la vía de la red trabecular, como análogos de prostaglandinas y agonistas colinérgicos; o (ii) reducir la producción de humor acuoso por el cuerpo ciliar, como betabloqueantes, alfa-agonistas e inhibidores de la anhidrasa carbónica (Reimondez-Troitiño *et al.*, 2015b).

No obstante, para algunos pacientes glaucomatosos la terapia hipotensora es insuficiente, difícil de lograr o se asocia a riesgos de efectos adversos, como es el caso de algunas terapias quirúrgicas. Asimismo, no todos los pacientes experimentan elevación de la PIO (glaucoma normotensivo) y la patología tiende avanzar a pesar de los tratamientos hipotensores (Naik *et al.*, 2020). En consecuencia, se ha focalizado en la búsqueda de terapias alternativas independientes de la reducción de la PIO, que apunten a la disminución de la muerte celular por apoptosis de las células neuronales de la retina, mecanismos involucrados en los procesos patológicos. Estas terapias se basan en la neuroprotección, proceso que se define como la preservación de la estructura y/o función neuronal. La terapia de neuroprotección es un enfoque alternativo para ralentizar la pérdida funcional en el glaucoma mediante tratamientos farmacológicos capaces de prevenir, frenar e incluso revertir la muerte celular de CGR y promover su supervivencia (Tian *et al.*, 2015). La degeneración neuronal de la retina observada en la patología del glaucoma, se desarrolla en tres pasos principales: (i) daño del axón primario de las CGRs; (ii) degeneración o muerte neuronal ("*degeneración primaria*"); y (ii) posterior daño y muerte de las neuronas contiguas en la capa de CGR ("*degeneración secundaria*"). Estos mecanismos ocurren debido a la sobreexposición neuronal a agentes citotóxicos, como glutamato o especies reactivas de oxígeno (ROS), consecuente al daño axonal generado (Andrés-Guerrero *et al.*, 2017).

En este sentido, la terapia de neuroprotección resulta un tratamiento de interés para prevenir la pérdida de la función visual en pacientes con glaucoma. Para ello, se han estudiado la utilización de agente terapéuticos que actúan en la interferencia de diversos mecanismos y/o bloquean sustancias que desencadenen la muerte neuronal, o promueven la supervivencia de CGR interrumpiendo la señalización intracelular de daño axonal e inhibiendo la muerte neuronal (Belforte *et al.*, 2010; Levin *et al.*, 2017; Naik *et*

al., 2020; Tian *et al.*, 2015). Dado que la reducción de la PIO sigue siendo un tratamiento eficaz y de elección, se enfatiza en un futuro utilizar la neuroprotección como terapia complementaria no sólo para retrasar la progresión de la enfermedad, sino también, para detener el avance de la enfermedad e incluso restaurar la función a través de la regeneración del tejido neural.

1.1.5. Proyecto de Tesis Doctoral

En la presente Tesis Doctoral se desarrollaron sistemas de administración de fármacos basados en nanotecnología como estrategia para la optimización de la terapia ocular. En el marco de un proyecto de investigación y desarrollo en tecnología farmacéutica, el mismo consta de dos áreas de estudio paralelas y complementarias. Como se observa en el esquema de la *Figura 1.7*, el **área I** comprende el diseño, desarrollo y evaluación *in vitro* de los SPF nanotecnológicos y la exploración de nuevos materiales biotecnológicos. En el **área II**, se contempla la evaluación biomédica y biofarmacéutica de los sistemas desarrollados, a través de la cuantificación de fármaco en fluidos biológicos, evaluación de compatibilidad y eficacia *in vivo* de los tratamientos en modelos animales, estudios de toxicidad e irritación. Posteriormente, se realiza el **procesamiento y análisis de los resultados obtenidos** y se evalúa la posibilidad de publicación, protección de los datos por patentes o continuar los estudios en una etapa clínica.

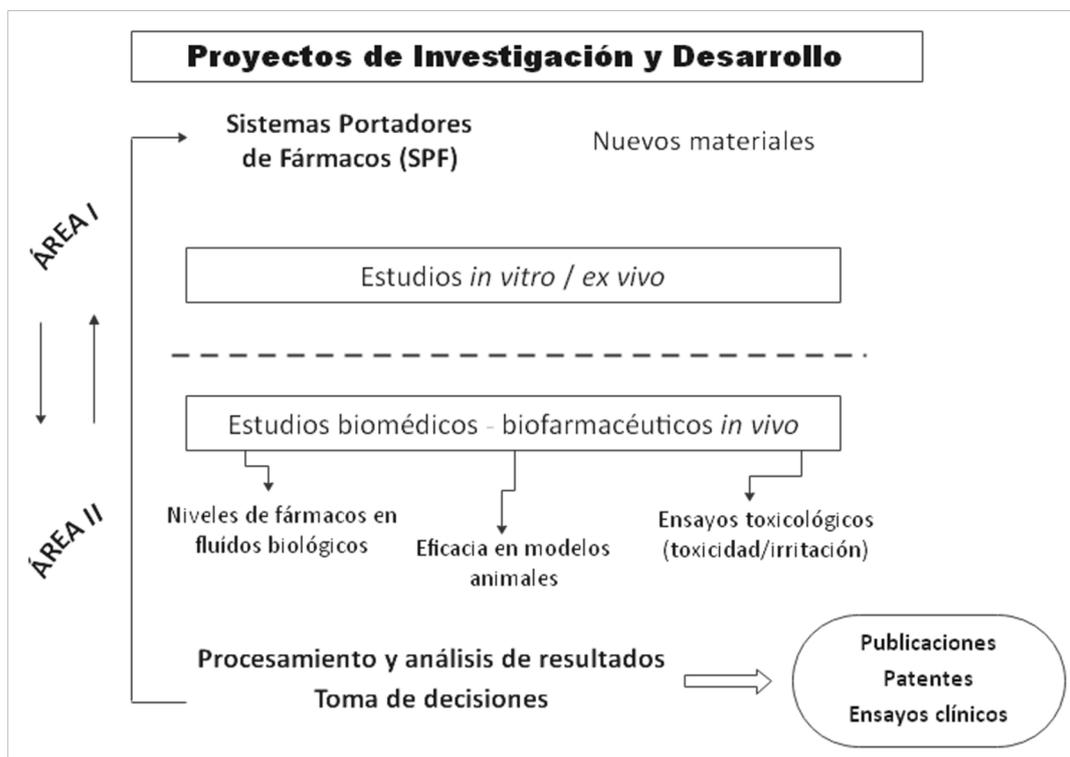


Figura 1.7. Esquema de trabajo representativo para el desarrollo de nuevos sistemas portadores de fármacos.

1.2. Hipótesis y Objetivos Propuestos

El objetivo de la farmacoterapia del glaucoma es evitar la progresión de la enfermedad, mantener la función visual y preservar la calidad de vida del paciente. Para lograrlo, se requieren de tratamientos que utilicen terapias combinadas como estrategia clínica y que involucre no sólo la disminución de la PIO, sino también, la inhibición farmacológica de mecanismos que desencadenan la muerte neuronal de CGR y promuevan su supervivencia. A su vez, para lograr un tratamiento efectivo, se debe optimizar la administración tópica de fármacos, con la finalidad de superar los inconvenientes asociados a la vía ocular y mejorar su biodisponibilidad.

En función de lo expuesto, el presente Trabajo de Tesis plantea el desarrollo de nuevos sistemas nanotecnológicos que permitan mejorar la eficacia terapéutica de fármacos convencionales destinados a optimizar la terapia del glaucoma. Para ello, se proponen dos posibles tratamientos aplicando diferentes estrategias nanotecnológicas:

- (i) Diseño, desarrollo y evaluación de cristales líquidos nanoparticulados (cubosomas) cargados con latanoprost, como fármaco hipotensor de primera línea;
- (ii) Estudio del efecto terapéutico de melatonina como fármaco antioxidante y neuroprotector en mecanismos de degeneración y muerte celular de CGR y posterior diseño y obtención de nanocápsulas de etilcelulosa para vehiculizar melatonina, propuesta como una terapia de neuroprotección.

De esta manera, se espera lograr un tratamiento combinado para la farmacoterapia del glaucoma mediante el control del aumento de la PIO en el segmento anterior y la prevención de la degeneración y muerte de las CGR en el segmento posterior, mediante la aplicación de un fármaco neuroprotector. Para ambos tratamientos, se desarrollan SPF nanoparticulados como estrategias para superar las barreras biológicas oculares, lograr una liberación sostenida de fármaco y aumentar su biodisponibilidad en los tejidos intraoculares, con el objetivo final de mejorar la eficacia y seguridad en la terapia del glaucoma.

*Como **objetivo general** se propone desarrollar nuevos sistemas farmacéuticos de base nanotecnológica para aportar al tratamiento combinado para la farmacoterapia del glaucoma mediante el control del aumento de la PIO en el segmento anterior y la prevención de la degeneración y muerte de las CGRs en el segmento posterior, mediante la aplicación de un fármaco neuroprotector.*

A continuación, se detalla el esquema propuesto del presente Trabajo de Tesis Doctoral:

- **Capítulo 2:** Obtención, caracterización y evaluación de cristales líquidos nanoparticulados (cubosomas) de latanoprost
- **Capítulo 3:** Evaluación del efecto antioxidante de melatonina en modelo animal de degeneración retiniana en conejos
- **Capítulo 4:** Obtención, caracterización y evaluación de nanocápsulas de etilcelulosa de melatonina
- **Conclusiones Generales**

Cabe aclarar, que cada capítulo fue organizado de manera individual con su correspondiente introducción, materiales, métodos, resultados, discusión y conclusiones parciales.

Capítulo 2:

OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE CRISTALES LÍQUIDOS NANOPARTICULADOS (CUBOSOMAS) DE LATANOPROST

CAPÍTULO 2: Obtención, caracterización y evaluación de cristales líquidos nanoparticulados (cubosomas) de latanoprost

2.1. INTRODUCCIÓN

El glaucoma es una neuropatía degenerativa óptica que en la mayoría de los casos se presenta de forma crónica e irreversible. Comprende una serie de enfermedades oculares con diferentes causas cuyo principal síntoma común es el aumento de la presión intraocular (PIO). Si los valores elevados de PIO persisten durante un prolongado periodo de tiempo, puede causar daños irreversibles en las estructuras nerviosas oculares con consecuente atrofia del nervio óptico, resultando en una disminución progresiva del campo visual y posterior ceguera (Varma *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2017). Aunque existen varios factores de riesgo asociados con la aparición y progresión del glaucoma, hasta ahora, la presencia de niveles elevados de PIO sigue siendo el factor de riesgo más importante que puede ser modificado y tratado (Mozaffarieh and Flammer, 2013). Por lo tanto, la disminución de la PIO a valores normales es la forma más eficiente y clínicamente aceptada en la terapia del glaucoma, para evitar el deterioro del nervio óptico y la progresión de la pérdida del campo visual.

A pesar de los avances en las terapias láser y quirúrgicas, los tratamientos tópicos con fármacos hipotensores siguen siendo la terapia estándar de elección para el glaucoma que, como enfermedad crónica, requiere de tratamientos a largo plazo frecuentemente con el uso de múltiples fármacos. Sin embargo, la mayoría de las soluciones disponibles comercialmente presentan numerosas limitaciones, dado que son sistemas de liberación inmediata, se eliminan rápidamente de la superficie ocular y tienen baja biodisponibilidad. Los factores precorneales y las barreras anatómicas oculares afectan negativamente la absorción de los fármacos administrados de manera tópica. Después de la instilación, menos del 5 % del fármaco aplicado atraviesa la córnea y alcanza los tejidos intraoculares, mientras que la mayor parte es absorbida sistémicamente vía conjuntiva y conducto nasolacrimal (Gaudana *et al.*, 2010).

En este contexto, una opción de tratamiento es latanoprost (LN) un profármaco esterificado análogo de prostaglandina (derivado de la prostaglandina F2 α , *Figura 2.1*) con potente efecto hipotensor ocular (Martinez-de-la-Casa *et al.*, 2019; Sjöquist and Stjernschantz, 2002). Después de la administración ocular, LN como componente lipofílico es absorbido a través de la córnea, donde es hidrolizado a su forma ácida por enzimas esterasas, su forma biológicamente activa. Tiene alta selectividad por el subtipo FP de los receptores prostanoideos (Maclver *et al.*, 2021; Patel and Spencer, 1996). En adultos, la concentración máxima de LN en humor acuoso (HA) se detectó 1 a 2 horas después de la aplicación tópica de una dosis de 15-30 ng.mL⁻¹. Tiene una vida media de

2-3 horas en el ojo. El metabolismo se produce a nivel de hígado, por un mecanismo de beta-oxidación del ácido de LN a sus principales metabolitos y la mayoría de la dosis es excretada por vía urinaria (Karslioglu *et al.*, 2015).

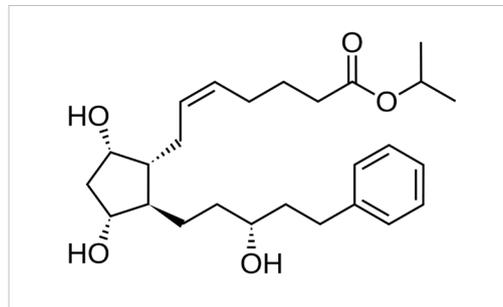


Figura 2.1. Estructura química del Latanoprost

El mecanismo propuesto para su efecto hipotensor ocular es la estimulación del drenaje de HA mediante un aumento en el flujo de salida por vía uveoescleral. Por lo tanto, el aporte nutricional de las estructuras avasculares del segmento anterior no se ve comprometido y el efecto hipotensor no está limitado por el nivel de presión venosa episcleral (Adams and Papillon, 2020; Strier, 1997). Una razón del aumento del drenaje de HA a través del músculo ciliar en tratamientos con prostaglandinas, es por un mecanismo de regulación de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y sus precursores, junto con la remodelación de la matriz extracelular. Estos efectos causan un cambio en la permeabilidad de los tejidos asociados con las vías de drenaje de HA, dando como resultado alteraciones en la resistencia y/o velocidad del flujo de salida (Klimko and Sharif, 2019; Stjernschantz, 2001). Además, LN protege las células ganglionares primarias de la retina, independientemente de la reducción de la PIO, al estimular glutatión (GSH) y reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fuma *et al.*, 2016).

Actualmente, LN es el fármaco de primera línea para el tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto, debido a que presenta una buena eficacia hipotensora con duración prolongada del efector reductor de PIO, no presenta efectos secundarios sistémicos relevantes y tiene un buen perfil de tolerabilidad general (Alm, 2014; Hou *et al.*, 2020). Desde 1996, se encuentra en el mercado como solución de LN en una concentración de 0,005% y se administra de manera tópica para reducir la PIO elevada y controlar la progresión del glaucoma. La dosis recomendada es una gota en cada ojo una vez al día (Y. H. Cheng *et al.*, 2016).

Es bien sabido que el cruce de fármacos administrados de manera local se encuentra restringido selectivamente por las membranas y barreras biológicas del tejido ocular, sumado al corto tiempo de residencia del medicamento en la superficie ocular (Barar *et al.*, 2016). Estos factores limitan la entrega adecuada y regular del agente terapéutico en las estructuras internas oculares afectando su biodisponibilidad (Weinreb *et al.*, 2015) Por lo tanto, se necesita una instilación frecuente de LN para lograr un nivel terapéutico en los tejidos oculares que aseguren la efectividad del tratamiento. La exposición crónica a la solución de LN podrían aumentar las posibilidades de desarrollar efectos secundarios indeseables en la superficie ocular, tales como lagrimeo, ardor,

irritación y sequedad, asociados al uso de conservantes como cloruro de benzalconio (Alm, 2014; Y. Cheng *et al.*, 2016; Harasymowycz *et al.*, 2021). La aparición de estos efectos adversos podrían conducir a un cumplimiento deficiente del paciente al régimen de medicación y resultar en el fracaso del tratamiento ante la progresión de la enfermedad (Hsiao *et al.*, 2014). Por esta razón, el tratamiento a largo plazo del glaucoma requiere de sistemas avanzados de administración ocular que permitan una liberación prolongada y potencien la permeación de fármacos hipotensores hacia los segmentos anterior o posterior del ojo, tendientes a disminuir la frecuencia de administración, mejorar el cumplimiento del paciente y lograr el éxito en la terapia.

Dada esta creciente necesidad del desarrollo de plataformas de liberación controlada de fármacos oculares que optimicen la farmacoterapia del glaucoma, el presente trabajo de tesis doctoral propone como estrategia tecnológica la obtención de cristales líquidos nanoparticulados como nuevos sistemas portadores de LN. Se trata de sistemas dispersos que comparten las características tanto de líquidos como de sustancias cristalinas. Los cristales líquidos se destacan entre los sistemas nanoparticulados con fines terapéuticos, por la presencia de dominios hidrófilos e hidrófobos dispuestos en su estructura, lo que permite la incorporación de moléculas con una amplia gama de propiedades fisicoquímicas (Barriga *et al.*, 2019; Eldeeb *et al.*, 2019a).

Las estructuras cristalinas líquidas coloidales son sistemas dispersos que comparten las características de las sustancias líquidas y cristalinas. También se les llama "mesofases" por su estado físico intermedio. Los lípidos polares capaces de formar cristales líquidos (liotrópicos) pueden absorber cierta cantidad de agua y formar espontáneamente fases viscosas (tipo gel). Los cristales líquidos cúbicos nanométricos, denominados cubosomas, son nanopartículas individuales que resultan de la dispersión coloidal de estructuras cristalinas cúbicas bicontinuas en agua, utilizando tensioactivos adecuados (Karami and Hamidi, 2016). Los cubosomas se caracterizan por tener una estructura isotrópica única y termodinámicamente estable, que consiste en una bicapa lipídica bicontinua tridimensional con dos redes congruentes de canales de agua, en las cuales se pueden incorporar fármacos de diferente polaridad (Azmi *et al.*, 2018). Las moléculas anfifílicas más estudiadas para la formación de cubosomas para administración de fármacos, capaces de autoensamblarse espontáneamente en agua y exhibir un comportamiento líquido-cristalino liotrópico, son el monooleato de glicerilo (GMO) y fitantriol (FIT) (Liu *et al.*, 2015).

Diversos estudios han reportado la obtención de cubosomas formados a partir de dispersiones de GMO y Poloxamer 407 en agua con propiedades prometedoras para la administración oftálmica de diferentes fármacos como dexametasona (Gan *et al.*, 2010) y brimonidina (Eldeeb *et al.*, 2019b). Estos estudios informaron que la permeabilidad corneal del fármaco formulado en cubosomas mejoró significativamente y exhibió un aclaramiento lento y una residencia prolongada en el espacio preocular. Posiblemente este comportamiento esté asociado con las propiedades fisicoquímicas de los sistemas y la similitud de la bicapa lipídica con la microestructura de la membrana celular. Además,

se demostró que la formulación era prácticamente inofensiva en una prueba de irritación ocular y no se observaron efectos adversos después de la administración tópica. Sin embargo, los glicerolípidos contienen un enlace éster en su cadena alifática, lo que los hace más susceptibles a hidrólisis catalizada por esterasas junto con la consiguiente pérdida de su estructura única de cristal líquido.

En este sentido, FIT es un tensioactivo seguro y biocompatible, utilizado como potencial lípido formador de cristales líquidos (Akhlaghi *et al.*, 2020). Esto se debe a que la cadena principal de FIT podría ofrecer una mayor estabilidad estructural en comparación con GMO. Las matrices cristalinas líquidas a base de FIT muestran una alta estabilidad y biocompatibilidad, capaces de controlar la liberación de fármacos de diferente naturaleza, demostrando su potencial como sistema de administración sostenido de fármacos (Karami and Hamidi, 2016; Stenhoff *et al.*, 2020). Esto ha sido reportado para fármacos de administración oral como anfotericina B (infecciones fúngicas), donde el perfil del fármaco en plasma para las formulaciones cubosomales mostraron una cinética de liberación sostenida y, una biodisponibilidad relativa de hasta 3 veces superior al grupo control; y cinarizina (patologías cardiovasculares), para el cual demostró la capacidad de los cubosomas para mantener la liberación del fármaco por más de 48 h, mientras que cubosomas de GMO fueron rápidamente digeridos y degradados horas posteriores a la exposición a los fluidos gástrico-intestinales simulados, limitando el efecto de liberación sostenida (Akbar *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015).

Los cubosomas presentan propiedades no tóxicas, biodegradables, bioadhesivas y poseen alta estabilidad térmica, lo cual transforman a estos sistemas como potencialmente útiles para la administración de fármacos por vía oftálmica (Barriga *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2010). Son candidatos ideales para la entrega de productos farmacéuticos, debido a sus materias primas económicas, mayor beneficio de solubilidad del ingrediente activo (carga útil mejorada) y su potencial capacidad de liberación sostenida (Garg *et al.*, 2007). Cabe señalar que la estructura y composición de los cubosomas es similar a la de las membranas biológicas; esto permite que los portadores de lípidos se unan más fácilmente a las bicapas lipídicas de las células epiteliales corneales. Por todas estas características fisicoquímicas, constituyen excelentes candidatos como plataformas de liberación de fármacos para administración ocular (Huang *et al.*, 2017; Jabłonowska *et al.*, 2021).

En función de lo expuesto, se establece como **hipótesis de trabajo** que los cristales líquidos nanoparticulados "cubosomas", pueden optimizar y mejorar la eficacia terapéutica de LN, dado que estos sistemas consiguen aumentar el tiempo de retención en el lugar de aplicación, mejorar la permeabilidad, liberar de forma sostenida el fármaco y finalmente, disminuir los efectos irritantes. A partir de lo planteado, el **objetivo principal** del presente capítulo consistió en la obtención, caracterización y evaluación de los cubosomas cargados con LN (CubLnp).

Los experimentos de caracterización de cubosomas se efectuaron en colaboración con la Dra. Seyedeh Parinaz Akhlaghi y el Dr. Watson Loh, en el Laboratorio del Instituto de Química de la Universidad de Campinas (UNICAMP) Campinas, Brasil, en el marco de una estadía de investigación de doctorado financiada con el Programa de "Movilidad en el Posgrado" otorgada por la Red de Macrouniversidades de América Latina y el Caribe. Los estudios experimentales in vivo de evaluación del efecto terapéutico se realizaron en colaboración con el Dr. Ignacio L. Tártara.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Latanoprost y excipientes

LN (éster isopropílico de 13,14-dihidro-17-fenil-18,19,20-trinor-PGF_{2α}) con una pureza del 98% fue adquirido en Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos). Los cubosomas fueron obtenidos a partir de la dispersión coloidal de un lípido polar en combinación con un agente estabilizador y la molécula de interés farmacológico, que se autoensamblan para formar una fase cúbica bicontinua de lípidos (Barriga *et al.*, 2019).

FIT (3,7,11,15-tetrametil-1,2,3-hexadecanotriol) utilizado como lípido polar, fue obsequiado por DSM *Nutritional Products* Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina). Es un alcohol polihidroxílico con tres grupos hidroxilo presentes en un extremo de la molécula unidos a una cadena de carbono larga en el otro extremo, como se muestra en la *Figura 2.2*.

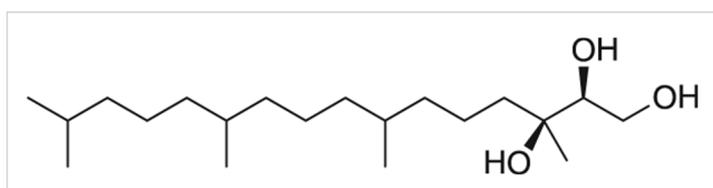


Figura 2.2. Estructura química de Fitantriol

Como agente estabilizador, se utilizó el tensioactivo Poloxamer P407 de nombre comercial Pluronic® F127 (PEO₉₈-PPO₆₇-PEO₉₈) adquirido en BASF industria química (Buenos Aires, Argentina). El mismo fue utilizado en una concentración 5,0% P/V, preparado a partir de agua ultra pura (18,2 MΩ cm⁻¹) provisto por Milli RO System® (Millipore® Corp., Bedford, Massachusetts, USA).

Poloxamer P407 está formado por copolímeros tribloque no iónicos compuestos por una cadena hidrofóbica central de poli óxido de propileno (PPO) rodeada por dos cadenas hidrofílicas de poli óxido de etileno (PEO) (*figura 2.3*), con un peso molecular promedio de 12.600 g.mol⁻¹ (Braun, 2011). Actúa como estabilizador estérico a través de la adsorción e incorporación de sus bloques de PPO hidrofóbicos en la superficie de las

nanopartículas, manteniendo así la estructura interna de la fase cúbica (Akhlaghi *et al.*, 2016).

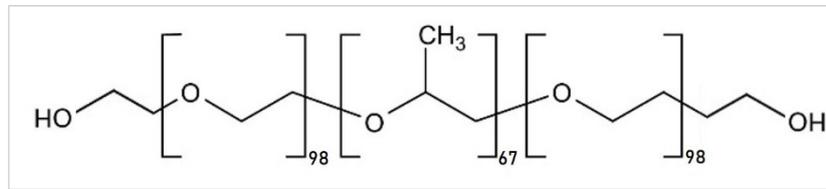


Figura 2.3. Estructura química del Poloxamer F127

Por sus características anfifílicas, posee propiedades tensioactivas que les permiten interactuar con superficies hidrófobas y membranas biológicas. Otras propiedades relevantes a nivel farmacéutico, es especialmente la termo-respuesta, la alta capacidad para solubilizar fármacos, buenas características de liberación de fármacos y la ausencia de toxicidad en las membranas mucosas, por lo que es ampliamente reconocido en el área farmacéutica como material seguro (Bruschi *et al.*, 2017).

Para evaluar la eficacia *in vivo* de las formulaciones obtenidas, se utilizó como control una formulación comercial de LN (Louten[®]), adquirida en Laboratorios Poen (Bermúdez 1004, Buenos Aires, Argentina).

2.3. ANIMALES

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en conejos hembra *New Zealand* de 2 a 2,5 kg. Los animales se mantuvieron en estrictas condiciones de animalario, con ambiente controlado de luz/oscuridad con ciclos de 12/12 h en jaulas individuales con libre acceso a alimento y agua. Todos los experimentos se realizaron conforme a los procedimientos de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) resolución sobre el uso de animales en la investigación, la *European Communities Council Directive* (86/609/CEE) y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Res. HCD N°44/17).

2.4. METODOLOGÍA

2.4.1. Método *Top-Down*

Los cristales líquidos nanoparticulados, cubosomas (CUB), fueron obtenidos por el método *Top-Down* (TD) descrito inicialmente por Ljusberg-Wahren (H. Ljusberg-Wahren, L. Nyberg, 1996). Es la técnica más comúnmente utilizada para la preparación de CUB, y consiste en dos pasos:

Paso uno: Formación de la fase cúbica granel (denominado "*bulk*"), que se logra a partir de la mezcla de lípidos formadores de estructura junto con estabilizadores para evitar la agregación;

Paso dos: El resultado del primer paso, se dispersa en una solución acuosa con el agente estabilizante mediante la aplicación de alta energía, como sonicación, tensión cortante (metodología denominada “*shearing*” en inglés) u homogeneización a alta presión para finalmente formar los cristales líquidos nanoparticulados (Guo *et al.*, 2010; Karami and Hamidi, 2016).

Estudios previos llevados a cabo por el grupo del Dr. Watson Loh (Akhlaghi *et al.*, 2016) sugieren el método TD por ultrasonido para la elaboración de CUB a partir de una proporción adecuada de FIT, como lípido formador de estructura, y Poloxamer P407, como agente estabilizador. Los resultados muestran que las formulaciones de CUB obtenidas por esta técnica presentan menos formación de agregados, tamaños de partícula pequeños (aprox. 200 nm), índices de polidispersidad bajos y una buena estabilidad.

2.4.1.1. Obtención de CUB blanco y cargados con LN

Las formulaciones de CUB blanco y cargados con LN (CubLnp) se obtuvieron por el método TD mediante el uso de ultrasonido. Se prepararon CubLnp con diferentes concentraciones de LN que van desde 0,00125% p/v hasta 0,02000% p/v con respecto al lípido FIT. La composición de LN de las formulaciones fueron seleccionadas a partir de la concentración de eficacia clínica de LN 0,005% p/v, actualmente comercializada para el tratamiento del glaucoma. El proceso de obtención fue dividido en dos pasos:

Paso uno: Para la obtención del *bulk* de fase cúbica, aproximadamente 200 mg de FIT se calentaron a 40°C en un vial color ámbar, hasta obtener una viscosidad que le permita fluir libremente. Posteriormente, para las formulaciones CubLnp se incorpora el LN en una solución de etanol (en diferentes proporciones según la concentración de CubLnp) y se mantiene a 40°C para evaporar completamente el etanol restante. A continuación, se añadió 1 mL de una solución madre de Poloxamer F127 (concentración 5% p/v), a la misma temperatura y se agitó en vórtex durante 30 s. Luego, se agregaron 9 mL de agua ultra pura a 40°C hasta un volumen final de 10 mL. En la *tabla 2.1* se muestran las proporciones de FIT en relación a la concentración de LN para cada CubLnp formulado.

Tabla 2.1. Proporciones de FIT en *%.mol* para cada concentración de LN de las formulaciones CubLnp (*% p/v*) formuladas.

Formulación	Relación FIT: LN (%.mol)
CubLnp 0,00125% p/v	99,5: 0,5
CubLnp 0,00250% p/v	99,0: 1,0
CubLnp 0,00500% p/v	98,0: 2,0
CubLnp 0,01000% p/v	96,0: 4,0
CubLnp 0,02000% p/v	93,0: 7,0

Paso dos: Posteriormente, las mezclas se dispersaron y homogeneizaron mediante ultrasonido (equipo Hielscher UP100H, Alemania, utilizando una sonda de sonicación MS7) a 40°C, 80% de amplitud y un ciclo de pulso 1 durante 30 min, hasta formar una dispersión lechosa.

En la *figura 2.4* se esquematiza el proceso de obtención de CubLnp mediante el método TD por ultrasonido.

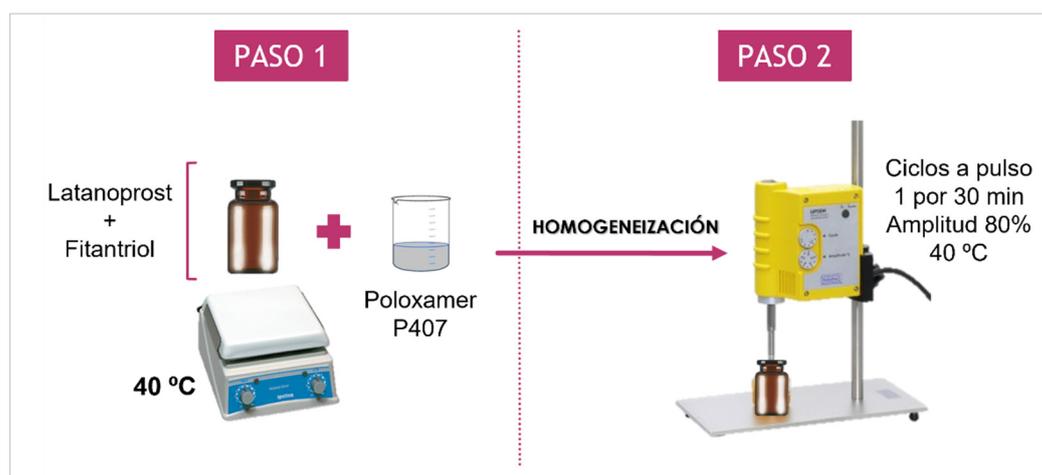


Figura 2.4. Método Top-Down para obtención de cubosomas

2.4.2. Caracterización de CubLnp

2.4.2.1. Mediciones de Tamaño de Partícula y Potencial Electrocinético

Los valores de coeficiente de difusión (CD), diámetro hidrodinámico (d_H) o tamaño medio de partícula (TMP) e índice de polidispersidad (IP), de los CUB blanco y los cargados con LN, fueron determinados mediante espectroscopia de correlación fotónica, también denominada dispersión dinámica de luz (DLS). Los valores de potencial electrocinético o potencial zeta (PZ) fueron determinados por la técnica de electroforesis dinámica de la luz.

Para todas las mediciones, se utilizó un equipo Zetasizer[®] Nanoserie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A, Reino Unido) provisto de un láser de diodo que opera a una longitud de onda de 632,8 nm y un ángulo de detección de 173°.

Como material de referencia, se seleccionó Poloxamer F127, con un índice de refracción de 1.470 y condiciones de absorción de 0,010. Se estableció agua como agente dispersante y se fijaron los siguientes valores de viscosidad 0,8872 mPas, índice de refracción 1,330 y constante dieléctrica 78,5.

Las mediciones del diámetro de las nanopartículas e IP se obtuvieron a partir de la función de autocorrelación suministrada por el software del equipo *Zetasizer Nano 7.1 software* (Malvern Instruments S.A, Reino Unido), el cual utiliza el método de

"Cumulants", que infiere el diámetro a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 2.1).

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

Ec. 2.1

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. Se consideran los valores de viscosidad del solvente informados en bibliografía. Los valores de PZ se obtuvieron a partir del análisis de software del equipo que utiliza la ecuación de Smoluchowski.

Las muestras se diluyeron con agua desionizada para ajustar el nivel de señal y las mediciones fueron realizadas a 25°C. La medición resultante fue el promedio de tres análisis consecutivos (100 s) para al menos tres muestras independientes (n=3). Se comprobó previamente que las mediciones no presentan modificaciones significativas con respecto a las diluciones realizadas.

2.4.2.2. Osmolaridad y pH

Los valores de pH y osmolaridad de las formulaciones se determinaron utilizando un pHmetro SevenMulti (Mettler Toledo®, Ohio, Estados Unidos) y un osmómetro de presión de vapor Vapro® modelo 5600 (ELITechGroup, Wescor Ltda., Utah, Estados Unidos) calibrado con soluciones estándares de 100, 290 y 1000 mOsm.kg⁻¹. Se utilizó como referencia una solución de NaCl 0,9% p/v (300 mOsm.kg⁻¹). Ambos valores se midieron por triplicado para cada muestra (n = 3).

2.4.2.3. Dispersión de Rayos X a Bajo Ángulo

Para identificar las estructuras cristalinas líquidas y los grupos espaciales de las nanoestructuras internas de las dispersiones, se realizaron mediciones de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS, sus siglas en inglés "*small-angle X-ray scattering*") en la línea de luz SAXS1 del Laboratorio Brasileño de Luz de Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil).

SAXS es una técnica mediante la cual se pueden cuantificar las diferencias de densidad a nanoescala en una muestra (como nanopartículas en suspensión) analizando el comportamiento de la dispersión elástica de los rayos X, casi paralelos y monocromáticos, cuando viajan a través del material registrando su dispersión en ángulos pequeños (generalmente, por debajo de unos 5 grados). La información de dispersión debe analizarse en el espacio recíproco, y se requiere modelado o ajuste para extraer la información (Craievich, 2017).

Para el estudio, las muestras se colocaron en una celda con una ventana de mica en un baño de agua a temperatura controlada de 25°C. Las mediciones se realizaron a

una longitud de onda de rayos X de 1,608 Å con una distancia de la muestra al detector de alrededor de 600 mm. El ángulo de dispersión se calibró con un patrón de behenato de plata (Krumrey, 2019). El tiempo de adquisición de cada muestra fue de 50 s. El software Fit2D fue utilizado para integrar imágenes CCD, restar el fondo parásito y la dispersión del disolvente (blanco), en caso que fuera necesario.

2.4.2.4. Microscopía Electrónica de Transmisión Criogénica

El microscopio electrónico de transmisión criogénica (*Cryo-TEM*, por sus siglas en inglés) es un instrumento que permite estudiar el tamaño, la forma y la estructura interna de los sistemas portadores nanoparticulados. Puede concebirse como un microscopio óptico invertido, donde las imágenes se construyen a partir de la transmisión de electrones de una muestra cuando sobre ella incide un haz de electrones a alta energía, a través de un sistema de lentes electromagnéticas (entre 80 a 200 kV). En *Cryo-TEM*, la muestra se visualiza directamente en el estado hidratado congelado mantenida en un soporte especializado con nitrógeno líquido como agente refrigerante (Kuntsche *et al.*, 2011).

Para estudiar la morfología de los sistemas CubLnp, se llevó a cabo la técnica *Cryo-TEM* en el Laboratorio Nacional Brasileño de Nanotecnología (LNNano, CNPEM, Brasil). Las muestras se prepararon en ambiente controlado con condiciones de temperatura y humedad fijadas a 22°C y 100%, respectivamente, en un sistema de vitrificación automatizado Vitrobot Mark IV (FEI, Holanda). Para esta técnica, se utilizó una rejilla de cobre recubierta de carbono de 300 mallas PELCO® (TED Pella, Redding, Estados Unidos), previamente sometida a una descarga luminiscente. Este tratamiento fue generado por un sistema de descarga easiGlow® PELCO (TED Pella, Redding, Estados Unidos) con una corriente negativa de 15 mA durante 10 s.

Para el estudio morfológico de la muestra, se depositó una gota de 3 µL de la muestra en la rejilla de cobre y se trasladó a un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-2100, que opera a 200 kV. Las muestras se analizaron en condiciones de dosis baja con desenfoque en un rango de -2 µm a -4 µm. Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara CMOS F-416 y el software EMMENU, versión 4.0.9.52 (TVIPS, Alemania). Las fotografías de *Cryo-TEM* adquiridas fueron procesadas por el software Image J®, con el fin de obtener más información sobre la estructura interna de las nanopartículas mediante el tratamiento digital de señales (Transformada Rápida de Fourier).

2.4.2.5. Calorimetría de Titulación Isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (*ITC*, por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada en estudios cuantitativos de una gran variedad de interacciones biomoleculares. Es una medición directa del calor que se libera o absorbe durante un evento de enlace molecular, mediante la titulación gradual del ligando en la

celda de la muestra que contiene la molécula de interés. Esta metodología permite la determinación de la afinidad, la estequiometría, la entropía y entalpía de la reacción de enlace en solución (Ladbury, 2001).

Para investigar las interacciones entre LN y los CUB blanco, se utilizó un calorímetro de titulación isotérmica MicroCal VP-ITC (Malvern Panalytical Ltd., Northampton, MA, Estados Unidos).

Una vez logrado el equilibrio térmico, se realizaron las titulaciones a 25°C inyectando alícuotas en forma de gota (15 μL) del titulante (LN) a una concentración de 0,00500% en una celda de muestra de 1,43 mL llena de CUB blanco. Las valoraciones de control se realizaron inyectando la misma alícuota de LN en una concentración de 0,00500% en agua para medir el calor generado en este proceso de dilución. Las inyecciones consecutivas se llevaron a cabo automáticamente utilizando el software VPViewer 2000, después de ajustar el volumen, número y tiempo entre cada inyección.

2.4.2.6. Contenido de Fármaco y Eficiencia de Encapsulación

Para la cuantificación de LN, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (*HPLC*, por sus siglas en inglés "*High performance liquid chromatography*"), mediante un método que permitiera la resolución de la elución del fármaco y de los componentes del sistema blanco. Se utilizó un equipo HPLC Agilent Serie 1100 acoplado a un detector UV Agilent de longitud de onda múltiple (MWD, por sus siglas en inglés), equipado con un módulo de inyector automático y un compartimento de columna termostática. Para el control instrumental y la adquisición de datos, se trabajó con el *software Agilent ChemStation* (Rev. B.03.01). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna analítica PhenoSphere-NEXT™ C18 LC (5 μm de tamaño de partícula y 250 mm x 4,60 mm de longitud) de Phenomenex® a temperatura ambiente. La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo (ACN) 25 mM y solución amortiguadora de fosfato, ajustado a un pH de 4,0 con ácido acético glacial y en una relación 80:20 v/v, como proporción óptima para la resolución de todos los componentes. La elución isocrática se aplicó a un flujo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 10 min (Giarmoukakis *et al.*, 2013a; Peña *et al.*, 2012; Walsh and El-Shaheny, 2016). El volumen inyectado fue de 20 μL y una longitud de onda de 210 nm para la detección de LN. Cada muestra se analizó por triplicado ($n = 3$).

Se construyeron curvas de calibrado desde diluciones seriadas de LN en un rango de concentración de 0,8 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a partir de dos soluciones madre de LN en etanol absoluto y agua en una concentración de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (0,005% p/v). Cada curva de calibrado se realizó por triplicado.

La eficiencia de encapsulación porcentual (%EE) de LN se calculó según el siguiente protocolo. Por un lado, se determinó la cantidad total de fármaco presente en los cubosomas disolviendo una fracción de CubLnp en etanol absoluto (relación 1:1) para

desintegrar las nanopartículas, y luego, cuantificarlo por HPLC. En segundo lugar, una alícuota de CubLnp se transfirió a tubos de ultracentrifuga y se centrifugó a 20.000 rpm durante 25 min a 5°C. A continuación, se extrajo el sobrenadante y se midió mediante HPLC para la cuantificación de LN libre. Todas las muestras se analizaron por triplicado (n=3). El valor de %EE se obtuvo basándose en la siguiente ecuación (*Ecuación 2.2*):

$$\%EE = [(\text{contenido total} - \text{contenido libre})/\text{contenido total}] \times 100$$

Ec. 2.2

2.4.2.7. Estudios de Estabilidad del Sistema Coloidal

Se llevaron a cabo estudios preliminares de estabilidad coloidal en la formulación CubLnp 0,005%. Esta formulación fue seleccionada para los estudios de estabilidad, ya que se encuentra a la misma concentración de LN que la formulación actualmente comercializada. Las muestras se almacenaron en viales de vidrio color ámbar, bien cerrados y al abrigo de la luz, en una cabina termostatzada con humedad controlada (25°C) durante un período de 30 días.

El contenido del fármaco, pH, tamaño de partícula, IP y PZ de la formulación se controlaron en diferentes períodos de tiempo (0, 15 y 30 días). Cada medición se efectuó por triplicado (n=3). A cada tiempo medido, las soluciones fueron analizadas por HPLC y se compararon con la concentración inicial de LN en la formulación.

2.4.3. Estudios de Liberación *in vitro* de LN

La liberación de LN *in vitro* se determinó utilizando un dispositivo de diálisis Slide-A-Lyzer™ MINI adaptado (ThermoFisher Scientific). Originalmente, el volumen de los tubos con el dispositivo de diálisis Slide-A-Lyzer™ MINI era de 50 mL y esto requería demasiado medio de liberación para que LN esté en contacto con la membrana. Este volumen conduciría a una concentración de LN por debajo del límite de detección. Por lo tanto, se adaptaron los tubos para asignar un volumen de 10 mL, de modo que el medio de liberación permitiera que la concentración de LN estuviera por encima del límite de detección del dispositivo (*figura 2.5*).

Para el ensayo, 2 mL de las formulaciones en estudio se colocaron como medio donador en recipientes de polipropileno desechables con membranas integradas de baja unión para diálisis (MWCO = 3,5 kDa) y se sumergieron en tubos llenos de 10 mL de agua deionizada como medio de liberación a 37°C (medio receptor). A continuación, se colocó el dispositivo de diálisis MINI en un baño de agua a 37°C con agitación suave y constante. A intervalos de tiempo específicos, se tomaron alícuotas de 0,5 mL de los tubos para su posterior análisis de cuantificación. Se repone el mismo volumen de medio de liberación fresco a 37°C.

Este estudio se llevó a cabo en dos etapas; en primer lugar, se evaluaron las formulaciones de LN a la misma concentración, es decir, la formulación comercial

Louten[®] 0,005% (FC Louten[®]), CubLnp 0,005% y la solución acuosa de LN al 0,005% durante 24 h. En segundo lugar, se comparó el comportamiento de liberación de LN desde los sistemas CubLnp a concentraciones de 0,005% y 0,010% en un período de estudio de 72 h.

La liberación acumulada de LN *in vitro* se calculó de acuerdo con los resultados de las mediciones por triplicado. Los ensayos fueron realizados manteniendo las condiciones de sumidero (*sink*, por sus siglas en inglés), asegurando que la concentración final del fármaco en el medio de liberación sea inferior al 10% de la concentración de saturación del mismo, es decir, inferior al 10% de su solubilidad durante todo el período analizado (United States Pharmacopeial Convention, 2007).



Figura 2.5. Adaptación de dispositivos de diálisis para ensayos de liberación *in vitro*.

El análisis cuantitativo de LN se realizó con un espectrómetro de masas Micromass Quattro MicroTM API (Waters, Wythenshawe, Reino Unido) acoplado a un UPLC Acquity (Waters, Milford, MA, EE. UU.). Para las separaciones cromatográficas se utilizó una columna analítica Acquity UPLC BEH C18 de Waters, con un tamaño de partícula de 1,7 μm (2,1 μm x 50 mm de longitud) mantenida a 25°C. La fase móvil consistió en una mezcla de ACN/agua con 0,1% de ácido fórmico. La elución isocrática se aplicó a un flujo de 0,3 mL·min⁻¹ con 10% de agua y 90% de ACN durante 10 min. El volumen de inyección fue de 10 μL y la detección de LN se realizó a una longitud de onda de 210 nm (Giarmoukakis *et al.*, 2013b).

Para la detección por cromatografía líquida-espectrometría de masas (*LC-MS*, por sus siglas en inglés "*Liquid chromatography/mass spectrometric*"), se utilizó un espectrómetro de masas equipado con una fuente de ionización por electropulverización, en modo de ionización positiva. El modo de adquisición fue el seguimiento de reacciones múltiples (*MRM*, por sus siglas en inglés "*Multiple reaction monitoring*"). Las condiciones de la fuente se establecieron de la siguiente manera: voltaje capilar a 3 kV, temperatura mantenida entre 148°C y 150°C y temperatura de desolvatación entre 397°C y 400°C. Se utilizó nitrógeno como gas de cono y

desolvatación, a flujos de 50 l.h⁻¹ y 800 l.h⁻¹, respectivamente. El valor de presión del gas de colisión (argón) se estableció en aproximadamente $2,7 \times 10^{-3}$ mbar. Se utilizó el software MassLynx 4.0 de Waters para el control de equipos y el análisis de datos. El límite de cuantificación (LC) de LN calculado fue de 0,051 µg.mL y el límite de detección (LD) fue de 0,025 µg.mL. Cada muestra se analizó por triplicado (n=3).

Se prepararon y analizaron por LC-MS al menos cinco curvas de calibrado a partir de una solución estándar de LN en agua en una concentración de 50 µg.mL (0,005% p/v). Para ello, se realizaron diluciones seriadas en un rango de concentración de 0,8 a 50 µg.mL, midiendo cada solución 3 veces. El error relativo (%) se calculó en alrededor del 95%. Como se puede ver en la *figura 2.6*, el cromatograma LC-MS de LN no muestra presencia de metabolitos, sólo se observa el pico correspondiente a LN (*Sigma-Aldrich*) en tiempos de retención similares a los encontrados en bibliografía (cerca de 6,205 min) (Giarmoukakis *et al.*, 2013a; Peña *et al.*, 2012; Walsh and El-Shaheny, 2016).

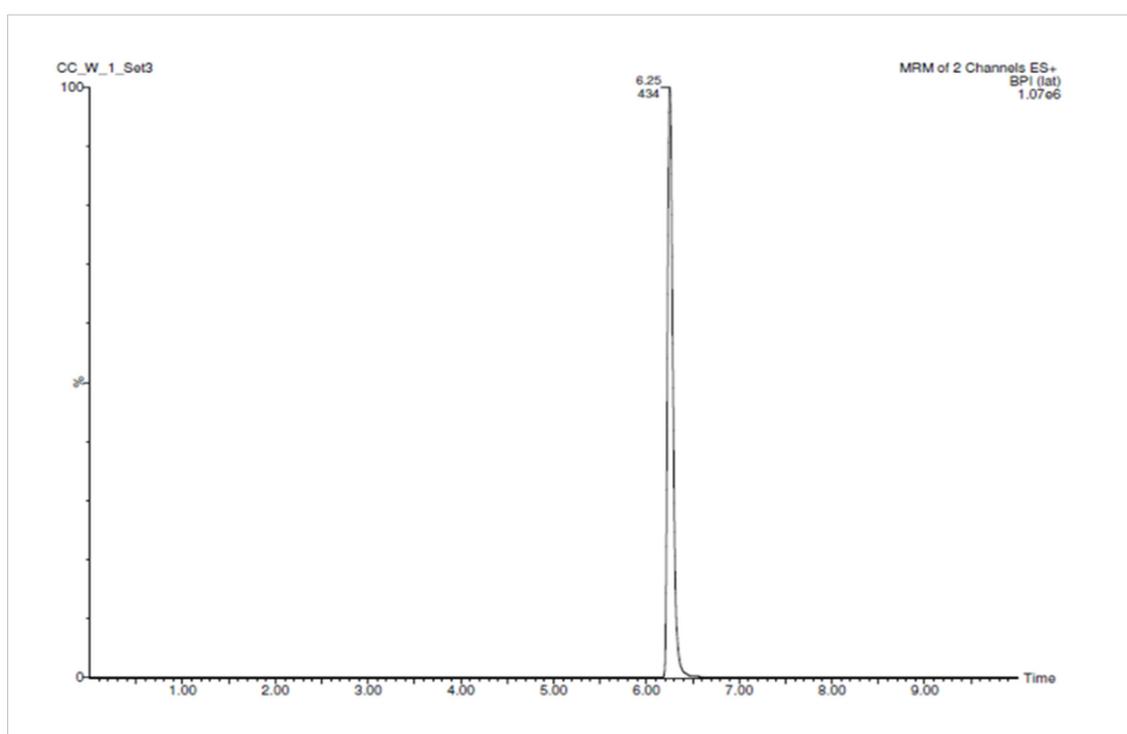


Figura 2.6. Cromatograma LC-MS de LN.

2.4.4. Estudios de Eficacia *in vivo*

2.4.4.1. Aplicación Subconjuntival de CubLnp y Medición de la Presión Intraocular

La evaluación del efecto terapéutico *in vivo*, se llevó a cabo en las formulaciones CubLnp de menor concentración, 0,00125% y 0,00250%, y fueron comparadas con la FC Louten® y los cubosomas blanco sin fármaco (CubB), ambos utilizados como control. Cada ensayo fue realizado en un grupo de cuatro animales, a los cuales se le administraron las formulaciones en estudio en ambos ojos (n=8 ojos). Todas las

formulaciones aplicadas fueron preparadas en condiciones asépticas bajo campana de flujo laminar. Días previos a los tratamientos, se inició la ambientación de los animales mediante manipulación de los mismos en animalario.

Previo a la intervención, los conejos fueron anestesiados de manera local con una gota de clorhidrato de proparacaína al 0,5% Anestalcon® (Alcon laboratorios Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina) en cada ojo a tratar. Las formulaciones a evaluar se administraron en la conjuntiva bulbar superior en un volumen de 50 µL con jeringas de tuberculina de 1 mL acoplada a una aguja 30G. Como profilaxis, se administró una gota de antibiótico tobramicina Fotex® (Laboratorio Elea Phoenix S.A., Buenos Aires, Argentina) en cada ojo tratado, posterior a la aplicación.

Para medir la PIO se utilizó el tonómetro de rebote Icare® TonoVet (Tiolat, Helsinki, Finlandia). Las determinaciones de los valores de PIO se realizaron una vez al día a la misma hora, hasta el restablecimiento a valores normales. El protocolo de administración incluyó un período de lavado de una semana entre tratamientos. Para cada ojo, el valor de presión basal (PIO 100%) se estableció como la lectura de PIO media tomada en conejos sin tratamiento en las mismas condiciones ambientales y al mismo tiempo, durante 7 días (para respetar el ciclo circadiano del animal). Este valor obtenido se comparó con los valores promedio de PIO tomados en las mismas condiciones en conejos post-tratamiento durante el período de evaluación. En conejos adultos el valor medio de PIO es de 14 mmHg.

En cada tratamiento, se determinó el porcentaje de descenso máximo de PIO, establecido directamente de la curva, y la PIO mínima que correspondió al mínimo valor de presión obtenido de todas las mediciones. El área bajo la curva (AUC) fue calculado según la regla del trapecioide (Gibaldi, M. y Perrier, 1982), desde el día de inicio de tratamiento hasta el último día de medición. Todos los valores medios obtenidos fueron comparados estadísticamente mediante el análisis de la varianza y, se consideraron significativas cuando el valor p fue menor a 0,05.

2.4.4.2. Evaluación de Irritación Ocular

Para conocer la irritación ocular generada por la administración subconjuntival de los diferentes tratamientos, se realizó una evaluación clínica utilizando una versión modificada de la prueba de Draize (J. H. Draize *et al.*, 1944; Morsi *et al.*, 2014; Tartara *et al.*, 2018). El estudio se realizó diariamente, antes y después de cada aplicación hasta la completa desaparición de los signos, en grupos de cuatro animales por tratamiento (n=8 ojos).

La valoración clínica fue efectuada en párpados, conjuntiva, córnea e iris mediante observaciones externas por un médico oftalmólogo con iluminación adecuada, y se proporcionó información adicional mediante un examen biométrico con lámpara de hendidura HIS-5000 (Huvitz Imaging System, República de Corea). Para cada

observación, se instiló una gota de fluoresceína sódica 0,25% (Laboratorios Poen S.A.C.I.F.I., Buenos Aires, Argentina) en ambos ojos, para revelar con luz azul la posible lesión corneal. La prueba de irritación se realizó proporcionando puntajes de 0 (ausencia) a 30 (más alto) en escala de evaluación clínica para cada área ocular valorada, como se detalla en la *tabla 2.2*. El porcentaje de irritación se calculó sumando las puntuaciones totales de la evaluación clínica a cada tiempo de observación y se determinó la gravedad de la lesión (*tabla 2.3*).

Tabla 2.2. Evaluación clínica de irritación ocular

Prueba de irritación ocular*	
Clasificación por área ocular	Ojo
Lesión ocular	Puntaje
Párpados	
Edema - Dermatitis	5
Hemorragia	10
Córnea	
Córnea transparente	0
Úlcera corneal limpia - Queratitis difusa con fluoresceína	2
Úlcera no limpia - Opacidad difusa con fluoresceína	4
Área opalescente o edema corneal - Sin detalles del iris - Inyección periquerática	6
Córnea opaca, iris no visible - Neovascularización	10
Área corneal involucrada	
Un cuarto (o menos) pero no cero	1
Mayor a un cuarto y menos que un medio	2
Mayor que un medio y menos que tres cuartos	3
Mayor que tres cuartos hasta toda el área	4
Iris	
Normal (cámara limpia)	0
Turbidez del humor acuoso	12
Congestión de los vasos del iris - Edema	18
Hemorragia - Neovascularización - Pupila anormal, no reactiva a la luz	24
Hipopión séptico o sin sepsis	30
Conjuntiva	
Normal	0
Congestión 1 - 2 +	2
Congestión 3 - 4 +	5
Quemosis (1 - 5 +) x2	10
Puntaje Total	64 puntos (100%)

*Examen clínico biométrico con lámpara de hendidura realizado mediante la prueba de Draize modificada. Se muestran las áreas y características oculares evaluadas con las puntuaciones correspondientes realizadas en ambos ojos.

Las evaluaciones clínicas fueron contrastadas mediante un análisis de imágenes oculares, tomadas en cada valoración diaria. Las fotografías se obtuvieron usando un adaptador de imágenes oculares para teléfonos inteligentes QuikVue® VPA-100 (Shanghai VisuScience Meditech Co., Ltd. Shanghai, China) con un aumento de 10X y luz blanca adicional. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Image J® (National Institutes of Health, Estados Unidos), que permite obtener los valores de densidad óptica (DO) de la superficie ocular analizada a partir de imágenes en escala de grises. En este caso, se cuantificó la intensidad del enrojecimiento de la conjuntiva bulbar para establecer la diferencia de irritación ocular en cada tratamiento propuesto. En la escala de grises, los valores de DO oscilan entre cero (color blanco) y dos puntos (color negro). Considerando el valor de DO de conejos normales sin tratamiento como 100% (respuesta basal), el porcentaje de irritación (%IR) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (*Ecuación 2.3*):

$$\%IR = \left(\frac{T}{B}\right) \times 100$$

Ec. 2.3

Donde *B* es el valor de DO del área ocular evaluada en conejos normales sin tratamiento, y *T* es el valor de DO del área ocular evaluada después de administrado el tratamiento.

La *Tabla 2.3* detalla la gravedad de la lesión observada según el porcentaje de irritación obtenido de la *tabla 2.2*. La puntuación se estableció en función de los posibles efectos secundarios derivados de la aplicación subconjuntival, por ser una vía de administración más invasiva. De esta manera, se toma en consideración tanto, los efectos adversos que pueden estar asociados al fármaco, y aquellos provocados por la aplicación de la inyección subconjuntival (Aiello *et al.*, 2004; Bourges *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2018). Puntuaciones de irritación admisibles inferiores al 20%, se consideran formulaciones farmacéuticamente aceptables para la administración ocular.

Tabla 2.3. Gravedad de la lesión según el puntaje obtenido de la *tabla 2.2*.

Valor puntaje	Efectos de la Formulación
0% – 8%	No irritación
9% – 20%	Irritación media
21% – 40%	Irritación media a moderada
41% – 60%	Irritación moderada
61% – 80%	Lesión severa
81% – 100%	Lesión muy severa

2.4.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm DE, considerando al menos tres valores de cada medida. El análisis estadístico entre los valores medios se calculó mediante el análisis de la varianza unidireccional (ANOVA del inglés "*Analysis of variance*") utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.II (Statgraphics.Net, Madrid, España). Los valores de probabilidad con un valor de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Estudios de caracterización fisicoquímica de CubLnps

Los CubLnp se obtuvieron a partir del método *top-down* mediante el uso de ultrasonido. La concentración de LN en las formulaciones osciló entre 0,00125% y 0,02000% p/v, siendo de interés la concentración de eficacia clínica 0,00500% p/v, actualmente comercializada para el tratamiento del glaucoma.

Los estudios de DLS y PZ se utilizaron para evaluar la distribución de tamaño y la carga superficial de los cubosomas blanco (CubB) y cargados con LN (CubLnp), factores muy importantes que condicionan la efectividad terapéutica de las formulaciones oftálmicas (Liu *et al.*, 2012). Como se muestra en la *Tabla 2.4*, la incorporación de concentración creciente de LN en los cubosomas no mostró cambios significativos en los valores de tamaño, IP y PZ. Los sistemas obtenidos mostraron un TMP promedio de 210 nm, valores de IP cercanos a 0,1 y un PZ negativo de aprox. -25 mV. Estos resultados muestran una buena uniformidad y estabilidad del sistema con gran potencial de transporte a través de la córnea.

La determinación del pH es un aspecto importante para lograr formulaciones oftálmicas efectivas, estables y no irritantes. Como se detalla en la *tabla 2.4*, el intervalo de pH de las dispersiones se encontró entre 5,8-6,4. A pesar de que los valores de pH son ligeramente más ácidos que lo óptimo (pH 6,6 a 7,8), se espera que la aplicación *per sé* de las formulaciones no cause efectos irritantes. Los resultados de EE% mostraron rendimientos altos, con valores en un rango de 87% a 94%, indicando que la mayor parte del fármaco se encuentra encapsulado dentro de las nanopartículas cúbicas.

Tabla 2.4. Propiedades fisicoquímicas de cubosomas blanco (CubB) y cargados con LN (CubLnp). Resumen de valores de pH, TMP, IP, PZ y %EE de las formulaciones obtenidas, representados como la media \pm DE (n=3).

Formulación	pH \pm DE	TMP \pm DE (nm)	IP \pm DE	PZ \pm DE (mV)	EE \pm DE (%)
CubB	6,47 \pm 0,13	215,3 \pm 6,6	0,12 \pm 0,02	-24,7 \pm 2,4	-
CubLnp 0,00125%	6,17 \pm 0,10	207,9 \pm 6,3	0,10 \pm 0,04	-24,5 \pm 0,3	87,5 \pm 2,9
CubLnp 0,00250%	5,89 \pm 0,04	217,8 \pm 19,6	0,13 \pm 0,08	-24,7 \pm 0,1	89,0 \pm 1,6
CubLnp 0,00500%	5,85 \pm 0,04	207,2 \pm 5,1	0,09 \pm 0,02	-23,3 \pm 1,6	90,9 \pm 0,8
CubLnp 0,01000%	6,09 \pm 0,16	204,6 \pm 1,6	0,10 \pm 0,01	-24,1 \pm 0,9	92,2 \pm 2,7
CubLnp 0,02000%	6,40 \pm 0,24	209,3 \pm 5,1	0,11 \pm 0,01	-24,5 \pm 0,6	94,0 \pm 3,2

Con el objetivo de determinar si las propiedades fisicoquímicas de la formulación CubLnp se veían modificadas en las condiciones de almacenamiento establecidas (25°C, humedad controlada y protegidas de la luz), se realizó un estudio de estabilidad durante un período de 30 días. Para ensayo se seleccionó la formulación de CubLnp 0,005% de concentración similar a la solución comercial de LN (Louten® 0,005%) para poder comparar su estabilidad en el tiempo. Como se puede observar en la *figura 2.7*, los resultados no muestran variaciones significativas en los valores de TMP, IP, contenido de fármaco, PZ y pH, durante el período de tiempo evaluado almacenadas a 25°C y protegidas de la luz. Estos estudios preliminares refieren una buena estabilidad coloidal del sistema durante un período de 30 días y una ventaja frente al producto comercial, ya que no requiere de almacenamiento refrigerado para mantener la concentración del fármaco y con ello, la estabilidad de la formulación (Pfizer Health, 2020).

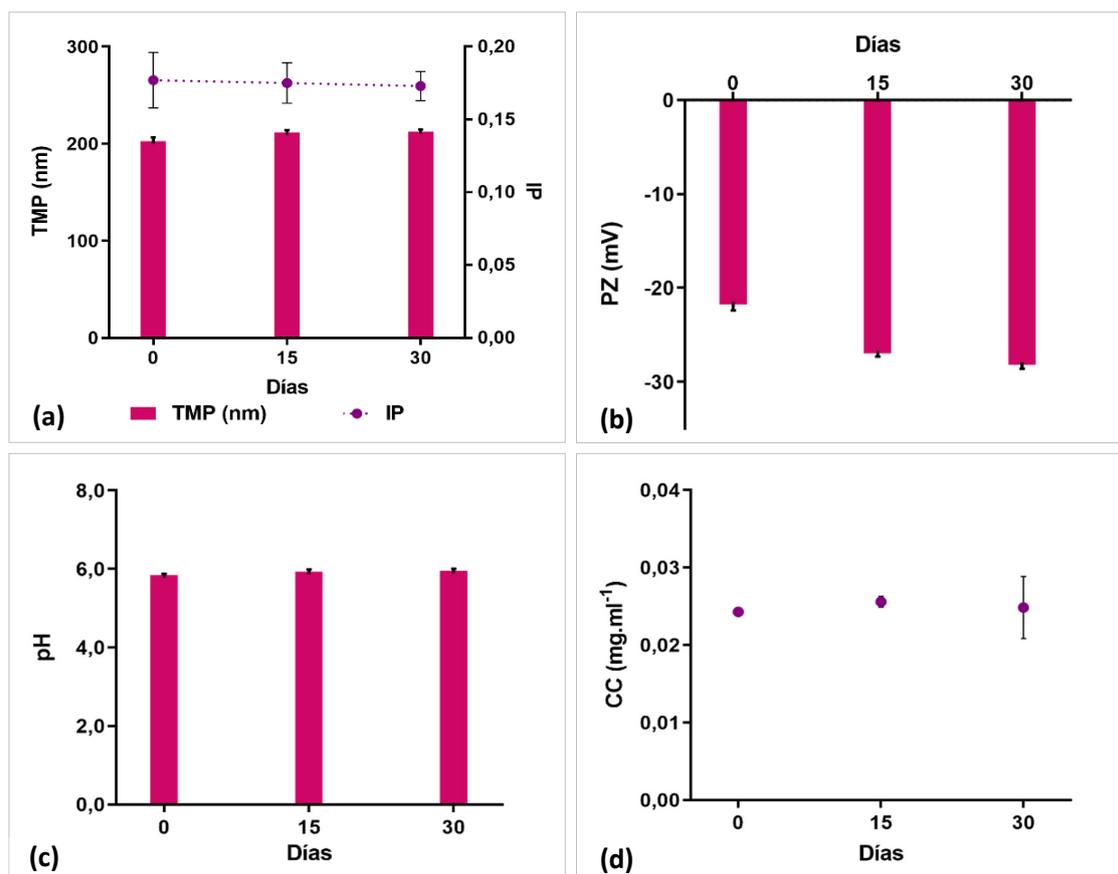


Figura 2.7. Estudios preliminares de estabilidad coloidal de CubLnp al 0,005%.

Los gráficos representan los valores para CubLnp 0,005% correspondientes al (a) tamaño de partícula (TMP) en nanómetros (nm), junto a un gráfico de líneas correspondiente al parámetro IP, (b) medidas de PZ y (c) valores de pH, evaluados en un período de 30 días. El gráfico de líneas (d) representa los valores de capacidad de carga (CC) de LN en mg.ml⁻¹ a cada tiempo evaluado. Todas las mediciones fueron tomadas a temperatura ambiente. Los valores son expresados como (Media \pm DE, $n = 3$) para cada ensayo.

2.5.2. Difracción de Rayos X a bajos ángulos (SAXS)

Para identificar las estructuras cristalinas internas y las correspondientes fases acuosas de las dispersiones, se realizaron mediciones con la técnica SAXS. La *figura 2.6.a* muestra el gráfico con los perfiles de SAXS para los CubB y los cargados con diferentes concentraciones de LN. A partir del análisis de los patrones de dispersión, se obtuvo el gráfico de intensidad en relación de q correspondientes a todas las formulaciones CubLnp (*figura 2.8*), permitiendo identificar las reflexiones de los picos de Bragg (Yang *et al.*, 2012). Se puede observar que todos los sistemas CubLnp mostraron múltiples reflexiones con posiciones relativas en las proporciones de $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$ y $\sqrt{9}$, indicativos de una estructura cristalina líquida de fase cúbica, con superficie de doble diamante (superficie D) y grupo espacial $Pn3m$ (V_2 , Q^{224}) (Liu *et al.*, 2013). Como se muestra en la *Figura 2.8.a*, las curvas para todos los cubosomas contienen un pico adicional asociado a la presencia de una mínima proporción de nanosistemas de fase hexagonal (H_2), indicada con el símbolo *.

Asimismo, se obtuvieron los valores del parámetro de red para todos los sistemas CubLnp representado en la *figura 2.8.b*. Como puede verse, todos los cubosomas poseen un parámetro de red de alrededor de 6,8 nm, valor que no presenta modificaciones con el aumento de las concentraciones de LN.

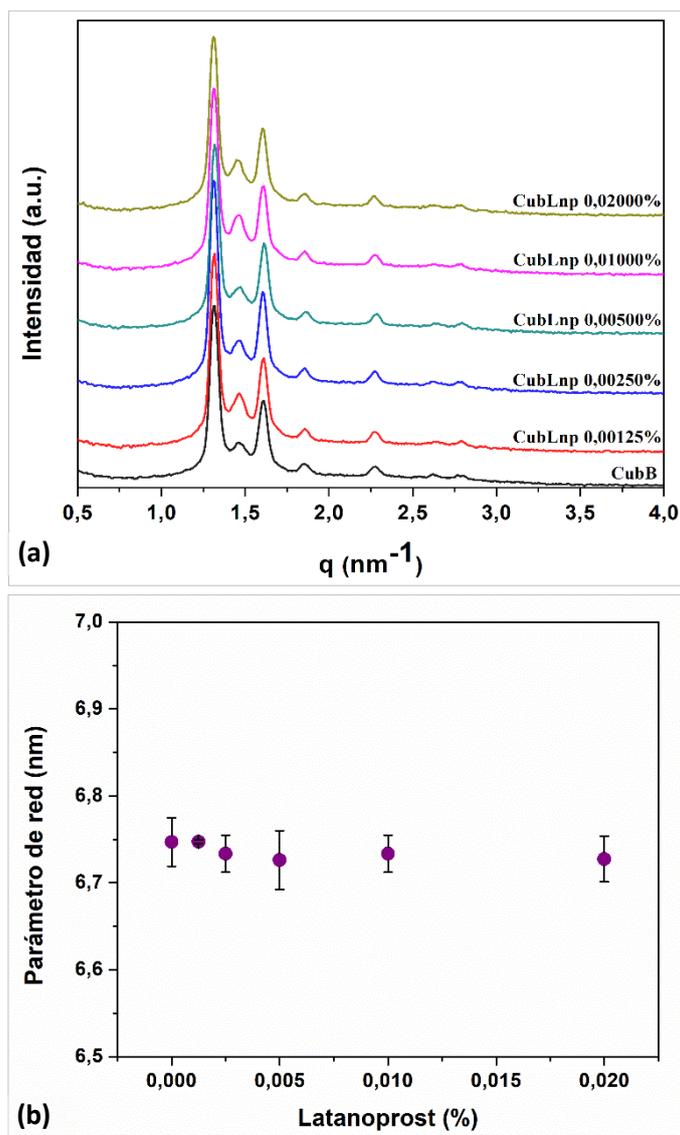


Figura 2.8. Perfiles de difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS) de CubLnps. **(a)** Representación gráfica de patrones SAXS para cubosomas blanco (CubB) y cargados con LN a diferentes concentraciones (CubLnp). **(b)** Gráfico de líneas que representa los valores correspondientes a los parámetros de red de CubLnp para cada concentración de LN. Los valores son expresados como (Media \pm DE, $n = 3$).

2.5.3. Microscopía Electrónica de Transmisión Criogénica

Además de SAXS, la microscopía electrónica de transmisión criogénica (Cryo-TEM) se utiliza para verificar las características morfológicas de las diferentes nanoestructuras líquidas (Azmi *et al.*, 2015). En las *figuras 2.9 (a-d)*, se pueden observar las imágenes de Cryo-TEM obtenidas para las formulaciones CubLnp. Las mismas muestran nanopartículas de estructura cúbica con una arquitectura homogénea y

ordenada, cuyo tamaño varía de 100 a 200 nm. Estos valores de TMP son consistentes con los obtenidos en las mediciones de DLS. Adicionalmente, pueden observarse la presencia de nanoestructuras hexagonales aisladas (*Figura 2.9.a*), esto confirmaría la existencia de una mínima proporción de hexosomas (H_2) observado en los estudios estructurales de SAXS.

Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante el tratamiento digital de señales (transformada de Fourier), y se determinó que la proyección en dos dimensiones de la red tridimensional se alineó con la dirección de visualización, verificando la estructura interna cúbica ($Pn3m$) de las nanopartículas (*Figura 2.9.c*) (Akhlaghi *et al.*, 2016). Cabe aclarar, que la estructura cúbica $Pn3m$ es una estructura de doble diamante conformada por agregados micelares lineales, conectados cuatro por cuatro, en forma tetraédrica (Liu *et al.*, 2015).

No obstante, según lo observado en *Figura 2.9.d*, las estructuras hexagonales invertidas (H_2 hexosomas) coexisten dinámicamente con los cubosomas. La formación de ambas estructuras cristalinas podría ser consecuencia del aumento de temperatura (por encima de 40°C) durante el proceso de sonicación, donde de acuerdo con el diagrama de fases (temperatura-composición de lípido-contenido de agua), dicho incremento puede inducir la transición de fase cúbica- $Pn3m$ a fase hexagonal- H_2 (De Campo *et al.*, 2004).

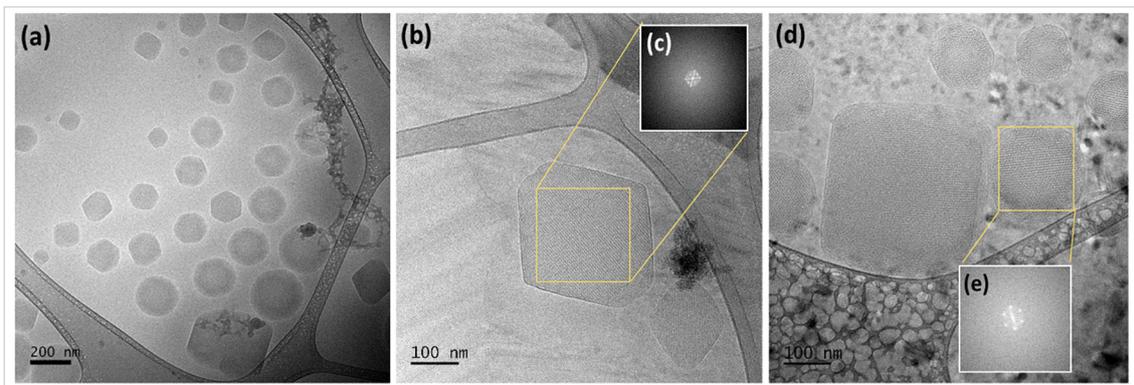


Figura 2.9. Microfotografías de CubLnp obtenidas por técnica Cryo-TEM.

Las imágenes muestran (a) cubosomas coexistiendo estructuralmente con nanoestructuras hexagonales, (b) nanopartículas ordenadas con estructura interna de fase cúbica bicontinua invertida, (d) mismas nanoestructuras de (b) coexistiendo con nanopartículas que envuelven una fase H_2 interna (tomadas en diferente ángulo). (c), (e) Patrones de Transformada Rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés) de cada nanoestructura. En cada imagen se detalla la escala de medición.

2.5.4. Calorimetría de Titulación Isotérmica

Para estudiar y conocer las interacciones energéticas entre LN y los cubosomas, se llevó a cabo una calorimetría de titulación isotérmica mediante la medición de intercambio de calor entre ambos componentes.

La *figura 2.10.a* muestra los datos brutos de la titulación de LN al 0,005% en cubosomas. Después de cada inyección, la señal tardó aproximadamente 6 minutos en volver a la línea de base. Para esta medición, se asumió que la mezcla de ambos componentes ocurría en unos pocos minutos y la incorporación de LN en los cubosomas se consideró rápida y completa, dentro del intervalo de tiempo medido. Por otro lado, la *figura 2.10.b* muestra los calores de reacción integrados de la titulación de LN al 0,005% en agua y los CubB. Los resultados muestran que la titulación de LN en los cubosomas descargados conduce a un proceso exotérmico.

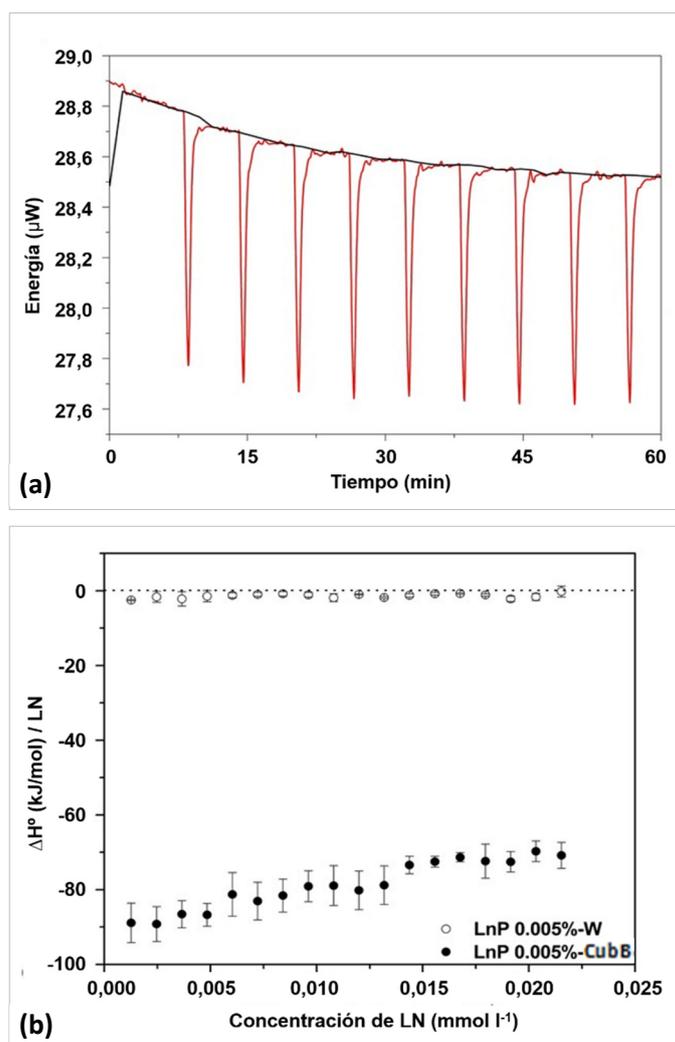


Figura 2.10. Estudio de calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

En la figura se representan (a) los patrones calorimétricos correspondientes a los datos brutos obtenidos en el estudio ITC y (b) gráfico de puntos que exhibe los valores de calor integrados (ΔH°) de las interacciones observadas al valorar LN al 0,005% en agua (W) y cubosomas blanco (CubB).

2.5.5. Estudios de liberación *in vitro* de LN

Como portadores de fármacos, los cristales líquidos en fase cúbica tienen la capacidad de proporcionar patrones de liberación prolongada de fármacos. Estudios

previos han reportado comportamientos de liberación sostenida, en nanoestructuras de fase cúbica, para una amplia variedad de fármacos de diferentes pesos moleculares y solubilidades en agua (Cheng *et al.*, 2014; Rajabalaya *et al.*, 2017; Wan *et al.*, 2018).

Como se describió anteriormente, este estudio se desarrolló en dos etapas. Por un lado, se evaluaron los perfiles de liberación *in vitro* de las formulaciones que contienen una concentración de 0,005% de LN, tales como la formulación comercial Louten® (FC Louten®), CubLnp 0,005% y la solución acuosa de LN (LN 0,005%). Este paso nos permite comparar el comportamiento de liberación de LN desde el sistema nanométrico desarrollado con la solución actualmente comercializada y una solución control del fármaco en solución. Como se observa en la *Figura 2.11.a.*, a 24 horas de estudio, CubLnp 0.005% había liberado menos del 1% de LN al medio, mientras que este valor era mucho mayor para FC Louten® y la solución acuosa de LN al 0.005%, siendo de aproximadamente 37% y 45%, respectivamente.

En segundo lugar, se estudió el comportamiento de liberación *in vitro* de LN desde los sistemas CubLnp a diferentes concentraciones por un mayor período de tiempo. Para este estudio, se seleccionaron las formulaciones de CubLnp a 0,005% y 0,010%, cuyas concentraciones permitieron mantener las condiciones de sumidero o de gradiente máximo que evita la saturación del medio de disolución (Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, 2003; United States Pharmacopeial Convention, 2008). En el caso de formulaciones de CubLnp de mayor concentración, se debía aumentar el volumen del medio de liberación para evitar la saturación del sistema y esto ocasionaría una mayor dilución del fármaco a concentraciones no detectables por los equipos de cuantificación.

Como se observa en la *Figura 2.11.b.*, los perfiles de liberación muestran que después de 72 horas, CubLnp 0,005% había liberado cerca del 41% de fármaco, mientras que este valor era de aproximadamente del 35% para CubLnp 0,010%. Dichos comportamientos refieren que el sistema posee la capacidad de regular de manera sostenida y prolongada la liberación del fármaco en el tiempo. Cabe destacar que el estudio de liberación no pudo extenderse por un período mayor de tiempo, debido a problemas de estabilidad de la formulación en el medio de disolución.

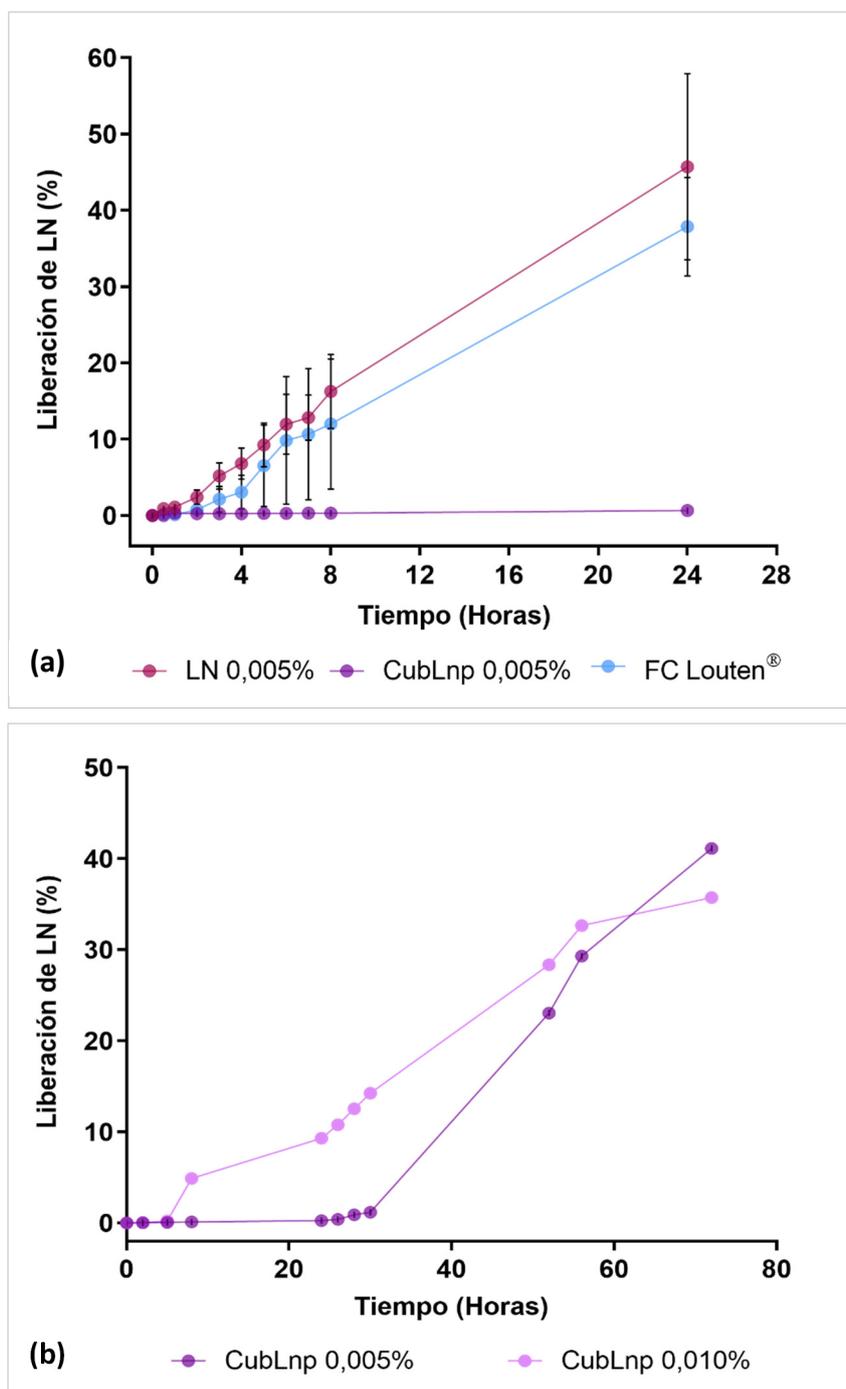


Figura 2.11. Liberación in vitro de LN.

Los gráficos de líneas representan los perfiles de liberación para **(a)** las formulaciones que contienen una concentración de LN al 0,005% (solución en agua, CubLnp y FC Louten®, $n = 3$) evaluados durante 24 h, y **(b)** CubLnp al 0,005% y 0,010% ($n = 3$) en un período de 72 h. Todas las mediciones fueron tomadas a temperatura ambiente. Los valores son expresados como $(Media \pm DE, n = 3)$.

2.5.6. Estudios de eficacia *in vivo*

2.5.6.1. Evaluación de irritación ocular

La evaluación de la biocompatibilidad e inocuidad de los sistemas obtenidos es muy importante para asegurar su administración en los tejidos oculares. La prueba de *Draize* es un estudio *in vivo* aprobado y utilizado para determinar el potencial de irritación de productos cosméticos y farmacéuticos (Morsi *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2020). En este estudio se evaluaron las formulaciones de CubLnp 0,00125% y 0,00250% en comparación con la FC Louten® como control. Las concentraciones seleccionadas son semejantes a las utilizadas en el estudio de eficacia clínica, ambos ensayos llevados a cabo en simultáneo.

Previo a la evaluación clínica, todos los animales mostraron una superficie ocular normal con córneas transparentes. Después de la administración subconjuntival de las formulaciones CubLnp a evaluar, se observó una irritación ocular leve (menor al 15%) durante los primeros días post-tratamiento, mostrando una disminución de la intensidad con el tiempo hasta una recuperación tisular casi completa al cuarto día de tratamiento (*Figura 2.12.b*). Este efecto fue menor para la FC Louten®, la cual presentó una irritación leve menor al 5%, recuperándose completamente 48 h posteriores al tratamiento.

Las lesiones observadas fueron de leves a moderadas, tales como congestión conjuntival o edema palpebral asociado al área conjuntival de la inyección. Las fotografías de la *Figura 2.12.a*, muestran las áreas oculares evaluadas del segmento anterior en el examen clínico, a los días 1 y 4 posterior al tratamiento. Al día 1, se evidenció un “reservorio” de formulación en el espacio de inyección subconjuntival (*ver Figuras 2.12.a1, 2.13.a3, 2.13.a5*), siendo más evidente para las formulaciones de cubosomas, los cuales se observaron disminuidos de tamaño con el tiempo hasta desaparecer por completo al día 4 de tratamiento (*ver Figuras 2.12.a2, 2.12.a4, 2.12.a6*). Este efecto puede estar relacionado con la lenta y sostenida liberación del fármaco desde el sistema, asociado al prolongado efecto hipotensor observado.

Estos resultados se correlacionan con los valores obtenidos en el análisis de fotografías oculares. En este caso, los porcentajes de irritación oscilaron entre el 15% y el 25% al día 1 para todas las formulaciones evaluadas. Este efecto disminuye progresivamente los días posteriores al tratamiento (*Figura 2.12.c*). Cabe destacar que el porcentaje de irritación (%IR) obtenido por el análisis de fotografías oculares, cuantifica únicamente el enrojecimiento de la zona subconjuntival, mientras que el examen clínico es más extenso y valora toda la superficie ocular.

En base a lo expuesto, las formulaciones CubLnp pueden considerarse farmacéuticamente aceptables para la administración ocular, ya que presentaron puntuaciones de irritación inferiores al 20% con evidencias clínicas de buena biocompatibilidad y tolerancia en los tejidos oculares (*ver Tabla 2.3*).

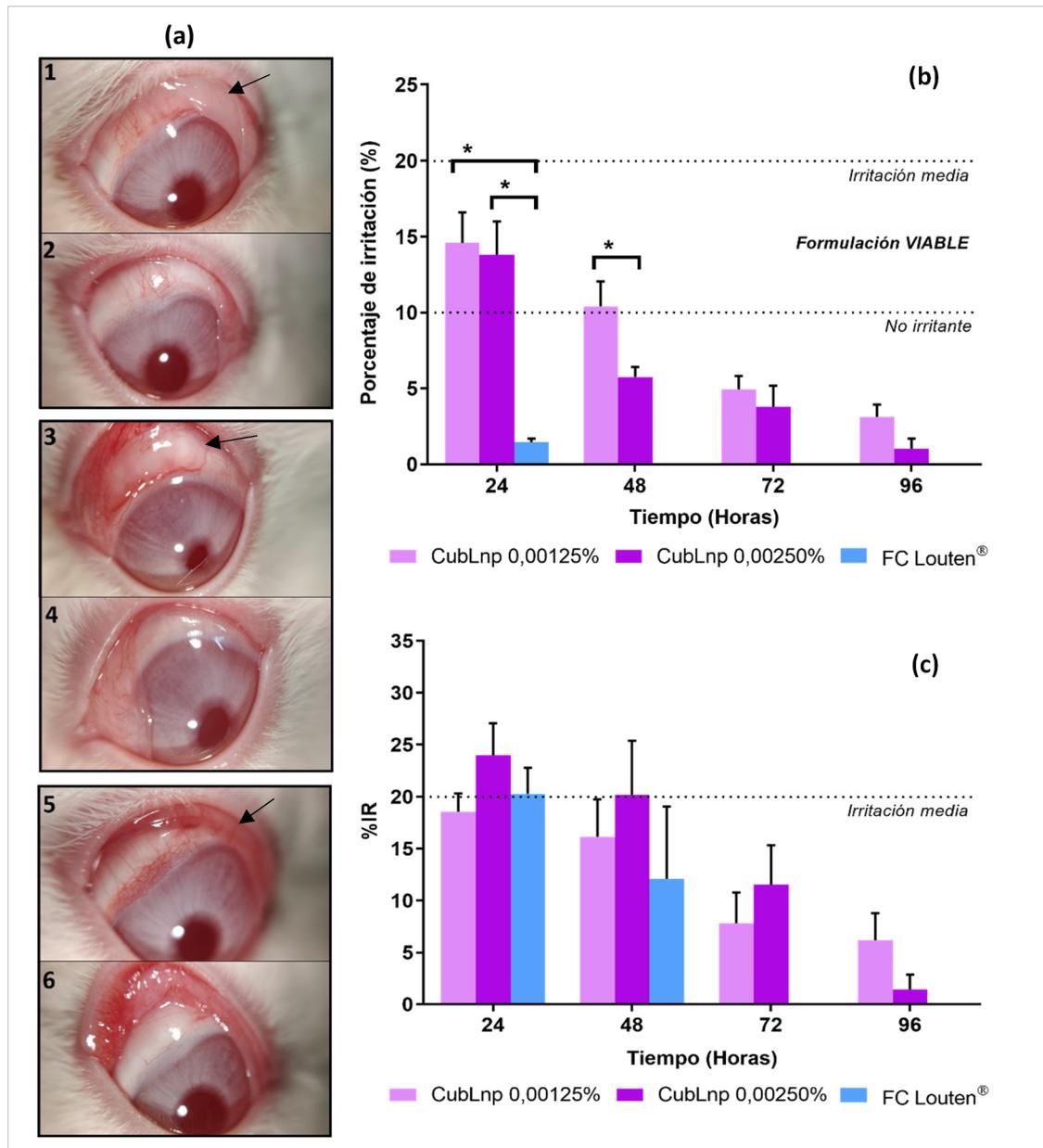


Figura 2.12. Evaluación clínica de irritación ocular.

Las fotografías (a) muestran el área ocular evaluada, tomadas al día 1 (imágenes superiores) y día 4 (imágenes inferiores) posteriores a la administración subconjuntival de los siguientes tratamientos: CubLnp (1,2) al 0,00125%; (3,4) al 0,00250%; y (5,6) FC Louten® al 0,00500%. Los gráficos de barras representan (b) el puntaje de irritación en porcentaje (%) observado durante la valoración clínica ocular, y (c) muestra el porcentaje de irritación (% IR) obtenido del análisis de DO de las fotografías oculares. Ambos estudios se llevaron a cabo a las 24, 48, 72 y 96 horas post-tratamiento con las formulaciones CubLnp 0,00125% y 0,00250%, y la FC Louten® al 0,00500%. Los resultados se presentan como (Media \pm SEM) para todos los grupos ($n = 3$). Se utilizó una prueba de ANOVA para el análisis de los resultados y se consideró diferencia significativa con valores de $*p < 0,05$.

2.5.6.2. Eficacia hipotensora: determinaciones de PIO

El objetivo de la farmacoterapia es proporcionar una terapia farmacológica óptima en el tratamiento o la prevención de enfermedades. La evaluación de la eficacia terapéutica es una de las características más importantes en el desarrollo y obtención de nuevos sistemas portadores de fármacos (Linda A. Felton, 2013). En función de lo expuesto, para evaluar el efecto hipotensor de CubLnp se realizaron estudios *in vivo* mediante la determinación de la PIO post-tratamiento en conejos normotensos.

En este estudio, se evaluó el efecto hipotensor de LN vehiculizado en los cubosomas administrados por vía subconjuntival en una única dosis. Para ello, se seleccionaron las formulaciones de CubLnp 0,00125% y 0,00250%, para evaluar la eficacia de los sistemas a menor concentración de LN que la formulación comercial y, de esta manera, reducir al mínimo los posibles efectos adversos. La solución FC Louten® (0,00500%) se utilizó como control. Todas las formulaciones se administraron de forma subconjuntival.

Previo a comenzar el estudio, se determinaron los valores de osmolaridad de las formulaciones a evaluar, ya que para ser administradas por vía ocular deben cumplir con los requisitos de isotonicidad compatibles con el fluido lagrimal. Una solución oftálmica se considera isotónica cuando su tonicidad es igual a la de una solución de cloruro de sodio al 0,9% p/v (290 mOsm). Sin embargo, autores han determinado la osmolaridad de la película lagrimal en ojos normales en un valor medio de 302 mOsm.kg⁻¹, y las formulaciones con valores de osmolaridad inferior a 100 mOsm.kg⁻¹ o superior a 640 mOsm.kg⁻¹ se informaron como irritantes y no compatibles para su aplicación ocular (Linda A. Felton, 2013; Liu *et al.*, 2012; Saettone, M.F., Bucci, M., Speiser, 1987; Singh *et al.*, 2020). Los valores de osmolaridad correspondientes a las formulaciones CubLnp 0,00125% y 0,00250%, fueron de (281,3 ± 2,5) mOsm.kg⁻¹ y (291,7 ± 3,5) mOsm.kg⁻¹, respectivamente. Ambos sistemas presentan valores de osmolaridad cercanos al fluido lagrimal, por lo tanto, se espera que sean compatibles y bien tolerados por los tejidos oculares.

Los resultados obtenidos de las determinaciones de PIO, se muestran en la *figura 2.13*, donde se exhiben los perfiles de PIO para cada sistema portador evaluado comparado con la FC Louten® y CubB. Los valores se expresan como la media del porcentaje de PIO, siendo el 100% el valor de PIO media tomada en conejos sin tratamiento en las mismas condiciones ambientales y al mismo tiempo, durante 7 días (para respetar el ciclo circadiano del animal).

El análisis de los datos arrojó que ambas formulaciones de CubLnp mostraron una disminución de la PIO estadísticamente diferente a la FC Louten® y CubB (particularmente para CubLnp 0,00125%), demostrando que los sistemas nanométricos desempeñaron un efecto terapéutico superior en el período evaluado. En la *Figura 2.3*, se representa con un asterisco los puntos en los cuales el valor de PIO fue estadísticamente diferente ($*p < 0,05$) entre la FC y los sistemas nanométricos. Dichos resultados muestran que ambas concentraciones de al día 1. El efecto farmacológico observado para los cubosomas con LN fue superior a la FC Louten®, la cual presenta una concentración mayor (0,00500%) y mostró un descenso máximo de PIO alrededor del 18% con rápido restablecimiento a valores normales en los días posteriores. Cabe destacar que estos resultados fueron obtenidos utilizando una concentración de LN administrada 4 (0,00125%) y 2 (0,00250%) veces menor en los cubosomas respecto a la FC.

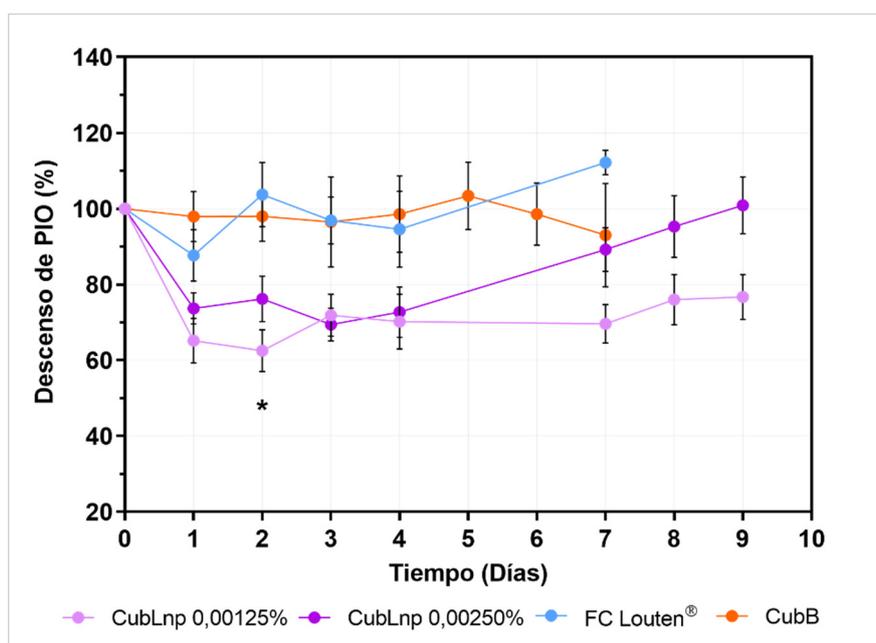


Figura 2.13. Perfiles de descenso PIO (%) vs tiempo.

El gráfico de líneas representa el porcentaje de descenso de PIO en conejos normotensos tratados con las formulaciones CubLnp al 0,00125% y 0,00250%, comparadas con la FC Louten® al 0,00500% y los cubosomas blanco (CubB). Los valores se expresan como (Media \pm SEM, $n = 8$). Los resultados fueron analizados por una prueba de ANOVA y las diferencias significativas ($*p < 0,05$) se representan respecto al control (FC Louten®).

En la *tabla 2.5*, se resumen los valores de los parámetros farmacodinámicos obtenidos a partir de las determinaciones de PIO. Los resultados muestran que ambas formulaciones de CubLnp evaluadas (0,00125% y 0,00250%) lograron un descenso máximo de PIO de 38,5% y 32,9%, respectivamente, mientras que para la FC Louten® fue sólo del 18,2%. A su vez, los valores del área bajo la curva (AUC) fueron mayores para ambas formulaciones de CubLnp (247,4 %·h para 0,00125% y 169,4 %·h para 0,00250%) en comparación a la FC Louten® (51,9 %·h).

Tabla 1.5. Resumen de los parámetros farmacodinámicos obtenidos.
Descenso máximo de PIO (% ± SEM) y AUC (%.h ± DE) alcanzados por cada formulación evaluada de CubLnp al 0,00250% y 0,00125% y FC Louten® al 0,00500%.

Formulación	Descenso Máx. de PIO ± DE (%)	AUC ± DE (%.h)
<i>CubLnp 0,00125%</i>	38,5 ± 5,4	247,4 ± 50,4
<i>CubLnp 0,00250%</i>	32,9 ± 4,3	169,4 ± 43,4
<i>FC Louten® 0,00500%</i>	18,2 ± 5,6	51,9 ± 19,1

2.6. DISCUSIÓN

El glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible pero prevenible en todo el mundo. El aumento de la PIO es el principal factor de riesgo modificable y que puede ser tratado para evitar la progresión de la enfermedad (Friedman, 2007; Jiang *et al.*, 2012; Varma *et al.*, 2017). La instilación tópica de colirios es la forma más habitual de administración de agentes hipotensores para el tratamiento de esta patología. Si bien la dosificación ocular tópica (gotas oftálmicas) ofrece numerosas ventajas por ser una vía de administración no invasiva, de fácil aplicación y de baja exposición sistémica, también presenta una mala adherencia por parte del paciente. Este factor es un desafío para los pacientes con glaucoma, debido a que es una enfermedad que progresa lentamente sin síntomas físicos notorios, y la incapacidad de percibir un efecto inmediato al tratamiento, obstaculiza el cumplimiento de la farmacoterapia (Tapply and Broadway, 2021). Esta situación tiende agravarse en terapias crónicas, principalmente con prostaglandinas, asociadas a efectos adversos como hiperemia conjuntival, irritación y ardor en la superficie ocular (Beck *et al.*, 2017; Januleviciene *et al.*, 2012; Khattab *et al.*, 2019). Dadas las dificultades de adherencia y administración del paciente en las terapias tópicas antiglaucoma, el desarrollo de sistemas de administración innovadores que proporcionen una exposición prolongada del fármaco en la superficie ocular, tendientes a reducir la frecuencia de dosificación y, con ello, mejorar la efectividad del tratamiento, continúan siendo un desafío para la comunidad científica (Adams and Papillon, 2020).

En este proyecto de tesis, se propone desarrollar una plataforma innovadora de liberación sostenida de LN, como estrategia tecnológica que permita la entrega continua de fármaco al sitio objetivo manteniendo un efecto farmacológico prolongado, con el propósito de optimizar la farmacoterapia del glaucoma y disminuir los problemas de adherencia y administración frecuente. Los cubosomas son sistemas nanométricos con una estructura interna única, capaz de encapsular gran variedad de fármacos y presentan perfiles de liberación sostenida, asegurando un efecto terapéutico a largo plazo. Además, presentan propiedades no tóxicas, bioadhesivas y biodegradables, que transforman a estos sistemas como potenciales nano-transportadores seguros y biocompatibles para la administración de fármacos oculares en tratamientos crónicos (Eldeeb *et al.*, 2019b; Guo *et al.*, 2010; Lalu *et al.*, 2017).

En una primera instancia, se evaluó la posibilidad de aplicar estos sistemas de manera tópica ocular, contando con los beneficios que posee esta vía de administración sumado al comportamiento de liberación sostenida que otorgan los cubosomas. De esta manera, lograr disminuir la frecuencia de administración y con ello, los efectos secundarios no deseados asociados a los tratamientos crónicos con prostaglandinas. Desafortunadamente, los cubosomas cargados con LN mostraron una liberación muy lenta y sostenida, y su adherencia a la superficie ocular no fue suficiente para retenerse por períodos largos de tiempos, razón por la cual eran removidos por las barreras oculares antes de que el fármaco se libere completamente. La baja concentración de fármaco que se liberaba no era suficiente para generar un efecto farmacológico eficiente. Por este motivo, se optó por la vía subconjuntival, administrar una única dosis de CubLnp y generar un "reservorio" de formulación que libere lentamente el fármaco sin ser removido rápidamente de la superficie ocular. En relación a esto, estudios sugieren la administración subconjuntival de la medicación oftálmica como una alternativa de interés para el paciente en la terapia crónica del glaucoma (Chong *et al.*, 2013).

Los cubosomas se sintetizaron por el método TD encapsulando concentraciones crecientes de LN (0,00125% a 0,02000% p/v). Las formulaciones de CubLnp obtenidas presentaron una consistencia homogénea sin diferencias significativas en tamaño de partícula y polidispersidad respecto al aumento de concentración de LN. Estos sistemas mostraron tamaño nanométrico en torno a los 200 nm con valores de IP en el rango de 0,1, lo que permitió deducir un tamaño poblacional homogéneo de todas las formulaciones evaluadas. Los valores de PZ para los cubosomas blanco y CubLnp a diferentes concentraciones fueron negativos con valores cercanos a -25 mV (*Tabla 2.4*). La carga superficial de las partículas es un indicador de la estabilidad de las nanopartículas en suspensiones. Los valores absolutos de PZ superiores a 20 mV se consideran como un umbral para obtener sistemas con buena estabilidad. Los cubosomas exhibieron una carga eléctrica alta (PZ >20 mV) en superficie, lo que proporciona una repulsión eléctrica eficaz para evitar la agregación entre las partículas (Honary and Zahir, 2013). Los valores de potencial negativo se pueden atribuir al efecto estabilizador del Poloxamer P407 absorbido en la superficie de la nanopartícula, que actúa como una capa de recubrimiento para evitar la agregación en la dispersión. Asimismo, por la estructura de copolímero en bloque, el Poloxamer normalizaría la fase cúbica a modo de preservar la estabilidad coloidal interna de las partículas de cristal líquido dispersas (Huang *et al.*, 2017; Tilley *et al.*, 2013).

Idealmente, las preparaciones de aplicación ocular deben formularse a un pH compatible con el fluido lagrimal. Por tanto, estos valores deben encontrarse dentro del rango de pH de comodidad ocular entre 6,6 a 7,8, considerando que la película lagrimal tiene cierta capacidad amortiguadora (López-Aleman *et al.*, 1999). Las formulaciones CubLnp en todas sus concentraciones, presentaron valores de pH en un rango de 5,8 – 6,4 (*Tabla 2.4*). A pesar de que estos valores de pH son levemente más ácidos que el

rango óptimo, se espera que la aplicación de CubLnp no cause efectos irritantes en la superficie ocular. Estudios previos, han demostrado que posterior a la instilación de soluciones oculares con pH entre 5-6, el pH general del fluido lagrimal tiende a restablecerse rápidamente a valores fisiológicos, causando mínimos malestares en la superficie ocular (Linda A. Felton, 2013; Saettone, M.F., Bucci, M., Speiser, 1987).

Se obtuvieron rendimientos altos de EE para todas las formulaciones de CubLnp, con valores de aproximadamente 87% a 94%, observándose una tendencia general: a medida que aumentaba la cantidad de LN añadida, el % de EE es mayor (*Tabla 2.4*). Esto puede deberse a la naturaleza apolar del fármaco y su afinidad por las estructuras internas lipofílicas del sistema cúbico (Azmi *et al.*, 2015). Rendimientos similares fueron reportados en bibliografía en cubosomas cargados con dexametasona e ibuprofeno, fármacos de naturaleza hidrofóbica al igual que LN, con valores de EE mayores al 80% (Gan *et al.*, 2010; Li and Shi, 2013).

Los estudios preliminares de estabilidad coloidal de los sistemas obtenidos, realizados en un período de 30 días, no mostraron cambios en las propiedades fisicoquímicas durante el tiempo de estudio en las condiciones de almacenamiento (25°C y preservado de la luz) (*Figura 2.7*). Se observó que la carga neta negativa de los valores de PZ aumentó ligeramente con el tiempo. Está demostrado que un valor alto de carga eléctrica en la superficie de las nanopartículas, evita la agregación en las soluciones tampón, debido a las fuertes fuerzas repelentes entre las partículas (Honary and Zahir, 2013). Estos resultados son muy prometedores, considerando las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y la excelente estabilidad demostrada en el período de estudio. Cabe señalar que las formulaciones comerciales de LN después de abierto el envase, se deben conservar refrigeradas y tienen un tiempo estimado de uso de no más de 4 semanas.

A partir de los estudios SAXS, se identificó una estructura cristalina interna de superficie doble diamante con fase cúbica $Pn3m$ para todas las formulaciones evaluadas, con un valor de parámetro de red de alrededor de 6,8 nm (*Figura 2.8*). Un aumento en la cantidad de LN no afectó significativamente este valor, esto podría deberse a la baja concentración de LN encapsulado en los cubosomas, el cual no es suficiente para provocar cambios significativos en las estructuras internas del cristal líquido. Asimismo, no se observó diferencia entre los perfiles SAXS de CubLnp y CubB, indicando que la fase cristalina de las nanopartículas cúbicas no se vio alterada con la adición de LN (Barauskas and Landh, 2003). Adicionalmente, en los perfiles de SAXS (*Figura 2.8*), se puede observar un pico adicional (referenciado con el símbolo *) que indica la presencia de una pequeña cantidad de nanopartículas de fase hexagonal (hexosomas) en coexistencia con la fase cúbica. El mismo efecto fue observado en las imágenes de Cryo-TEM (*Figura 2.9*), que confirman la presencia conjunta de estructuras de fase cúbica ($Pn3m$) con una pequeña cantidad de estructuras hexagonales invertidas (H_2). En línea con esto, se ha reportado en bibliografía el efecto de las variables de fabricación (temperatura, presión) sobre la

morfología de las nanopartículas cúbicas (Barriga *et al.*, 2019). Este efecto podría deberse al aumento de temperatura por encima de 40°C durante el proceso de preparación, provocando la formación de hexosomas además de cubosomas (Akhlaghi *et al.*, 2016). Yao-Da Dong *et al.* asoció los efectos de la temperatura en las transiciones de fase con la fuente comercial y la pureza del lípido FIT (Dong *et al.*, 2008). Por otro lado, las imágenes microscópicas muestran una fina capa de lípidos rodeando las nanopartículas, lo que contribuiría a su estabilidad física, minimizando la formación de agregados y manteniéndolos dispersos en una solución acuosa (Barauskas *et al.*, 2005).

ITC es un método efectivo y muy utilizado para estudiar los tipos de interacción entre las plataformas de administración de fármacos y los sistemas biológicos (Wu and Lee, 2009). Para analizar las interacciones entre LN y cubosomas, se realizaron mediciones de intercambio de calor a través de equipos ITC. Los resultados demostraron que la contribución de calor para la titulación de la solución de LN en agua fue insignificante, mientras que su titulación en los CubB condujo a un proceso exotérmico. Los valores calculados para la entalpía normalizada de la incorporación de la solución de LN al 0,005% en los cubosomas fueron demasiado altos (alrededor de -90 kJ.mol^{-1}) y se desconoce la razón de tal fenómeno. Se han reportado estudios de ITC en sistemas de administración de fármacos, como sistemas liposomales, donde se observa un comportamiento similar en la interacción fármaco-portador resultando en un proceso exotérmico (Ikonen *et al.*, 2010).

Los perfiles de liberación *in vitro* de LN desde los cubosomas mostraron resultados significativos en términos de liberación sostenida y prolongada durante el período de estudio. El bajo porcentaje de liberación de LN de las nanopartículas cúbicas en un período de 72 horas, lo hace interesante para aplicaciones en enfermedades crónicas como el glaucoma que requiere un tratamiento a largo plazo. Este comportamiento fue evidenciado en los estudios *in vivo*, donde se observaron efectos hipotensores prolongados con la administración de una única dosis de CubLnp a bajas concentraciones (0,00125% y 0,00250%). Diferentes autores describen perfiles de liberación sostenida de fármacos para cubosomas de FIT y señalan que dicho comportamiento se encuentra mediado por el tamaño de la molécula cargada, el tamaño de los canales de agua y la relación entre ellos (Barriga *et al.*, 2019; Li and Shi, 2013).

Para conocer la compatibilidad y tolerancia de los sistemas con los tejidos oculares, se realizó una prueba de irritación ocular *in vivo* mediante una versión modificada de la prueba de *Draize*, posterior a la administración subconjuntival de CubLnp y FC Louten®. Los resultados de la evaluación clínica ocular mostraron una leve irritación en los primeros días post-tratamiento, que disminuyó gradualmente con el paso de los días. El nivel de irritación observado puede relacionarse con el fármaco y la vía de administración. Por lo general, cuando se compara la aplicación por vía tópica con la vía subconjuntival, se puede observar una diferencia sustancial en el grado de irritación. Sin embargo, debe reconocerse que el tratamiento del glaucoma es crónico;

por lo tanto, es de esperar que la administración tópica de prostaglandinas a largo plazo produzca una alteración en la superficie ocular. Cuando LN es instilado tópicamente por períodos prolongados de tiempo, produce lesiones en la zona ocular por su naturaleza pro-inflamatoria (Patel and Spencer, 1996). Algunos efectos adversos asociados a este fármaco reportados en bibliografía son: inestabilidad de la película lagrimal, hiperemia, irritación conjuntival o síndrome de la superficie ocular, que con frecuencia causa ojo seco y ojo rojo (Alm, 2014). Esta es la primera causa de abandono y pérdida de adherencia al tratamiento por parte de los pacientes (Batra *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2018).

Por otro lado, se llevaron a cabo estudios *in vivo* en conejos normotensos para evaluar la eficacia terapéutica de los sistemas CubLnp. Los estudios demostraron que a partir de una única administración subconjuntival de CubLnp a bajas concentraciones de LN (0.00125% y 0.00250%), se logró una disminución de PIO promedio del 30%. El efecto hipotensor se mantuvo durante al menos 9 días después de la administración, lo que concuerda con el comportamiento observado en los perfiles de liberación *in vitro*. Estos resultados indican una eficacia terapéutica alcanzada para las formulaciones CubLnp, con una gran reducción de PIO durante un período prolongado de tiempo a concentraciones más bajas de LN en comparación con la FC Louten[®], sumado a una disminución en la prevalencia de efectos adversos asociados con el fármaco. Cheng *et. al.* describen un sistema de LN de liberación sostenida basado en un hidrogel termosensible de quitosano-gelatina-glicerol-fosfato, obteniendo una disminución del 10% con la primera administración subconjuntival (Chen et al., 2014). En nuestro estudio, el efecto hipotensor (disminución de PIO cercano al 30%) se prolongó hasta 9 días después de la administración de CubLnp comparada con la FC que sólo logró una reducción de PIO del 18% con rápida restauración a presión normal en 24 horas (*Figura 2.5*). El grado de disminución de PIO fue significativamente mayor para cubosomas que las gotas oftálmicas comerciales (* $p < 0,05$). En la práctica diaria de la clínica oftalmológica, este sistema sería una excelente alternativa para aquellos pacientes glaucomatosos que necesiten un corto período de suspensión de colirio. Por ejemplo, en casos de pacientes con cirugías oftalmológicas programadas; pacientes que necesitan viajar y tengan dificultades con la conservación y mantenimiento del colirio (refrigeración, aplicación diaria); pacientes ingresados en cuidados intermedios o intensivos que puedan ignorar u omitir su tratamiento diario. En todas estas circunstancias mencionadas, se podría protocolizar en instituciones con oftalmólogos a cargo que, según la historia clínica de cada paciente, pueda realizar el tratamiento hipotensor con una aplicación subconjuntival de la formulación CubLnp al paciente ingresado/ambulatorio y lograr mayor efectividad en tratamientos de esta patología.

En función de lo expuesto, en este trabajo de tesis se propone optimizar la farmacoterapia del glaucoma con la aplicación subconjuntival de cubosomas cargados con bajas concentraciones de LN con una frecuencia de administración reducida. De esta manera, se disminuiría la frecuencia de administración y la prevalencia de efectos

adversos asociados al fármaco, acompañado de una mayor protección de las estructuras oculares, especialmente córnea y áreas conjuntivales, en tratamientos crónicos del glaucoma.

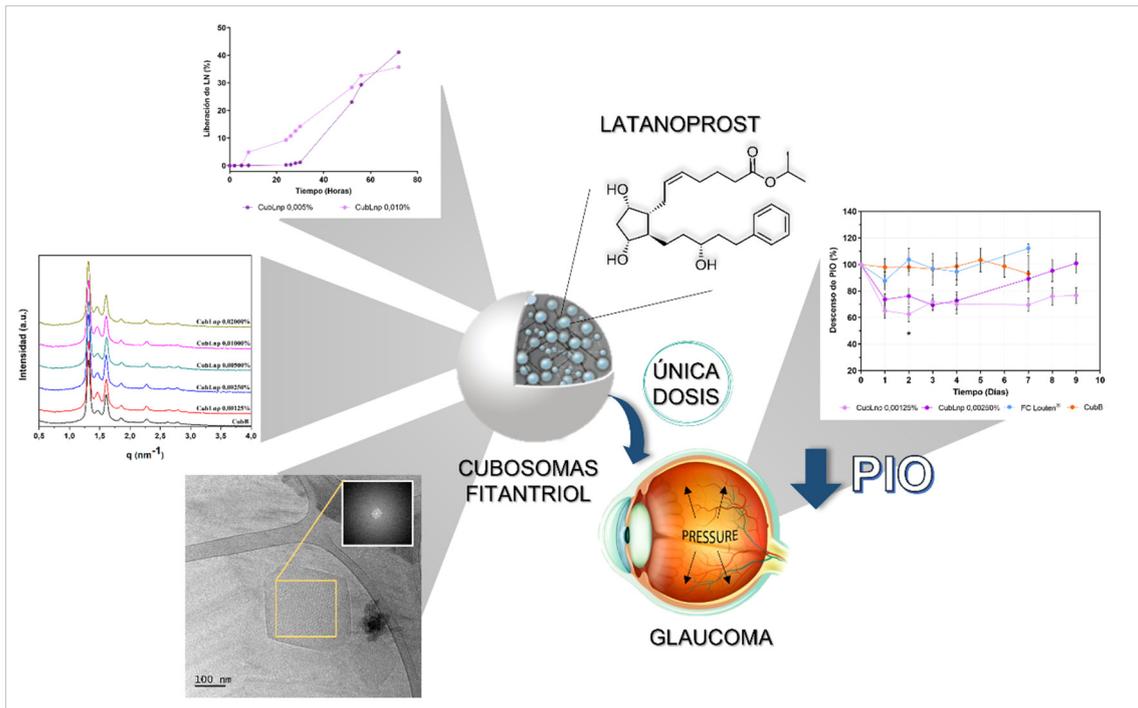
2.7. CONCLUSIONES PARCIALES

Teniendo en cuenta los desafíos que presenta la obtención de formas farmacéuticas de administración ocular eficaces y los inconvenientes asociados a la farmacoterapia tópica de LN en tratamientos crónicos del glaucoma, los objetivos del presente capítulo se consideran satisfactoriamente alcanzados.

En función de lo expuesto, luego del análisis y discusión de los resultados obtenidos, se establecieron las siguientes conclusiones parciales:

- Se obtuvieron CubLnp cargados con diferentes concentraciones de LN, en un rango de 0,00125% a 0,02000% p/v, por el método *top-down*. Todas las formulaciones presentaron propiedades fisicoquímicas adecuadas, con rendimientos de encapsulación de LN cercanos al 90% y una estabilidad coloidal aceptable para su administración por vía ocular.
- Mediante estudios *in vitro*, se demostró la capacidad de los cubosomas de modular la liberación de LN de manera prolongada y sostenida en el tiempo.
- A partir de estudio *in vivo* de irritación ocular, se demostró buena tolerancia y compatibilidad de las formulaciones CubLnp con los tejidos oculares, ya que presentaron puntuaciones de irritación inferiores al 20%, considerándose farmacéuticamente aceptables para su administración por vía ocular.
- Los CubLnp a bajas concentraciones de LN, mostraron ejercer un efecto hipotensor con una reducción de PIO cercana al 30% en una única aplicación subconjuntival.
- Con la aplicación de una única dosis de CubLnp a concentraciones de LN menores que la FC Louten® (0,00125% y 0,00250%), se logró un efecto farmacológico prolongado, por un período de 9 días.

Como conclusión general del presente capítulo, los CubLnp revelaron propiedades alentadoras para utilizarse como estrategia para superar las barreras biológicas oculares, mejorar la efectividad de la farmacoterapia y reducir los efectos adversos asociados a tratamientos crónicos en patologías como el glaucoma.



*Imagen resumen de los resultados obtenidos en el **Capítulo 2** mediante la obtención, caracterización y evaluación in vivo de los sistemas CubLnp a diferentes concentraciones de LN como tratamiento hipotensor en glaucoma.*

Capítulo 3:

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE MELATONINA EN MODELO ANIMAL DE DEGENERACIÓN RETINIANA EN CONEJOS

CAPÍTULO 3: Evaluación del efecto antioxidante de melatonina en modelo animal de degeneración retiniana en conejos

3.1. INTRODUCCIÓN

Las patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo se caracterizan por ser devastadoras y responsables de la mayoría de las disfunciones visuales y ceguera a nivel mundial. Actualmente, las enfermedades más prevalentes que comprometen la visión del paciente incluyen la degeneración macular relacionada con la edad (Jabbehdari and Handa, 2020), glaucoma (El HOFFY *et al.*, 2021), retinopatía diabética (Egunsola *et al.*, 2021), distrofias genéticas de la retina, así como muchas formas de isquemia retiniana desencadenadas por el estrés oxidativo. La mayoría de ellas son enfermedades crónicas y degenerativas, que causan daño progresivo al nervio óptico, pérdida de células ganglionares de la retina (CGR), fotorreceptores y otras células de la retina, desencadenando la pérdida gradual de la visión (Rivera *et al.*, 2017).

El estrés oxidativo es esencialmente un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del cuerpo para contrarrestar o desintoxicar sus efectos nocivos mediante la neutralización por antioxidantes (Subramaniam *et al.*, 2020). Este mecanismo es causado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) mientras que la capacidad antioxidante de la célula es insuficiente para protegerse de posibles daños (Ung *et al.*, 2017). Además, la presencia de altas concentraciones de ROS puede abrumar los mecanismos de defensa naturales de la célula, con posibles efectos que incluyen la producción de antioxidantes endógenos y la activación de vías que conducen a la muerte celular programada (Marco *et al.*, 2015). Las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son moléculas altamente reactivas que actúan modificando proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, lo que a menudo resulta en una disfunción de la biomolécula. El aumento de RNS y ROS en las CGRs detienen el crecimiento celular, producen daños en la estructura y función de los axones que forman parte del nervio óptico (Aslan *et al.*, 2008; Subramaniam *et al.*, 2020). Entre estos mecanismos, es conocido que la muerte celular se produce mediante una serie de pasos, y que la inhibición de cualquiera de ellos puede detener este proceso y rescatar a las células neuronales de la muerte.

ROS es un importante regulador de una función celular vital, la apoptosis, que juega un papel importante tanto en la homeostasis celular como en una variedad de estados patológicos (Nickelk and Zack, 1996). Varios estudios han demostrado que la apoptosis es el mecanismo principal por el que se produce la muerte de las CGRs, el cual puede ser desencadenado por varios procesos, siendo uno de los más importantes la excitotoxicidad inducida por glutamato (GLUT). El GLUT es un aminoácido esencial, que

cumple un papel importante como principal neurotransmisor excitador en la retina y su función es mediar la transmisión de señales desde los fotorreceptores a las células bipolares y CGR. Sin embargo, si los niveles de GLUT son muy elevados, puede producir un efecto tóxico y conducir a la muerte neuronal, fenómeno que se conoce como excitotoxicidad (Sabogal-Guáqueta et al., 2019). Asimismo, altas concentraciones de GLUT sobre estimulan los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), que a su vez abren los canales de Ca^{+2} y Na^{+} presentes en las células, conduciendo a un influjo excesivo y aumento de la concentración de ambos iones a nivel intracelular. Este exceso intracelular de cationes provoca la formación de radicales libres, entre ellos el óxido nitroso, y la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, lo que conlleva a la liberación de citocromo C y la posterior activación de las enzimas caspasa implicadas en la apoptosis (Maher and Hanneken, 2005). Asimismo, en la toxicidad oxidativa del GLUT, se inhibe la captación de cistina, que es esencial para la biosíntesis del glutatión (GSH), lo que resulta en el agotamiento de GSH de las células. GSH es el principal antioxidante intracelular y más abundante (Shirlee Tan *et al.*, 2001).

Los modelos existentes de estrés oxidativo se basan principalmente en la administración exógena de GLUT, pero también se ha estudiado su asociación con butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor selectivo de glutamato-cisteína ligasa (GCL) que disminuye el GSH intracelular (Griffith and Biol, 1979). En 1997, Li ZR y cols. (Zr *et al.*, 1997) informaron que la administración de BSO en ratas recién nacidas reduce los niveles de GSH y provoca cataratas en 1-2 semanas de su aplicación. La formación de cataratas, se atribuye directamente a los procesos oxidativos causados por un exceso de moléculas generadoras de estrés oxidativo (como oxígeno molecular, peróxido de hidrógeno y radicales libres) que conducen a la pérdida de GSH, peroxidación de lípidos y disminución de la actividad enzimática antioxidante (Carey *et al.*, 2011). Otros estudios demostraron que su combinación con GLUT, en una línea CGR inmortalizada, hizo que las células se volvieran significativamente más sensibles al tratamiento con GLUT (Maher and Hanneken, 2005); mientras que en una línea celular de fotorreceptores murinos (células 661 W), su combinación produce estrés oxidativo con alta producción de ROS y activación de caspasa, desencadenando la muerte celular por apoptosis (Matsuo *et al.*, 2019). Los antioxidantes son cada vez más populares para su uso en la prevención de patologías oculares relacionadas con el estrés oxidativo (Subramaniam *et al.*, 2020). La neuroprotección es un enfoque terapéutico destinado a reducir e inhibir la muerte neuronal bloqueando los mecanismos que pueden desencadenarla, independientemente del daño primario observado. A nivel ocular, la neuroprotección tiene como objetivo prevenir o inhibir la degeneración o muerte y/o mejorar la supervivencia de las CGRs y las fibras del nervio óptico que forman parte del sistema nervioso central y, por tanto, son susceptibles de sufrir ambos procesos (Naik *et al.*, 2020).

La melatonina (ME) o N-acetil-5-metoxitriptamina (*Figura 3.1*) es una neurohormona sintetizada principalmente por la glándula pineal, mediadora de los

ritmos biológicos e implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos (Rosenstein *et al.*, 2010). En el ojo, la ME es sintetizada localmente y contribuye con la regulación de los movimientos retinomotores, síntesis y liberación de dopamina y presión intraocular (PIO). Además, ME es un antioxidante y antiapoptótico eficaz, que actúa como eliminador directo e indirecto de radicales libres (Hardeland and Pandi-Perumal, 2005). De esta manera, la ME interviene como un neuromodulador local regulando la fisiología circadiana (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014). En ese contexto, abundante evidencia experimental confirma la capacidad de ME y sus metabolitos de comportarse como antioxidante directo e indirecto, eliminando radicales libres y sus reactivos asociados, estimulando las enzimas antioxidantes que promueven aún más su capacidad para reducir la toxicidad y activa mecanismos de otros antioxidantes biológicos (Laurentiis and Sande, 2016; Rosenstein *et al.*, 2010; Tosini *et al.*, 2012a). Asimismo, varios autores sugieren que ME puede actuar como un agente protector en afecciones oculares como fotoqueratitis, cataratas (Abe *et al.*, 1994), retinopatía del prematuro y lesión por isquemia/reperfusión (Siu *et al.*, 2006), neuritis óptica (Aranda *et al.*, 2021), glaucoma (Belforte *et al.*, 2010) y retinopatía diabética. Recientemente, estudios han demostrado efectos protectores de la ME sobre la retinopatía diabética y su capacidad para regular la inflamación, la autofagia y el estrés oxidativo en las células de Müller y las células epiteliales pigmentarias de la retina (Boga *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021). Estas acciones combinadas, junto con su baja toxicidad y su capacidad para penetrar todas las membranas morfo-fisiológicas, convierten a ME en un antioxidante y antiapoptótico eficaz, de acción generalizada y altamente beneficioso para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares.

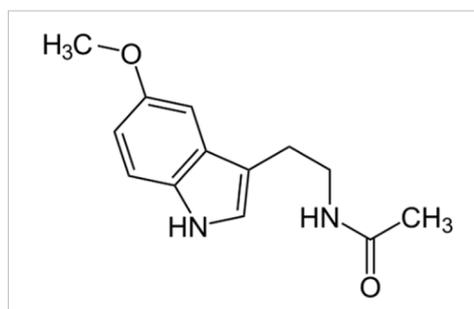


Figura 3.1. Estructura química de Melatonina

De acuerdo a los antecedentes expuestos, se planteó como **hipótesis de trabajo** la utilización de ME como un potencial neuroprotector para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares a partir de su capacidad de prevenir y/o inhibir la degeneración o muerte de las CGRs y mejorar su supervivencia ante el avance de la enfermedad. En consecuencia, en este capítulo se reportan los resultados de los estudios realizados, como paso previo a la incorporación del fármaco en formulaciones farmacéuticas, relacionadas a la evaluación del efecto terapéutico como antioxidante y

antiapoptótico de ME en CGRs sometidas a un proceso de estrés oxidativo, en búsqueda de terapias alternativas.

Para ello, se utilizó un modelo *in vivo* de toxicidad oxidativa inducida a partir de la administración conjunta de GLUT y BSO. En este contexto, se determinaron los efectos beneficiosos de la administración intravítrea de ME sobre las alteraciones funcionales, morfológicas e histológicas provocadas por la inducción del modelo.

Los estudios experimentales in vitro se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Ágata Carpentieri y su grupo de investigación; de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA CONICET. Los estudios in vivo para determinar la modificación de la respuesta electrofisiológica se realizaron en estrecha colaboración con el Dr. Hugo Díaz Fajreldines, del Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Neurociencias (Córdoba, Argentina).

3.2. MATERIALES

3.2.1. Melatonina y excipientes

ME (N-acetil-5-metoxitriptamina) con una pureza del 98% fue adquirido en Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos). El cloruro de sodio (NaCl) de marca comercial Parafarm® fue provisto por Saporiti (S.A.C.I.F.I.A., Buenos Aires, Argentina) y el agua por Milli RO System® (Millipore®, Argentina). Los agentes oxidantes GLUT y BSO, utilizados para la inducción del modelo animal, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos).

Para los estudios inmunohistoquímicos de retina, se utilizó un kit de detección de muerte celular *in situ* (TUNEL, por sus siglas en inglés "terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling") provisto por Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos). Además, se utilizaron los siguientes reactivos: proteinasa K, peróxido de hidrógeno, verde de metilo, glutaraldehído y formaldehído, adquiridos en Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EE.UU.) y Parafarm® (Saporiti S.A.C.I.F.I.A., Buenos Aires, Argentina).

3.3. ANIMALES

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en conejos hembra *New Zealand* de 2 a 2,5 kg. Los animales se mantuvieron en estrictas condiciones de animalario, con ambiente controlado de luz/oscuridad con ciclos de 12/12 h en jaulas individuales con libre acceso a alimento y agua. Posterior a ser anestesiados con una combinación de ketamina 0,75 mL.kg⁻¹ (Ketamina 50 mg.mL⁻¹, Holliday Scott S.A., México) y xilacina 0,25 mL.kg⁻¹ (Xilacina 100 mg.mL⁻¹, Laboratorios Richmond S.A., Buenos Aires, Argentina), los animales fueron

sacrificados con una mezcla de 10% de O₂ y 90% de CO₂ en una cámara hermética de acrílico, para la enucleación de los globos oculares y posterior evaluación de las retinas.

Todos los experimentos se realizaron conforme a los procedimientos de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) resolución sobre el uso de animales en la investigación, la *European Communities Council Directive* (86/609/CEE) y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Res. HCD N°44/17). Se hicieron todos los esfuerzos para reducir el número de animales utilizados.

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Estudios *in vitro*

3.4.1.1. Evaluación *in vitro* del efecto de agentes oxidantes y ME sobre cultivo primario de CGR

Las CGRs son las principales neuronas de proyección de la retina que transmiten información de otras neuronas al resto del cerebro. Estas células son las más grandes de todas las neuronas de la retina y se extienden a lo largo del margen interno de la retina, en la capa de células ganglionares. Sus axones corren en una capa separada en la superficie interna de la retina, se acumulan en el disco óptico, donde se mielinizan y forman el nervio óptico (Levine, 2011; Marshak, 2009).

El cultivo primario de CGR se obtuvo a partir de retinas de embriones de pollo de 8 días de edad y fueron purificadas mediante un método por *immunopanning* según con el procedimiento descrito por Garbarino-Pico y colaboradores (Garbarino-Pico *et al.*, 2004). Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) con la adición de suplementos para dar un cultivo de neuronas.

Para evaluar la efectividad de ME sobre la degeneración celular, se procedió a inducir citotoxicidad y estrés oxidativo mediante la administración conjunta de GLUT y BSO, en concentraciones de 10, 15, 20 y 0,75 mM, respectivamente. Posteriormente, se administró ME a una concentración de 0,5 mM, con el fin de evaluar su capacidad para prevenir y/o inhibir los efectos citotóxicos y oxidativos del tratamiento aplicado. La configuración experimental consistió en tres grupos de muestras: 1) CGR control, 2) CGR tratado con BSO-GLUT y 3) CGR tratado con BSO-GLUT + ME, durante 24 y 48 horas. Además, se analizaron en paralelo muestras de control tratadas con ME, GLUT o BSO.

La viabilidad celular se determinó mediante la técnica del cristal violeta, donde las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 1% e incubadas en una solución de cristal violeta al 0,1%. Para los estudios inmunohistoquímicos de detección de apoptosis por técnica *TUNEL*, los cultivos de CGR fueron fijados con solución de paraformaldehído

al 4% y se aplicaron los protocolos que se describen a continuación (*apartado "3.3.2.5. Detección de apoptosis in situ: técnica TUNEL"*)

3.4.2. Estudios *in vivo*

3.4.2.1. Obtención del modelo de Degeneración Retiniana: evaluación dosis de oxidantes

Ante los antecedentes demostrados en los estudios *in vitro*, se exploró la toxicidad ocular de soluciones de GLUT-BSO en diferentes concentraciones con el fin de encontrar la dosis en un rango seguro para la generación del modelo *in vivo* y posterior evaluación del efecto terapéutico de ME. Para ello, se escogieron dos concentraciones de agentes oxidantes: 200 mM GLUT y 75 mM BSO, dosis mayor a la utilizada en los estudios de cultivo celular, y 200 μ M GLUT y 75 μ M BSO de menor concentración. La toxicidad de las mismas fue evaluada mediante estudios electrofisiológicos e histopatológicos, luego de la eutanasia de los animales a las 48 h de administración.

3.4.2.2. Modelo de Degeneración Retiniana

A partir del estudio comparativo de toxicidad, se determinó la dosis 200 μ M de GLUT y 75 μ M de BSO como la más adecuada para inducir estrés oxidativo y citotoxicidad celular, capaz de reproducir las características de una degeneración progresiva retiniana, principalmente de las CGRs, como se presenta en las patologías neurodegenerativas oculares (Subramaniam et al., 2020; Ung et al., 2017; Wang et al., 2014).

La inducción del modelo DR se realizó en conejos *New Zealand* mediante la administración intravítrea de una dosis de 200 μ M de GLUT y 75 μ M de BSO, previamente disueltos en una solución de NaCl al 0,9% p/v. Para ello, previo a la intervención, los animales se anestesiaron localmente con hidrocloreuro de proparacaína 0,5% p/v (Anestalcon[®], Laboratorios Alcon, Texas, Estados Unidos). La inyección intraocular, en un volumen de 40 μ L, fue administrada en la cámara anterior del ojo izquierdo, específicamente en el cuadrante temporal superior, ubicado a 4 mm del limbo esclerocorneal, utilizando una jeringa TERUMO[™] acoplada a una aguja calibre 29G. Para un análisis comparativo (control negativo), se inyectó un volumen igual de una solución de NaCl al 0,9% en el ojo derecho. En ambos casos, inmediatamente después de retirar la aguja, se aplicó un hisopo de algodón embebido en una solución de yodo povidona al 4% (Pervinox[®], Laboratorio Elea Phoenix S.A., Buenos Aires, Argentina) para prevenir la infección bacteriana.

Luego de 9 días, el tejido ocular enucleado (de acuerdo con los protocolos) fue procesado para estudios histológicos, inmunohistoquímicos y microscopía electrónica de transmisión. Previamente, la respuesta electrofisiológica retinal fue evaluada por electrorretinografía. Se utilizaron 5 conejos por grupo (10 ojos).

3.4.2.3. Administración intravítrea de ME

Para evaluar el efecto neuroprotector y antiapoptótico de ME frente a la inducción de estrés oxidativo sobre las células neuronales de la retina, se administró de manera intravítrea junto a la dosis de agentes oxidantes. Para ello, se disolvió ME en una concentración de 1 mg.mL^{-1} junto a la dosis de GLUT ($200 \text{ }\mu\text{M}$) y BSO ($75 \text{ }\mu\text{M}$) en una solución de NaCl al 0,9% p/v. Esta dosis en un volumen de $40 \text{ }\mu\text{L}$ fue administrada de manera intravítrea en el ojo izquierdo del animal, mientras que el ojo derecho se utilizó como control negativo al cual se le inyectó el mismo volumen de una solución de NaCl al 0,9% p/v. La intervención se efectuó siguiendo la misma metodología descrita en el apartado anterior.

3.4.2.4. Estudios electrofisiológicos

La electroretinografía (ERG) es una técnica no invasiva que se utiliza para registrar la función de las neuronas de la retina. Al someter la retina a intensidades de luz conocidas, se puede inducir y registrar una respuesta eléctrica. Como los estudios electrofisiológicos son el reflejo del estado funcional de capas medias y externas de la retina, se puede detectar su alteración debida a un daño funcional o histológico de la estructura retiniana. Esta información es de gran utilidad en el estudio de las enfermedades oculares (Rosaralis *et al.*, 2005).

Se evaluó el nivel de respuesta fotópica en ambos ojos del animal, previo a la inyección y a los 0, 2, 5 y 9 días posteriores a la administración de las soluciones de control y de prueba. Previo al estudio, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intramuscular de $0,5 \text{ mL.kg}^{-1}$ de una mezcla que contiene ketamina $0,75 \text{ mL.kg}^{-1}$ (dosis de 50 mg.mL^{-1}) y xilacina $0,25 \text{ mL.kg}^{-1}$ (dosis de 100 mg.mL^{-1}). En la superficie del ojo a evaluar, se aplicó una gota de hidrocloreuro de proparacaína 0,5% p/v como anestésico local. Se insertó un electrodo de referencia a aproximadamente 0,5 cm de la comisura posterior del ojo, un electrodo conectado a tierra en la parte posterior de la cabeza entre las orejas y el electrodo de plata (electrodo activo) se colocó en contacto con la córnea central. Los electrorretinogramas se registraron para un ojo a la vez. Al mismo tiempo, previo al estudio, se controló diariamente la PIO siguiendo la metodología detallada en el apartado "2.4.4.1. Medición de la Presión Intraocular" del capítulo 2.

Un fotoestimulador LED del tipo flash con ajustes de 7,85 y $11,78 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (10 y 15 Lux) y 1 Hz de frecuencia se utilizó para llevar a cabo los estudios. Los animales fueron expuestos al estímulo de luz a una distancia de 20 cm, con un ciclo de tiempo de 300 ms y con una intensidad de luz ambiente de aproximadamente $6,28 \text{ cd.s.m}^{-2}$ (8 Lux). Se utilizó un equipo AKONIC BIO-PC® (Akonic, Argentina) para registrar y amplificar la señal. Los electrorretinogramas se registraron con una ganancia de $100 \text{ }\mu\text{V}$, sin atenuación, utilizando filtros de alta frecuencia (300 Hz), baja frecuencia (1,5 Hz) y de muesca *notch*

(50 Hz). En cada estudio se aplicaron 100 estímulos de destellos de luz blanca y se registró el valor promedio de las respuestas. Para evitar variación en las respuestas de ERG (por el ritmo circadiano animal) todos los estudios se llevaron a cabo a la misma hora del día.

La onda-a se midió como la amplitud desde el inicio del registro hasta la máxima depresión de la deflexión negativa y, la amplitud de la onda-b se midió desde la depresión de la onda-a hasta el pico de la onda-b. Los resultados de los estudios ERG se analizaron midiendo la latencia y la amplitud entre las onda-a y onda-b (Buitrago *et al.*, 2013). Las respuestas retinales de los ojos de los animales tratadas con fármaco y aquellas inyectadas con solución control, se compararon mediante un análisis de varianza de la prueba *t-student*. Se consideraron estadísticamente significativos a valores de $*p < 0,01$.

3.4.2.5. Estudios Histopatológicos

Para la preparación de los cortes, a los 9 días de exposición al modelo de DR, los animales fueron sacrificados, se enuclearon los globos oculares y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS (pH=7) a temperatura ambiente. Posteriormente, se deshidrataron en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol absoluto (70, 80, 95 y 100%), se diafanizaron en acetato de butilo y finalmente se sumergieron en parafina. Los ojos se diseccionaron (5 μ m) a lo largo del meridiano vertical del nervio óptico y se tiñeron con hematoxilina-eosina para analizar las secciones de tejido mediante microscopía óptica (Olympus® BX41 Microscope; Infinity 1® Camera) (Belforte *et al.*, 2010; Foureaux *et al.*, 2015; Kwok *et al.*, 2005). Las imágenes se digitalizaron y se cuantificaron utilizando el programa *Image J* como soporte. Para el recuento de viabilidad de CGR, se analizó la retina en su extensión, incluida la zona del nervio óptico. El estudio se realizó por triplicado (N=3) y los valores se presentan con respecto al control.

3.4.2.6. Detección de apoptosis *in situ*. técnica TUNEL

Esta técnica permite visualizar y cuantificar las CGRs apoptóticas mediante el marcaje de extremos de corte dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL, por sus siglas en inglés "terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling). Para ello, se utilizó el kit de detección de muerte celular *in situ*, POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) basado en el marcaje de roturas de hebras de ADN.

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se desparafinaron las secciones de tejido embebido en parafina con xileno, se rehidrataron mediante el agregado de mezclas en distintos porcentajes de etanol absoluto y agua bidestilada y, finalmente, se enjuagan con solución tamponada de PBS (pH=7,3) durante 5 min. A partir de este paso, a las secciones de tejido ocular, se incluyen las muestras de cultivo de CGR, los cuales se incubaron con una solución de proteinasa

K ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 15 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente, con el fin de frenar la reacción enzimática. Después de enjuagar con PBS, las muestras se incubaron con la mezcla de reacción *TUNEL* durante 60 min a 37°C y en una atmósfera humidificada en oscuridad, para permitir que ocurrieran las reacciones de marcaje final. La reacción de color se activó mediante la adición de diaminobencidina (DAB) y se dejó transcurrir durante 3-6 min. Las muestras se tiñeron por contraste con una solución de verde de metilo al 0,5%, antes de analizarlas mediante microscopía óptica (Olympus BX41).

Como control positivo, se utilizaron secciones de tejido de glándulas mamarias con apoptosis extensa extraídas de ratas (providas por el kit). Bajo microscopía óptica, las células *TUNEL*-positivas se observaban de color marrón exhibiendo sus núcleos apoptóticos, mientras que, las células no apoptóticas se mostraban azules por la tinción del verde de metilo. Las células *TUNEL*-positivas se cuantificaron en relación con el número total de células de la capa ganglionar y se expresaron como el porcentaje de índice apoptótico (%IA) (Yang *et al.*, 2010). Las imágenes se tomaron con un aumento de 20X y se digitalizaron mediante el programa *Infinity Analyze*, para su posterior análisis y cuantificación con *Image J*.

3.4.2.7. Microscopía Electrónica de Trasmisión

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es una herramienta única para la caracterización de materiales biológicos a nanoescala, permite dilucidar los detalles finos de la ultraestructura celular, incluida una arquitectura altamente caracterizada de orgánulos subcelulares y su identificación en micrografías electrónicas (Duranova *et al.*, 2020). Es una técnica de microscopía que utiliza un haz de electrones de aprox. 100-300 kV, generado a partir de filamentos de hexaboruro de tungsteno o lantano o pistolas de emisión de campo, que permiten obtener imágenes de alta resolución (Kim and Hochella, 2015).

En este estudio, se analizaron los tejidos de retina de los conejos expuestos al modelo de DR durante 9 días, para evaluar la morfología y estructura de las CGR mediante microfotografías electrónicas. Para ello, las muestras se lavaron durante dos horas con 1 mL de solución *buffer* de PBS ($\text{pH}=7,0$) y se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2% y formaldehído al 4% en tampón cacodilato 0,1 M. A continuación, los tejidos se fijaron nuevamente con tetraóxido de osmio al 1% en la misma solución tampón, se deshidrataron y embebieron en Araldita. Para la observación de la ultraestructura celular, se diseccionaron delgadas capas de tejido de retina utilizando un ultramicrotomo con cuchilla de diamante (JEOL[®] JUM-7), que luego se fijaron en portaobjetos de vidrio y se examinaron por TEM (ZEISS[®] LEO 906E, Aalen, Alemania) (Cafaro *et al.*, 2015; Díaz de Barboza *et al.*, 2014; Forssmann *et al.*, 1977).

3.4.3. Análisis estadístico

Para todos los ensayos, los datos fueron expresados como la media \pm DE considerando al menos tres valores para cada medida. El análisis estadístico entre los valores medios y su comparación entre grupos, se determinaron mediante *test t student* o el análisis de la varianza (ANOVA) y se consideraron significativas cuando el valor de *p* fue menor a 0,050 o 0,001, según el experimento. Para ello, se utilizó el programa InfoStat/L: Statistical Software (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Estudios *in vitro*

3.5.1.1. Estudio de viabilidad celular: efecto de GLUT-BSO sobre cultivo primario de CGR

Como punto de partida, se exploró la dosis óptima de GLUT-BSO para producir los efectos oxidativos y citotóxicos deseados, mediante la técnica del cristal violeta que permite medir viabilidad celular en cultivo primario de CGR.

Los resultados de viabilidad celular que se muestran en la *Figura 3.2*, demostraron que la dosis óptima de oxidantes fue a una concentración de BSO 0,75 mM + GLUT 20 mM, con valores de %CGR significativamente diferentes con respecto al control. Los efectos observados fueron proporcional a la concentración de agentes oxidantes administrada. Las imágenes obtenidas por microscopía óptica de las muestras de cultivo de CGR procesadas por la técnica cristal violeta, exponen una comparación cuantitativa de las tres concentraciones evaluadas de GLUT-BSO respecto a la muestra de control sin tratamiento. Los cultivos celulares se vieron afectados notablemente por el efecto deletéreo de la citotoxicidad de GLUT-BSO, disminuyendo considerablemente la supervivencia de CGR como consecuencia del estrés oxidativo causado por la depleción de GSH producido por la administración de BSO y concomitante citotoxicidad generada por GLUT.

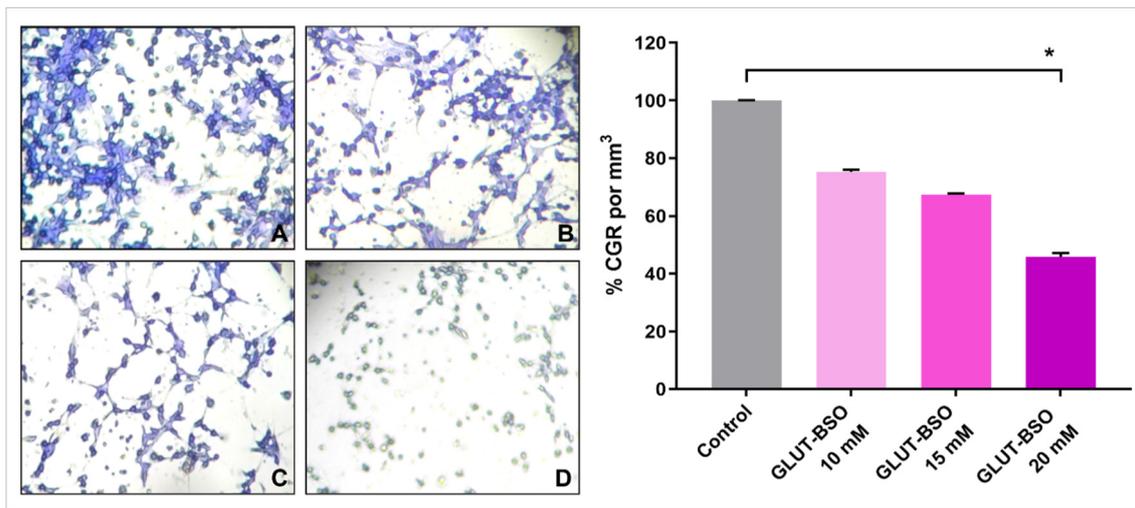


Figura 3.2. Estudio de viabilidad celular en cultivo primario de CGR por técnica de cristal violeta postratamiento con diferentes concentraciones de GLUT-BSO

Las imágenes son representativas del análisis de microscopía óptica de muestras de cultivo de CGR procesadas por la técnica de cristal violeta (A) sin tratamiento (control) y luego de ser incubadas con las siguientes concentraciones de GLUT-BSO (B) 10 mM, (C) 15 mM y (D) 20 mM.

El gráfico de barras muestra el análisis cuantitativo de supervivencia de CGR, representados como la media \pm DE del porcentaje (%) de CGR por mm³. Los resultados fueron analizados por ANOVA, y las diferencias significativas ($*p < 0,01$) se representan respecto al control.

3.5.1.2. Evaluación *in vitro* del efecto de ME: detección de apoptosis

Con el objetivo de analizar el efecto neuroprotector de ME sobre el cultivo celular de CGR, con previo tratamiento de agentes oxidantes, se realizó detección de muerte celular mediante técnica *TUNEL* que permite visualizar y cuantificar las células en estado apoptótico. Para ello, se estudiaron dos muestras de ensayo diferentes: CGR tratada con GLUT-BSO y CGR tratada con GLUT-BSO + ME, y como muestra control, un cultivo CGR sin tratamientos.

Como muestra la *Figura 3.3*, se observó una significativa disminución de la supervivencia celular en las muestras tratadas con GLUT-BSO, con respecto a los grupos de control, 48 horas después del tratamiento. Sin embargo, este efecto disminuyó cuando se administró ME (0,5 mM) junto con la dosis de GLUT-BSO. El número de células *TUNEL*-positivas se incrementó sustancialmente en las muestras tratadas con GLUT-BSO, con respecto a las muestras tratadas con GLUT-BSO + ME y los controles sin tratamientos.

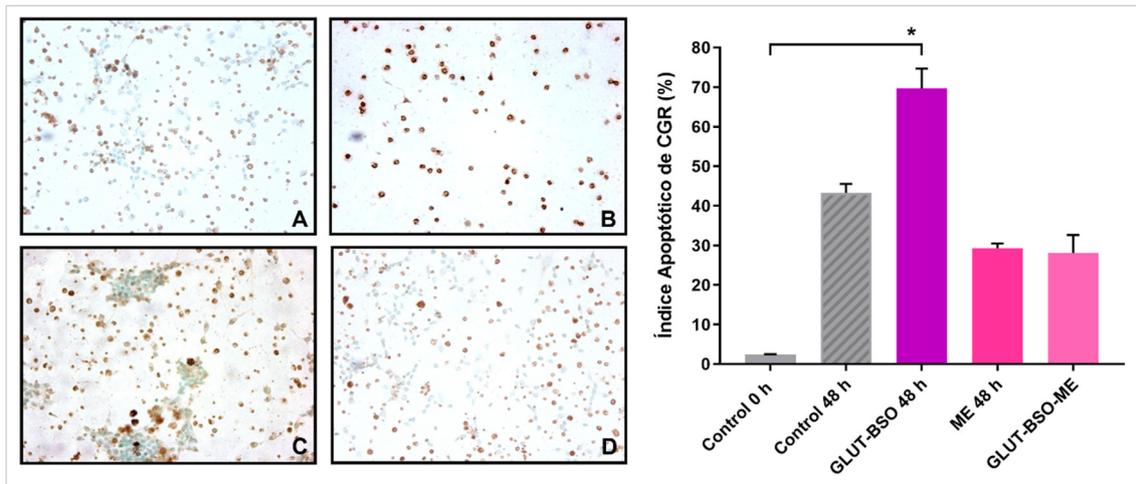


Figura 3.3. Evaluación del efecto antiapoptótico de ME en cultivo primario de CGR tratadas con GLUT-BSO

Imágenes obtenidas por microscopía óptica de muestras de cultivo de CGR procesadas mediante técnica TUNEL para la detección *in situ* de muerte celular por apoptosis (A) sin tratamiento (control), y posterior a la aplicación de los siguientes tratamientos (B) GLUT-BSO, (C) ME y (D) GLUT-BSO-ME. El estudio se llevó a cabo 48 h posteriores a la aplicación de los tratamientos. El gráfico de barras representa el análisis cuantitativo de la proporción de células TUNEL-positivas en cultivos de CGR y son representados como la media \pm DE del porcentaje de índice apoptótico (%IA). Los resultados fueron analizados por ANOVA, y las diferencias significativas ($*p < 0,001$) se representan respecto al control.

3.5.2. Estudios *in vivo*

3.5.2.1. Modelo de Degeneración Retiniana: selección dosis de GLUT-BSO

Como punto de partida, se evaluó el grado de toxicidad ocular de diferentes concentraciones de GLUT-BSO. Para ello, conejos *New Zealand* se inyectaron vía intravítrea con soluciones de 200 mM GLUT-75 mM BSO y 200 μ M GLUT-75 μ M BSO. Como control, el ojo derecho de cada animal tratado se inyectó con una solución de NaCl 0,9% p/v. A continuación, con el objetivo de seleccionar la concentración adecuada de GLUT-BSO mediante la evaluación de las alteraciones producidas a nivel ocular, se realizaron estudios de electroretinografía a todos los animales inyectados y, se analizaron los cortes histológicos oculares de los mismos, luego de su eutanasia a las 48 h.

En este estudio de toxicidad, los electroretinogramas (ERG) mostraron una disminución brusca y marcada, tanto en las latencias como en la amplitud para aquellos animales inyectados con la dosis mayor (200 mM GLUT-75 mM BSO) respecto al control, presentando valores cercanos a cero a las 48 h de administrado (Figura 3.4). Esta respuesta se ve asociada a la pérdida de la funcionalidad casi completa de las células de

retina dada por la toxicidad y daño celular generado por la dosis de oxidantes. En cuanto a la dosis menor (200 μ M GLUT-75 μ M BSO), no se observaron efectos negativos sobre la funcionalidad de la retina, los ERG presentaron amplitudes constantes y sin cambios con respecto al control al segundo día de estudio (48 h).

Respecto al análisis histológico de los tejidos oculares, se muestran en la *figura 3.4*, se observaron diferencias estructurales importantes de las distintas capas de retina correspondientes a los ojos de los animales inyectados con la mayor dosis de GLUT-BSO, en comparación a lo observado en el control. Estas alteraciones se acompañaron con la desaparición casi completa de CGR y fotorreceptores y una disminución significativa del espesor de las capas intermedias de la retina. Mientras que, a dosis bajas, se detectaron irregularidades en la organización de las diferentes capas de la retina, manteniéndose la configuración normal, acompañado de una leve disminución de CGR y células fotorreceptoras.

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, se seleccionó la menor dosis de GLUT-BSO (200 μ M GLUT-75 μ M BSO) como la dosis adecuada para la inducción del modelo animal *in vivo* de DR. A esta concentración de agentes oxidantes, se observa una toxicidad ocular leve acompañada de una disminución paulatina de las células de retina, principalmente de CGR, manteniéndose la configuración estructural de las diferentes capas celulares. De esta manera, se puede evaluar el efecto terapéutico de ME administrada en el modelo DR previamente inducido.

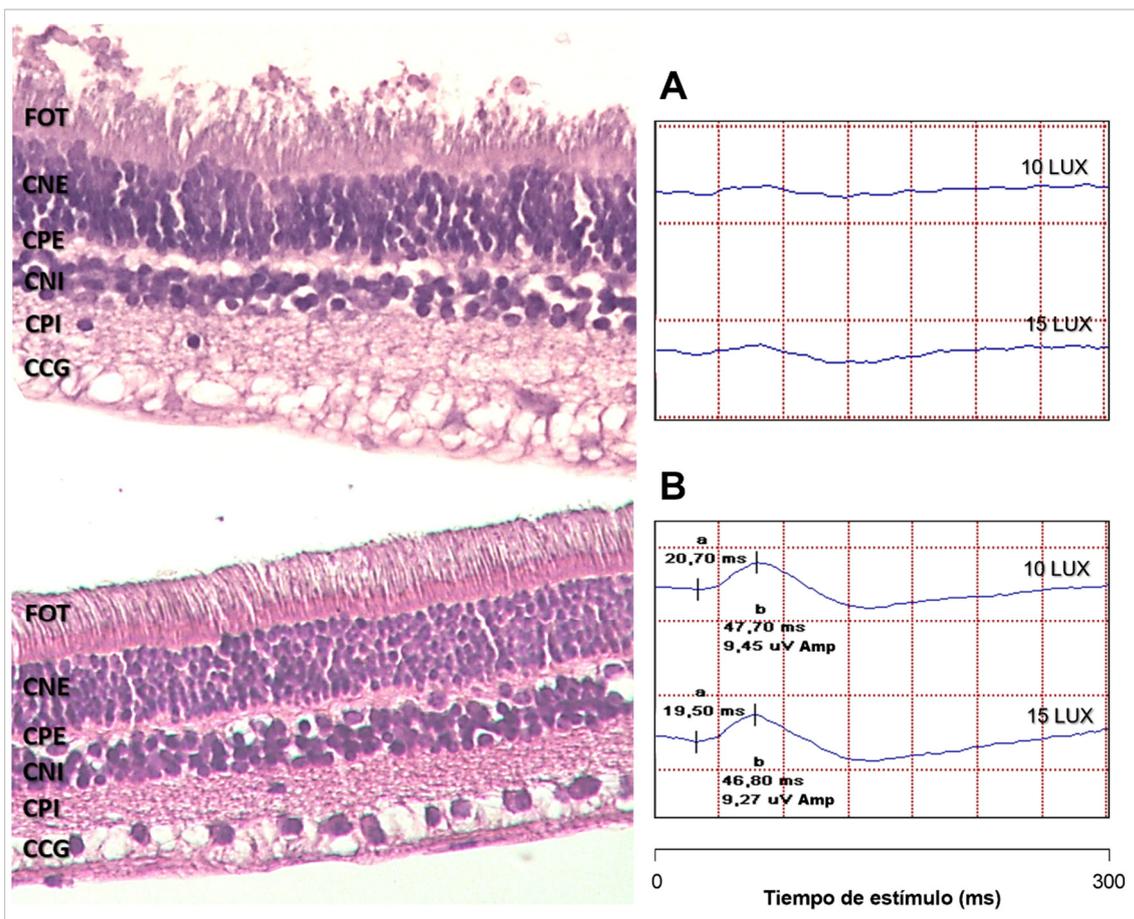


Figura 3.4. Efectos fisiológicos e histológicos de GLUT-BSO a diferentes dosis.

Análisis comparativo de imágenes de microscopía óptica de retinas con tinción de hematoxilina/eosina y ERG fotópicas representativas de conejos para ojos inyectados con diferentes concentraciones de GLUT-BSO: (A) 200 mM GLUT-75 mM BSO (dosis alta) y (B) 200 μ M GLUT-75 μ M BSO (dosis baja), a 48 h de tratamiento. Magnificación de la imagen: 20X.

Respuestas ERG a estímulos de 10 y 15 lux de intensidad.

Abreviaturas: FOT: Fotorreceptoras. CNE: Capa Nuclear Externa. CPE: Capa Plexiforme Externa. CNI: Capa Nuclear Interna. CPI: Capa Plexiforme Interna. CCG: Capa de Células Ganglionares. a: onda-a (ms). b: onda-b (ms). Amp: amplitud entre onda-a y -b (mV).

3.5.2.2. Evaluación del efecto terapéutico *in vivo* de ME en modelo de DR

Con el objetivo de evaluar la eficacia terapéutica *in vivo* de ME, se inyectaron conejos con el modelo DR previamente inducido con una solución de este fármaco (1 mg.mL⁻¹) por vía intravítrea. Como control del estudio, los ojos derechos de los animales tratados fueron inyectados con el mismo volumen de una solución de NaCl 0,9% p/v expuestos al modelo de DR. A los 9 días de tratamiento, se evaluó la respuesta electrofisiológica de los animales, con posterior extracción del tejido ocular para evaluación histopatológica e inmunohistoquímica de la retina.

3.4.2.2.1. Electrorretinografía

La electroretinografía corneal es una herramienta útil para la evaluación objetiva de la función de la retina (Bui and Fortune, 2004). El ERG resultante es una señal compuesta generada por la retina en respuesta a estímulos de luz y es una medida del promedio de los biopotenciales que refleja la funcionalidad de las capas media y externa de la retina (Smith *et al.*, 2014). La fototransducción, es un proceso que tiene lugar en los fotorreceptores (conos y bastones), mediante el cual se traduce la energía lumínica recibida en una serie de señales eléctricas y se transmite mediante sinapsis a las células bipolares y luego, a CGR que conducirán la información hacia el núcleo geniculado y, finalmente, a la corteza visual primaria (Ogden, 2006).

En condiciones fotópicas, cuando las respuestas de los bastones están saturadas, el ERG se compone de una deflexión negativa (*onda-a*) generada por la activación eléctrica de las células del circuito del cono con contribuciones adicionales de las células bipolares del cono hiperpolarizante y las células horizontales, seguida de una deflexión positiva (*onda-b*), resultante de la activación eléctrica de células bipolares despolarizantes, células horizontales y células de Müller (Prencipe *et al.*, 2020). Las alteraciones en las condiciones de aplicación del estímulo pueden definir qué tipos de células de la retina sufren alguna forma de agresión.

Como primer enfoque, se evaluó la respuesta electrofisiológica y la variación del umbral entre los ojos con el modelo DR inducido (dosis GLUT-BSO) y los tratados con ME respecto a los ojos control. Los electroretinogramas resultantes de los ojos inyectados con GLUT-BSO como aquellos tratados con GLUT-BSO + ME (1 mg.mL^{-1}), mostraron tiempos de latencias constantes sin cambios significativos en los valores de amplitud de la onda-a y onda-b con respecto a los ojos control. En ambos casos, no se observaron efectos negativos sobre la funcionalidad de la retina ni variaciones en la PIO durante el tiempo de tratamiento. Por tanto, se puede inferir que, la administración intravítrea de única dosis de GLUT+BSO junto a ME a las concentraciones estudiadas no produce alteraciones que afecten la respuesta funcional de la retina después de 9 días de tratamiento.

3.4.2.2.2. Estudios Histopatológicos

En cuanto al análisis de los cortes histológicos oculares que se muestran en la *figura 3.5*, se puede observar que las retinas control mostraron una configuración normal sin alteraciones estructurales en todas las capas de la retina. Mientras que los ojos con el modelo DR inducido (dosis GLUT-BSO) presentan rupturas esporádicas e irregularidades en las capas de células fotorreceptoras con generación de espacios intercelulares en la capa nuclear externa (CNE). Asimismo, se detectó pérdida de integridad estructural de la capa nuclear interna (CNI) y disminución significativa en el número de CGR de la capa ganglionar (CCG). El procesamiento de las imágenes

histológicas mostró una diferencia significativa ($***p<0,001$) en la supervivencia de CGR de las retinas tratadas con GLUT-BSO respecto al control. Sin embargo, cuando se analizan los cortes histológicos de los ojos con el modelo DR inducido (GLUT-BSO) e inyectados con ME, se observa una reducción de las alteraciones estructurales de las capas de retina provocadas por la dosis de oxidantes con una mayor organización y ordenamiento en la configuración de todas las capas de retina. El análisis cuantitativo determinó un aumento en el porcentaje de supervivencia de CGR con valores similares al control (*Figura 3.5*). Estos resultados evidencian el efecto neuroprotector de ME demostrando ser capaz de reducir la toxicidad y proteger a las células del efecto deletéreo generado por la dosis de GLUT-BSO.

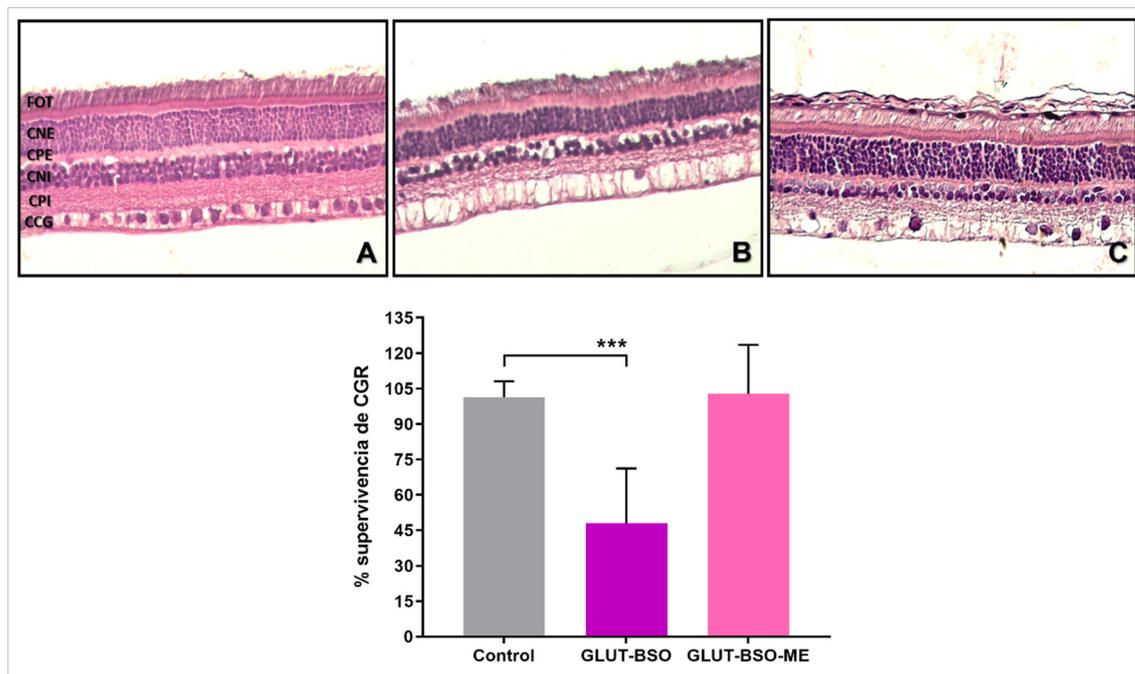


Figura 3.5. Evaluación histológica de la administración intravítrea de ME en retinas de conejos con modelo de DR inducido

Análisis comparativo de imágenes de microscopía óptica de retinas con tinción de hematoxilina/eosina, inyectadas vía intravítrea con (A) vehículo de NaCl 0,9% p/v (control), (B) BSO-GLUT y (C) BSO-GLUT + ME a los 9 días de tratamiento. Magnificación de la imagen: 20X. El gráfico de barras representa el análisis cuantitativo de la viabilidad de CGR post-tratamientos y se representan como la media \pm DE del porcentaje (%) de supervivencia celular. Los resultados fueron analizados por ANOVA, y las diferencias significativas ($***p<0,001$) se representan respecto al control. Abreviaturas: FOT: Fotorreceptoras. CNE: Capa Nuclear Externa. CPE: Capa Plexiforme Externa. CNI: Capa Nuclear Interna. CPI: Capa Plexiforme Interna. CCG: Capa de Células Ganglionares.

3.4.2.2.3. Detección in situ de apoptosis: técnica TUNEL

Se conoce que uno de los primeros eventos patológicos secundarios a la lesión ocular producidos por citotoxicidad, es el daño oxidativo y la generación de ROS, los cuales ocupan un papel importante en desencadenar la muerte de células neuronales (Carey *et al.*, 2011; Hare and Wheeler, 2009). Para poder inferir la cantidad o porcentaje

de CGR en estado apoptótico, se realizó una tinción inmunohistoquímica de tejidos de retina mediante técnica *TUNEL*.

Las imágenes fueron obtenidas por microscopía óptica y procesadas por el programa *Image J*. En los gráficos de barras de la *figura 3.6*, se muestran los resultados de la cuantificación de las imágenes, expresado en porcentaje de índice apoptótico (%IA) de las CGR de los animales expuestos al modelo de DR y tratados con ME con respecto al control (NaCl 0,9% p/v). Como se puede observar, la inducción del modelo DR (dosis GLUT-BSO) provocó un aumento significativo ($***p < 0,001$) en el porcentaje de CGR en estado de apoptosis con valores de $(63,5 \pm 3,7)$ %IA en comparación con los ojos control $(40,5 \pm 8,2)$ %IA. Sin embargo, los ojos con el modelo DR inducido y tratados con ME, no mostraron cambios significativos en la cantidad de CGRs apoptóticas $(37,7 \pm 6,2)$ %IA con respecto al control. Por tanto, se puede deducir que el estrés oxidativo y la citotoxicidad producidos por la administración de GLUT-BSO desencadenaron un aumento en la apoptosis de CGR, efecto que mostró ser revertido por la administración conjunta de ME (1 mg.mL^{-1}).

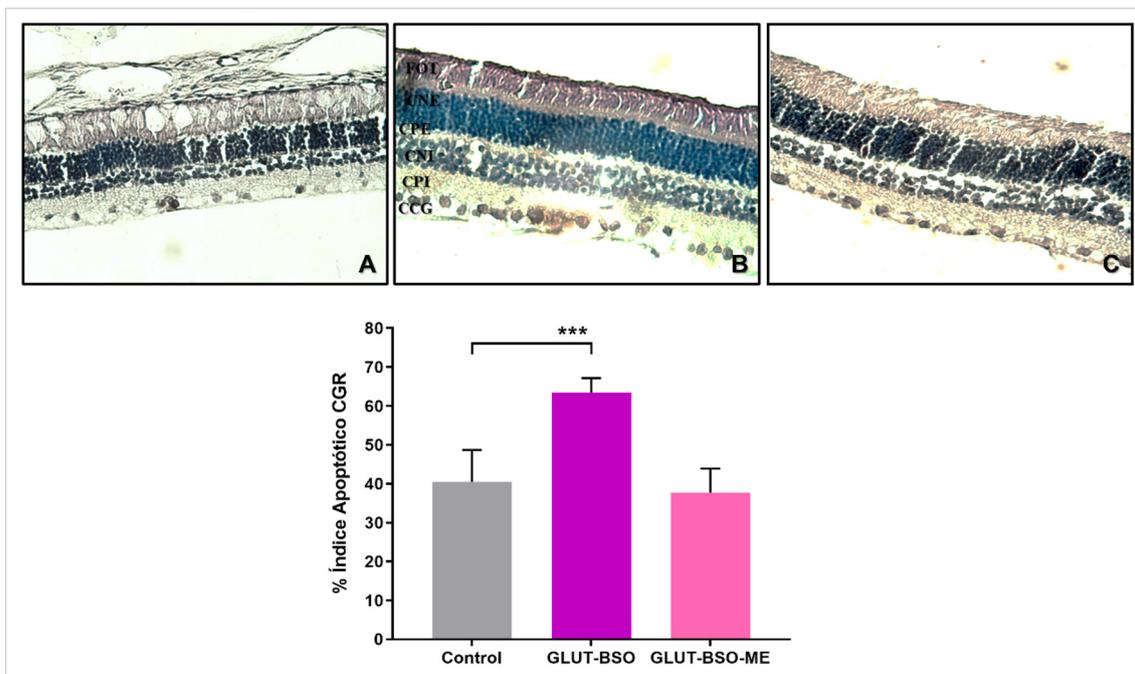


Figura 3.6. Evaluación del efecto antiapoptótico de ME en retinas de conejos con el modelo de DR inducido

Imágenes obtenidas por microscopía óptica de tejidos de retinas procesadas mediante técnica *TUNEL* para la detección *in situ* de muerte celular por apoptosis, inyectadas vía intravítrea con (A) vehículo NaCl 0,9% p/v (control), (B) GLUT-BSO y (C) GLUT-BSO-ME durante 9 días de tratamiento. Magnificación de la imagen: 20X. El gráfico de barras muestra el análisis cuantitativo de la proporción de CGR *TUNEL*-positivas y son representados como la media \pm DE del porcentaje de índice apoptótico (%IA). Los resultados fueron analizados por ANOVA, y las diferencias significativas ($***p < 0,001$) se representan respecto al control. Abreviaturas: FOT: Fotorreceptoras. CNE: Capa Nuclear Externa. CPE: Capa Plexiforme Externa. CNI: Capa Nuclear Interna. CPI: Capa Plexiforme Interna. CCG: Capa de Células Ganglionares.

3.4.2.2.4. Estudio morfológico de CGR por TEM

Con el fin de visualizar la ultraestructura celular de la retina y realizar un estudio morfológico post-tratamiento, principalmente de las células de la capa ganglionar, se examinaron cortes histológicos de tejido ocular por TEM. Este tipo de microscopía ha demostrado ser una herramienta importante para dilucidar la morfología en detalle de la ultraestructura celular, incluida la arquitectura interna (orgánulos subcelulares), mediante la obtención de micrografías electrónicas (Duranova *et al.*, 2020).

El análisis de las micrografías electrónicas de retina que se muestran en la *Figura 3.7*, revelaron que la estructura y morfología de la CCG de los ojos control se mantuvo normal al final de los experimentos (9 días). Todas las capas de la retina mostraron orgánulos celulares correctamente localizados, con tamaños y formas heterogéneas del retículo endoplásmico, ribosoma y mitocondrias. Asimismo, se observó una distribución normal de gránulos de lipofusina y estructuras subcelulares en forma de vacuola (*Figura 3.7.A*). Por el contrario, en los animales con el modelo DR inducido (dosis GLUT-BSO), se observaron orgánulos celulares desordenados, con ruptura en las membranas nuclear y plasmática, y pérdida en la integridad de las mitocondrias, principalmente en la CCG. Al analizar las CGRs, se detectaron cisternas irregulares del retículo endoplásmico alrededor del núcleo, con presencia de un gran número de fagosomas y vacuolas en un citoplasma agrandado (*Figura 3.7.B*), junto con una pérdida de continuidad en la membrana basal y un aumento del espacio interlaminar de la CCG (Deng *et al.*, 2013; Takir *et al.*, 2016; X. Wang *et al.*, 2014). En contraste con estos resultados, cuando se administró ME al modelo DR inducido, se observó que las CGRs portaban una estructura ligeramente normal con pequeñas alteraciones morfológicas, presencia de un número reducido de fagosomas y vacuolas en citoplasma, acompañadas de un aumento del espacio interlaminar de la CCG (*Figura 3.7.C*). Consecuentemente, se puede asumir que el proceso de degeneración y muerte de células neuronales de retina causado por la administración de agentes oxidantes, es disminuido por la acción antioxidante de ME.

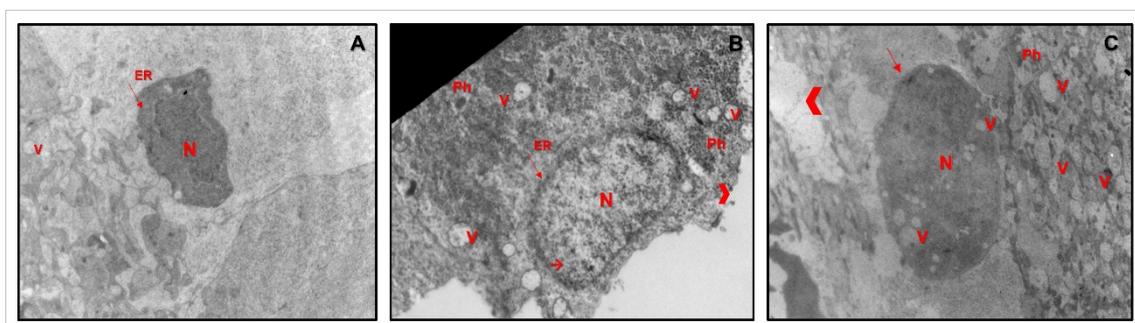


Figura 3.7. Evaluación de la ultraestructura de CGR determinada por microscopía electrónica. Micrografías obtenidas por TEM de tejidos de retina a 9 días de tratamiento con (A) vehículo NaCl 0,9% p/v (control); magnificación: X6000, (B) GLUT-BSO; magnificación: X10000 y (C) BSO-GLUT-ME; magnificación: X6000. Referencias: > Discos de membrana disueltos; V: Vacuola; N: núcleo; Ph: fagosoma; → Células en apoptosis; → retículo endoplásmico.

3.6. DISCUSIÓN

El diseño de un modelo experimental capaz de generar información confiable que pueda ser interpretada y relacionada con eventos que ocurren *in vivo*, es una estrategia utilizada comúnmente en la primera etapa de investigación en el campo de la neuroprotección de diferentes patologías degenerativas oculares, como el glaucoma. Relacionado con esto, el desarrollo de nuevas farmacoterapias oculares enfocados en la neuroprotección, capaces de preservar las células oculares de la agresión y el daño generado por compuestos oxidantes y citotóxicos, es un avance importante en el desarrollo de tratamientos a largo plazo para las neuropatías ópticas (Ban *et al.*, 2017; Subramaniam *et al.*, 2020).

Los modelos científicos experimentales se utilizan para comprender los mecanismos de acción farmacológicos/toxicológicos y obtener una descripción más completa de los eventos, a menudo a nivel molecular, para establecer el modo de respuesta de una entidad biológica ante la presencia de un fármaco o químico (Grant, 2019). Hasta la fecha, se han cultivado con éxito varias líneas de células oculares, lo que genera una alternativa rentable y más ecológicamente aceptable que los modelos animales para el estudio *in vitro* de los eventos patológicos que desencadenan la lesión de células neuronales y posterior muerte por apoptosis y, a su vez, la investigación de los mecanismos de neuroprotección (Hare and Wheeler, 2009). Los cultivos celulares tienen la ventaja de permitir el cribado rápido de posibles terapias y la observación de sus efectos directos, bajo un estricto control ambiental. Además, proporcionan mayor comprensión de cómo actúan las sustancias y los mecanismos que desencadenan a nivel celular (Wilcox and Bruner, 1990).

Este capítulo de tesis, se centra principalmente en evaluar los efectos citotóxicos sinérgicos a nivel ocular de la combinación de los agentes oxidantes BSO-GLUT, así como el efecto neuroprotector de ME sobre las células de retina, principalmente sobre CGR. En el primer caso, el principal mecanismo por el cual la combinación de GLUT-BSO causó toxicidad celular en cultivos primarios de CGR se debió al estrés oxidativo, proceso en el cual existe un desequilibrio entre la generación y eliminación de ROS y NOS, capaces de inducir daños al ADN, producir una modificación oxidativa de proteínas y generar una disfunción celular que resulta en muerte células neuronales (Tezel, 2006). Se conoce que un exceso de GLUT extracelular puede ser tóxico para las neuronas al causar excitotoxicidad, mecanismo que provoca la entrada de Ca^{2+} a las células, producción de grandes cantidades de óxido nítrico y generación de radicales libres, los cuales desencadenan la muerte de CGRs por apoptosis (Aoun *et al.*, 2003).

Sin embargo, dado que la viabilidad de las CGRs no se ve afectada sólo por GLUT (Harper *et al.*, 2009), es probable que la reducción en la supervivencia celular sea causada por la combinación de ambos oxidantes GLUT-BSO y se deba, principalmente, a un proceso de estrés oxidativo. Asimismo, algunos estudios han demostrado que BSO

provoca una reducción en la biosíntesis de GSH, y que el GLUT extracelular puede potenciar esta acción al reducir la disponibilidad de cisteína como precursor de la síntesis de GSH (Griffith, 1999). La disponibilidad de cisteína es, por tanto, un factor limitante en la velocidad de síntesis de GSH, un importante antioxidante intracelular (Izzotti *et al.*, 2006). El aumento de ROS causado por la administración conjunta de GLUT-BSO resultó en una reducción de la supervivencia de CGR, mediado por un proceso de muerte celular por destrucción del ADN, mecanismo que concuerda con la apoptosis observada en los estudios de inmunohistoquímica por técnica *TUNEL*.

Por otra parte, se utilizó el mecanismo de daño celular generado por los efectos oxidativos y citotóxicos de la combinación de agentes oxidantes seleccionados, para evaluar el efecto neuroprotector de ME. Esta molécula es una hormona que actúa como agente de sincronización circadiana efectiva materno-fetal y en ritmos circadianos disociados inducidos por ciclos cortos de luz-oscuridad, insomnio y desfase horario (M. Escribano *et al.*, 2014; Siu *et al.*, 2006; Veneroso and Russel, 2013). Además, se ha demostrado que ME es una molécula antioxidante y antiinflamatoria, capaz de mitigar el daño celular asociado con el estrés oxidativo y los procesos de inflamación que subyacen a los trastornos neurodegenerativos (Fischer and Hardkop, 2013). Esto fue demostrado en el presente capítulo, cuando la administración conjunta de ME con la dosis de agentes oxidantes, indujo una inhibición o enlentecimiento del daño oxidativo y mecanismos de muerte celular por apoptosis. Diversos estudios postulan que ME y sus metabolitos actúan como agentes antioxidantes por neutralización de radicales libres y especies oxidativas tóxicas. Asimismo, ME estimula la activación de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa (Carpentieri *et al.*, 2014; Esparza and Nogue, 2005; Kotler *et al.*, 2007) y suprime las enzimas prooxidantes como la óxido nítrico sintasa (Coto-montes, 2005; Fischer and Hardkop, 2012).

En función de lo expuesto, es posible que ME pueda activar la enzima responsable de la síntesis de GSH haciendo más efectivo el proceso antioxidante y también podrían activarse otros procesos involucrados en dicho mecanismo, contrarrestando en ambos casos la acción oxidante de BSO. Reiter y cols. reportaron que ME ha sido capaz de proteger las mitocondrias contra las amenazas oxidativas y mejorar la función respiratoria y en consecuencia reducir la fuga de electrones y aumentar la generación de ATP, tanto *in vivo* como *in vitro* (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2007; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2011). Este efecto podría explicar la acción antiapoptótica de ME observada sobre las CGRs en los estudios de viabilidad celular *in vitro*.

Hasta el momento, mediante estudios *in vitro* se evaluó la respuesta en CGRs aisladas, mantenidas en un entorno artificial, tanto de los mecanismos citotóxicos de la dosis de oxidantes como el efecto neuroprotector de ME. En línea con estos resultados y con el objetivo de evaluar su comportamiento *in vivo*, se propone el desarrollo de un modelo animal a partir de las dosis de oxidantes evaluadas en los estudios de cultivo

celular. Inicialmente, se realizaron estudios de toxicidad ocular de diferentes concentraciones de GLUT-BSO para determinar la dosis adecuada para la inducción del modelo animal *in vivo*. Mediante estudios electrofisiológicos e histopatológicos, se consideró que la menor concentración de oxidantes (200 μ M GLUT-75 μ M BSO) es la dosis adecuada para inducir un modelo *in vivo* de degeneración retiniana, debido a que genera una toxicidad ocular progresiva con una disminución en la viabilidad de CGR, manteniendo la configuración estructural de la retina.

El siguiente paso, fue evaluar el efecto terapéutico *in vivo* de ME mediante la administración conjunta con la dosis de oxidantes. Los efectos funcionales de los diferentes tratamientos sobre las células de retina, principalmente sobre fotorreceptores, se examinaron mediante electrorretinografía. Los registros de ERG obtenidos no mostraron cambios significativos tanto para las dosis de GLUT-BSO como para GLUT-BSO-ME con respecto al control (NaCl 0,9%), no observándose variaciones en la funcionalidad de la retina frente a cada tratamiento. En comparación con nuestro estudio, se ha informado de una disfunción de estas células en retinas de conejos, con un rápido aumento de la presión intraocular por encima de 60 mmHg (Feghali *et al.*, 1991). Sin embargo, Gerstle y cols. en 1973, demostraron en respuestas ERG que la amplitud de la *onda-b* disminuye sólo si la PIO excede un nivel crítico de 30 mmHg (Gerstle *et al.*, 1973). En nuestro modelo experimental, el daño celular inducido por la dosis de oxidantes, no produjo ningún aumento de la PIO por encima de los valores normales durante los 9 días de tratamiento.

Sin embargo, según el análisis histológico e inmunohistoquímico por técnica *TUNEL*, la administración de GLUT-BSO provocó una disminución significativa ($p < 0,001$) en la supervivencia de CGR y un aumento significativo ($p < 0,001$) de la muerte celular por apoptosis, con alteraciones en la configuración estructural de la retina a los 9 días de tratamiento. No obstante, este efecto se mostró revertido con la administración de ME, con porcentaje de viabilidad celular similares al control y una disminución en los %IA de CGR. Además, la configuración estructural y espesores de las diferentes capas de retina se encontraban sin alteraciones similares al control.

Los resultados fueron constatados mediante microscopía TEM, la cual permite observar las alteraciones ultraestructurales a nivel celular. En los ojos tratados con la dosis de GLUT-BSO, se observaron cambios morfológicos importantes en las CGRs con presencia de gran cantidad de vacuolas y orgánulos desorganizados con citoplasmas y membranas plasmáticas degeneradas en comparación con el control. En cambio, estos efectos fueron revertidos en los tejidos tratados adicionalmente con ME, se observaron ligeras alteraciones morfológicas a nivel celular, con presencia reducida de macrófagos y vacuolas. Ante los efectos observados se confirmaría que, tanto las alteraciones observadas a nivel celular como la disminución en la viabilidad de las CGRs, serían producidas por el estrés oxidativo y consecuente daño celular generados por la dosis de

oxidantes. Este proceso se ve revertido cuando se administra conjuntamente ME, constatando su efecto antioxidante y antiapoptótico sobre las CGRs.

En nuestro estudio, las pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*, se basan en fenómenos de estrés oxidativo e implican la producción endógena de ROS al exponer las células a altas concentraciones de GLUT en combinación con BSO, un inhibidor de la biosíntesis de GSH. Esta combinación dio como resultado un agotamiento de GSH y, en consecuencia, un aumento gradual de ROS. Por tanto, es predecible que este tipo de procesos oxidativos se observen en el desarrollo de neuropatías degenerativas como el glaucoma y, en consecuencia, se podría esperar que la administración de ME logre un efecto neuroprotector observable tanto, en estudios *in vitro* como *in vivo*, para el tratamiento farmacológico de este tipo de patologías. En resumen, el efecto neuroprotector de ME revelado en tejidos o células sometidas a un potente proceso oxidativo convierte a este compuesto en una herramienta muy prometedora para el tratamiento de neuropatologías oculares que impliquen graves efectos deletéreos sobre el órgano afectado.

3.7. CONCLUSIONES PARCIALES

En línea con lo expuesto y considerando el desafío que implica el desarrollo de nuevas farmacoterapias en el área de la neuroprotección a nivel ocular y la evaluación de la eficacia terapéutica en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, los objetivos de este capítulo de tesis fueron cumplimentados satisfactoriamente. En función de los resultados obtenidos, se pueden establecer las siguientes conclusiones parciales:

- Se obtuvo un modelo de degeneración retiniana mediante la administración conjunta de los agentes oxidantes GLUT-BSO en concentraciones evaluadas tanto en estudios *in vitro* en cultivos primarios de CGR como así también, en estudios *in vivo* en conejos *New Zealand*.
- La dosis combinada de GLUT-BSO produce citotoxicidad y estrés oxidativo en las células de retina, desencadenando la muerte celular por apoptosis, principalmente de las CGRs. El desarrollo de este modelo de daño oxidativo permitió obtener una mejor comprensión a nivel molecular de la muerte de CGR inducida por estrés oxidativo.
- La administración de ME en concentraciones de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, tanto en cultivos de CGR como en conejos sometidos al modelo de DR, demostró un efecto neuroprotector y antioxidante sobre las CGRs con resultados prometedores como aumento en la viabilidad celular, efectos antiapoptóticos y mejoras morfológicas en la ultraestructura de la retina.

Este capítulo de tesis, expone a ME como potencial candidato para nuevas farmacoterapias de neuroprotección en patologías degenerativas de retina, como el glaucoma, teniendo como principal objetivo la prevención del daño celular y

consecuente pérdida de la visión. Este tratamiento podría ser una nueva perspectiva al aplicarse como terapia combinada con fármacos hipotensores en la farmacoterapia del glaucoma.

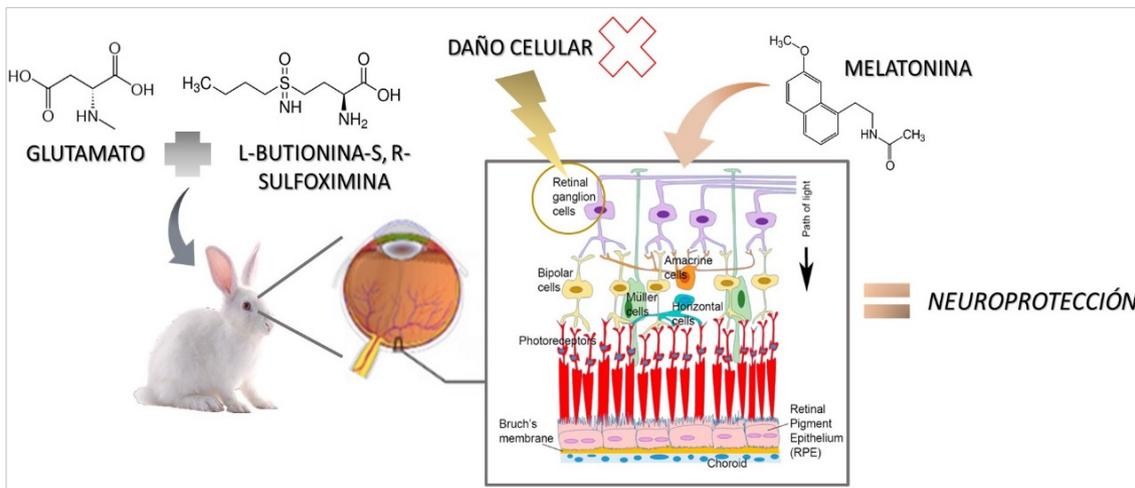
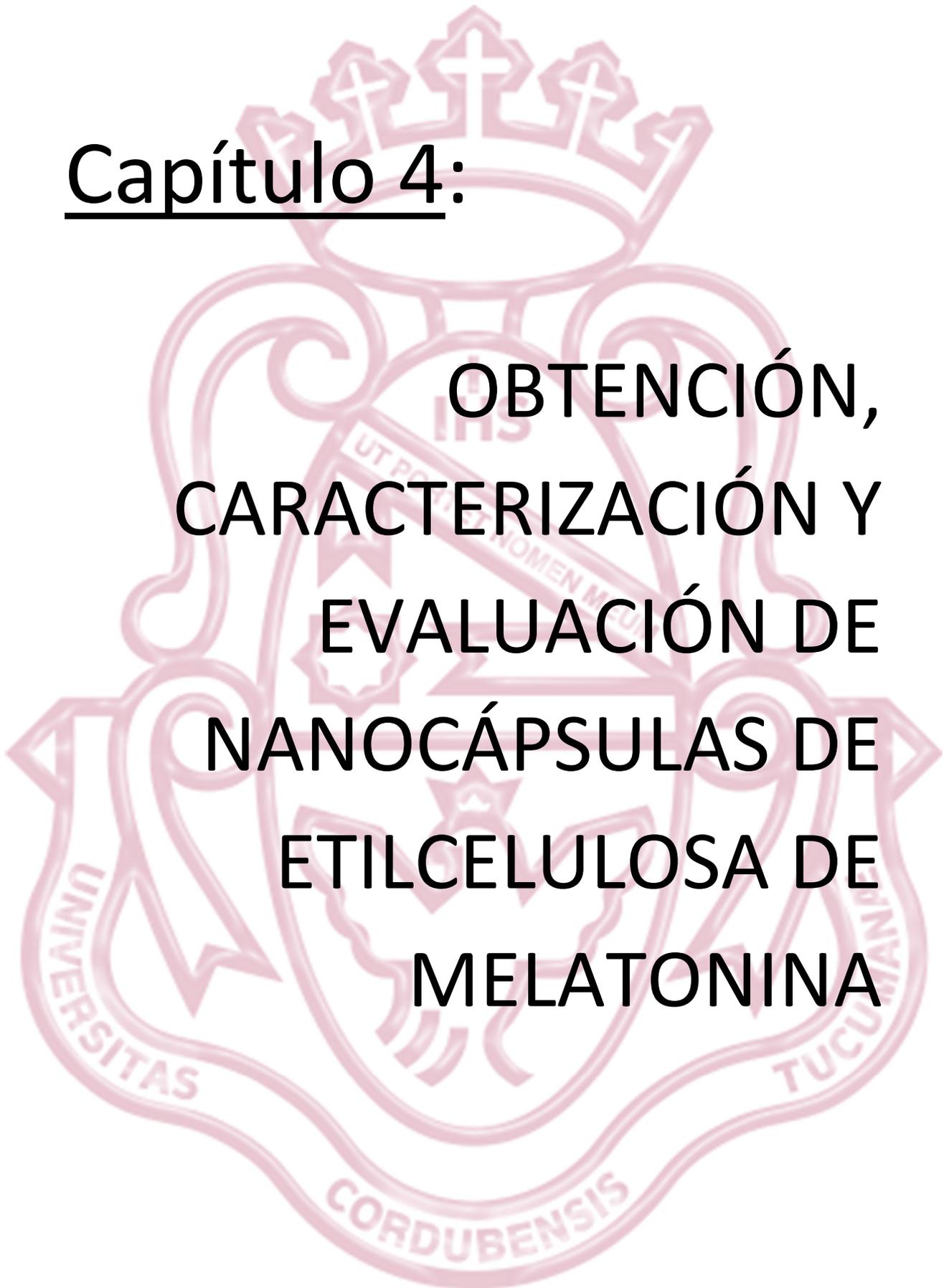


Imagen resumen de los resultados obtenidos en el **Capítulo 3** mediante la obtención y evaluación *in vivo* de un modelo animal de degeneración retiniana (DR) en conejos.

Capítulo 4:

OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOCÁPSULAS DE ETILCELULOSA DE MELATONINA



CAPÍTULO 4: Obtención, caracterización y evaluación de nanocápsulas de etilcelulosa de melatonina

4.1. INTRODUCCIÓN

El glaucoma se considera una patología ocular neurodegenerativa con síntomas variados, que se caracteriza principalmente por una degeneración y pérdida de CGR y sus axones, daño estructural progresivo en el nervio óptico y adelgazamiento de las fibras nerviosas de la retina (*Figura 4.1*), lo que desencadena una neuropatía óptica acompañada de la pérdida progresiva del campo visual (Nuschke *et al.*, 2015a; Tian *et al.*, 2015), como se describió previamente en el *Capítulo 2*. La PIO elevada, el bloqueo o reducción del flujo sanguíneo hacia la retina, desencadenan una cascada perjudicial de fenómenos implicados en el daño de las CGRs, como despolarización neuronal, sobrecarga de calcio, estrés oxidativo y alteración de la homeostasis del glutamato (Morrone *et al.*, 2015). Varios estudios han manifestado la participación del estrés oxidativo como un componente común en la neurodegeneración glaucomatosa, principalmente en la pérdida de CGR (Tezel, 2006).

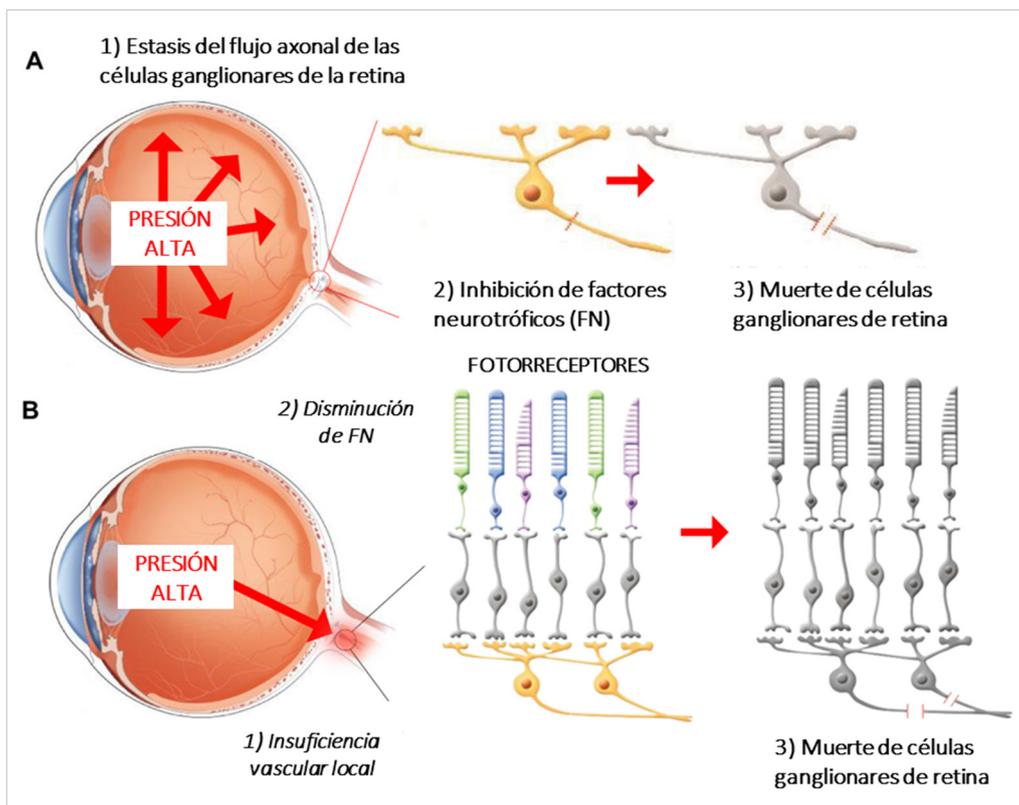


Figura 4.1. Mecanismos principales de daño estructural progresivo en el nervio óptico y de las fibras nerviosas de la retina. **(A)** Elevación de la PIO y **(B)** deficiencia vascular resultante que induce la degeneración y muerte de las células ganglionares de retina (CGR). (Ilustración adaptada de la publicación de Kwon y cols. (Kwon *et al.*, 2020)).

Actualmente, la reducción de la PIO es la única terapia clínica disponible para el tratamiento del glaucoma (Chidlow *et al.*, 2007). Sin embargo, se evidencia cada vez más que esta farmacoterapia puede resultar insuficiente para prevenir la pérdida visual en algunos pacientes glaucomatosos (Naik *et al.*, 2020). Asimismo, teniendo en cuenta que el glaucoma es una afección que involucra no sólo un incremento de la PIO, sino también factores de riesgo independientes responsables de la progresión de la enfermedad, existe la necesidad de nuevas terapias alternativas. El enfoque de nuevas farmacoterapias para el tratamiento del glaucoma se centra en la administración exógena de agentes antioxidantes con el objetivo de ralentizar la progresión de la enfermedad. Su administración puede ayudar a prevenir, dificultar o incluso revertir la muerte de las células neuronales sea cual sea la lesión primaria, promoviendo la neuroprotección de CGR y las neuronas involucradas en la función visual (Levin *et al.*, 2017; Morrone *et al.*, 2015; Nuschke *et al.*, 2015b)

La melatonina (ME) o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal, mediadora de ritmos biológicos y fisiológicos en mamíferos (Wang *et al.*, 2021). Dentro de la retina, se sintetizan pequeñas cantidades de ME que actúan como un neuromodulador autocrino o paracrino, regulando la fisiología circadiana local, como se describe en el *Capítulo 3* (McGoogan and Cassone, 1999). En este contexto, se ha detectado en humor acuoso niveles más elevados de ME durante la noche, siguiendo un ritmo circadiano notablemente similar a los ritmos de PIO y flujo acuoso en conejos (Liu and Dacus, 1991; Yu *et al.*, 1990). Diversos estudios han propuesto que el ritmo circadiano de la PIO puede ser regulado por esta neurohormona (George C.Y. Chiou and Marsha A. McLaughlin, 1984; Saniples *et al.*, 2000). Además, se ha informado que ME, una molécula altamente lipofílica, puede participar en funciones pleiotrópicas no mediadas por este receptor.

Como se menciona en el capítulo anterior, existe evidencia experimental sólida de la actividad de ME como un potente antioxidante y eliminador de radicales libres, que protege al segmento externo del fotorreceptor y otras células oculares del daño oxidativo inducido por la luz (Lundmark *et al.*, 2006; Reiter *et al.*, 1995). Diversos metabolitos que se generan cuando ME inactiva los reactivos tóxicos son, en sí mismos, captadores directos de radicales libres, aumentando enormemente la eficacia de la protección contra el daño oxidativo (Pandi-perumal *et al.*, 2010). Se ha demostrado que ME es capaz de generar un efecto neuroprotector sobre las CGRs de la peroxidación lipídica y prevenir el daño oxidativo retiniano inducido por isquemia y/o reperfusión (Siu *et al.*, 2006). Diferentes modelos experimentales –como los modelos de desprendimiento de retina, retinopatía diabética y glaucoma– han demostrado que la administración exógena de ME por vía sistémica o intravítrea actúa como agente neuroprotector, previniendo los daños a nivel del nervio óptico y protegiendo a las CGRs de la degeneración y muerte celular por apoptosis (Baltmr *et al.*, 2010; Belforte *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2005). En base a lo expuesto, se propone a ME como un candidato

interesante por sus propiedades antioxidantes y antiapoptóticas en terapias de neuroprotección ante el avance de enfermedades neurodegenerativas como el glaucoma (Hardeland and Pandi-Perumal, 2005; Lundmark *et al.*, 2006).

Patologías como el glaucoma, requieren de terapias crónicas a largo plazo y la principal estrategia de tratamiento es la administración tópica de medicamentos (Fagan and Al-Qureshi, 2013; Falavarjani and Nguyen, 2013). El ojo es un órgano impermeable que exhibe barreras anatómicas y fisiológicas naturales que conspiran contra la biodisponibilidad de distintos fármacos administrados por esta vía. Como se ha mencionado anteriormente, uno de los mayores problemas encontrados en la administración tópica es la pérdida rápida y extensiva de la formulación del área precorneal, en virtud del parpadeo, drenaje y recambio lagrimal. Asimismo, la córnea es una barrera altamente eficiente, que disminuye notablemente la penetración de fármacos administrados de manera tópica. Después de la instilación de la formulación oftálmica, el tiempo de contacto del medicamento con el área ocular es limitado sumado a la escasa permeabilidad de la córnea. Se estima que sólo el 1% o menos del fármaco activo es capaz de alcanzar las estructuras internas oculares (El Hoffy *et al.*, 2021; Gaudana *et al.*, 2010; Morrison and Khutoryanskiy, 2014). Estas limitaciones plantean la necesidad del desarrollo de nuevas plataformas farmacéuticas de administración ocular. El diseño de sistemas controlados de administración de fármacos, promete terapias mejoradas capaces de superar las barreras oculares, mejorar la biodisponibilidad abreviada de los fármacos y optimizar el efecto terapéutico en tratamientos de patologías oculares.

En los últimos años, se han desarrollado plataformas de liberación controlada de diferentes fármacos antioxidantes, como los factores neurotróficos –factor neurotrófico derivado de células de la glía (GDNF) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)–, ácido tauroursodesoxicólico y sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Checa-Casalengua *et al.*, 2011; Erisgin *et al.*, 2019; Fernández-Sánchez *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2007) de administración intraocular. Aunque se logró una reducción del daño sobre las CGRs, se observaron complicaciones asociadas a la administración intravítrea de fármacos, incluida la inflamación ocular y la PIO elevada. Recientemente, la entrega de antioxidantes a través de aplicaciones tópicas por diferentes plataformas tecnológicas, ha atraído mucha atención por ser una vía de administración no invasiva, versátil y con llegada al segmento posterior del ojo (Cheng *et al.*, 2019; Davis *et al.*, 2018).

Diferentes autores informan que la administración de ME podría ser beneficioso para el tratamiento del glaucoma, debido a que evidencia una reducción de PIO cuando es administrada de manera tópica (Hafner *et al.*, 2015; Leonardi *et al.*, 2015; Musumeci *et al.*, 2013; Romic *et al.*, 2015). Sin embargo, no se ha descrito ninguna evidencia de un efecto farmacológico sobre el polo posterior ocular.

En este sentido, las nanopartículas sólidas poliméricas (NSP) son una de las estrategias tecnológicas que se utilizan para mejorar la absorción de fármacos a través de las membranas biológicas. Durante las últimas décadas, las NSP han sido ampliamente investigadas en el área farmacéutica como plataformas de liberación de principios activos, debido a que pueden mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y el direccionamiento de fármacos a un sitio blanco (Battaglia *et al.*, 2012; Nagarwal *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente, en estos sistemas el fármaco puede disolverse, encapsularse o unirse a la matriz y según el método de preparación, se pueden subdividir en dos tipos de estructuras: nanoesferas y nanocápsulas (Chevalier *et al.*, 2015). Las nanoesferas son sistemas matriciales, en los que el fármaco se dispersa física y uniformemente, mientras que las nanocápsulas poseen una organización vesicular formada por un núcleo interno líquido (lipófilo o hidrófilo) rodeado por una membrana polimérica. En estos sistemas, el fármaco puede quedar confinado o disuelto en la cavidad interna o ser adsorbido sobre la superficie de la nanopartícula (Anton *et al.*, 2008; Letchford and Burt, 2007; Mora-Huertas *et al.*, 2010).

En el caso de ME, por su naturaleza lipófila, se favorece la internalización del fármaco en el núcleo oleoso de las nanocápsulas. Los polímeros biocompatibles y biodegradables tienen un rol importante en cuanto a la seguridad, estabilidad y eficacia de las nanopartículas para la administración de fármacos oculares. La etilcelulosa (EC) es un biomaterial polimérico derivado de celulosa, de naturaleza hidrófoba, ampliamente utilizado por la industria farmacéutica y biomédica por sus propiedades mucoadhesivas y de liberación controlada (Adeleke, 2019; Colorcon, 2021). Ha sido extensivamente estudiado como material matricial para la obtención de micro y nanopartículas, mostrando resultados promisorios para ser administrado por distintas vías. Posee propiedades favorables y prometedoras para la vía oftálmica, ya que es un polímero biocompatible, capaz de ser retenido en la superficie ocular y liberar el fármaco de manera sostenida (Lokhande *et al.*, 2013).

Estudios previos del grupo de investigación, Quinteros y cols. han reportado el desarrollo de nanocápsulas formadas por un núcleo lipídico de triglicéridos de cadena media recubierto de una membrana polimérica de EC, y cargadas con acetazolamida, un fármaco inhibidor de la anhidrasa carbónica con efecto hipotensor a nivel ocular (Quinteros *et al.*, 2016). Posterior a su administración ocular, las nanopartículas de EC mostraron propiedades mucoadhesivas que permitieron un contacto estrecho del fármaco con la superficie de la córnea, facilitando su penetración hacia las estructuras internas oculares. En consecuencia, se observó una gran cantidad de fármaco permeado, una mayor reducción de PIO y una larga duración de los efectos terapéuticos. En este contexto, las NSP constituyen una estrategia tecnológica prometedora como sistemas portadores de fármacos, capaces de superar las barreras biológicas oculares y lograr efectos farmacológicos en el segmento posterior del ojo. Este último requisito se vuelve crucial ante el avance de patologías crónicas neurodegenerativas, como el glaucoma,

donde el efecto terapéutico depende exclusivamente del alcance y biodisponibilidad del fármaco en las estructuras internas oculares.

Ante las necesidades planteadas, se propone desarrollar una plataforma tecnológica de administración tópica de ME, capaz de alcanzar las estructuras internas oculares y lograr así, un mecanismo de protección antioxidante eficiente sobre las estructuras internas oculares, principalmente de las CGRs. Esto permitiría un tratamiento focalizado en ralentizar o frenar el avance de patologías neurodegenerativas como el glaucoma.

En base a lo expuesto, se plantea como **hipótesis de trabajo** la vehiculización de ME en nanocápsulas de etilcelulosa (NCEC), en procura de modular su liberación y optimizar los tratamientos asociados a este fármaco. Se espera que estos sistemas portadores administrados de manera tópica, aumenten el tiempo de residencia de ME sobre la superficie ocular, faciliten su permeación y logren incrementar su biodisponibilidad en el segmento posterior del ojo. Por consiguiente, el **objetivo principal** de este capítulo consistió en obtener, caracterizar y evaluar NCEC cargadas con ME (NCECMEs)

Los estudios experimentales in vivo de evaluación del efecto terapéutico e irritación ocular se realizaron en colaboración con el Dr. José D. Luna y Dra. Marilyn A. Márquez, médicos oftalmólogos del área de Cirugía de Vítreo y Retina, Centro Privado de Ojos Romagosa S.A. y Fundación VER (Córdoba, Argentina)

4.2. MATERIALES

4.2.1. Melatonina y excipientes

ME (N-acetil-5-metoxitriptamina) con una pureza del 98% fue adquirido en Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos). Las NCEC son sistemas vesiculares compuestos por un núcleo lipídico recubiertos de una membrana polimérica, obtenidas mediante deposición interfacial de polímeros preformados (Fessi *et al.*, 1989).

El núcleo lipídico está constituido por triglicéridos de cadena media (MCT, por sus siglas en inglés) de ácido caprílico y cáprico, de nombre comercial Miglyol 821®. Es una clase de lípidos que se caracteriza por tener tres ácidos grasos (6 a 12 átomos de carbono) unidas al glicerol (Kaiser, 1971). El mismo fue adquirido en Etilfarma S.A. (Buenos Aires, Argentina).

La cubierta polimérica que rodea al núcleo lipídico, está compuesta por EC (PM=90-110 mPa.s) un polisacárido lineal derivado de celulosa, conocido con el nombre comercial ETHOCEL™. El mismo posee una estructura polimérica que se basa en la estructura repetitiva del anillo de β -anhidroglucosa con tres grupos funcionales hidroxilo

reactivo (*Figura 4.2*). Es un material polimérico altamente compatible y aceptable a nivel mundial, son candidatos ideales para aplicaciones farmacéuticas, alimentarias y de cuidado personal (Adeleke, 2019). El producto fue obsequiado por Colorcon® (Buenos Aires, Argentina).

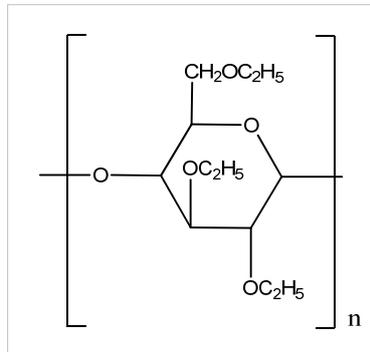


Figura 4.2. Unidad química repetitiva de Etilcelulosa

Como agentes estabilizantes, se utilizaron tensioactivos no iónicos como monoestearato de sorbitán (Span 60®) y polisorbato 80 (Tween 80®). El tensioactivo lipofílico, Span 60®, está formado por mezclas de ésteres parciales de sorbitol y su mono y dianhídrido con ácido estéarico. Tween 80®, surfactante hidrófilo, está formado por ésteres del polioxietileno sorbitano (sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con 4, 5, o 20 moles de óxido de etileno) parcialmente esterificados con ácidos grasos superiores (Rowe et al., 2009). Span 60® y Tween 80® fueron adquiridos en Resikem S.A. (Buenos Aires, Argentina) y TodoDroga® (Córdoba, Argentina), respectivamente.

En los estudios *in vivo*, para el desarrollo del modelo animal se utilizaron dosis combinadas de GLUT y BSO (Bessone *et al.*, 2019), los cuales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos). Previo a su administración, se disolvieron en una solución de cloruro de sodio Parafarm® en una concentración al 0,9% p/v, adquirido en Saporiti (S.A.C.I.F.I.A., Buenos Aires, Argentina). Para evaluar la viabilidad de las CGRs, se utilizó un kit de detección de muerte celular *in situ* (TUNEL, por sus siglas en inglés "terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling") provisto por Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos). Los reactivos de estudios histológicos e inmunohistoquímicos, fueron comprados en Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos) y Parafarm® (Saporiti S.A.C.I.F.I.A., Buenos Aires, Argentina).

4.3. ANIMALES

Para los experimentos *in vivo*, se utilizaron conejos hembra *New Zealand* de 2 a 2,5 kg. Los animales se mantuvieron en estrictas condiciones de animalario, con ambiente controlado de luz/oscuridad con ciclos de 12/12 h en jaulas individuales con libre acceso a alimento y agua. Para el desarrollo de los estudios *in vivo*, se procedió según la metodología detallada en el apartado "3.2.2. Animales" del Capítulo 3.

4.4. METODOLOGÍA

4.4.1. Obtención de las suspensiones de nanocápsulas

Las NCECME se obtuvieron por deposición interfacial de polímeros preformados mediante un método de emulsificación- evaporación (Fessi *et al.*, 1989), comúnmente utilizado para la preparación de NSP con buenos resultados en la encapsulación de fármacos hidrofóbicos (J. Llabot *et al.*, 2008). Esta técnica se puede dividir en tres pasos:

Paso uno: Inicialmente, se disuelve en una solución de etanol, el polímero EC, ME, tensioactivo lipófilo (Span 60[®]) y MCT (fase oleosa), mediante agitación mecánica y sonicación (ultrasonido) a temperatura constante de 40°C. Este procedimiento se realizó en ciclos intercalados de 15 min, hasta lograr una homogeneización completa (60 min).

Paso dos: La fase oleosa obtenida en el primer paso, se incorpora lentamente a una dispersión acuosa de Tween 80[®] mediante agitación magnética durante 10 min a 40°C. Es muy importante destacar, que ambas fases deben mantenerse a igual temperatura para evitar formación de agregados y/o precipitados en la emulsión obtenida.

Paso tres: Para la formación de las nanocápsulas, el etanol es eliminado de la emulsión por evaporación. Para ello, se utiliza un evaporador rotatorio a presión reducida (modelo RE-100D, Phoenix instrument, Garbsen, Alemania) hasta alcanzar el volumen final de la formulación.

La *figura 4.3* esquematiza el método completo del proceso de obtención de las NCECME.

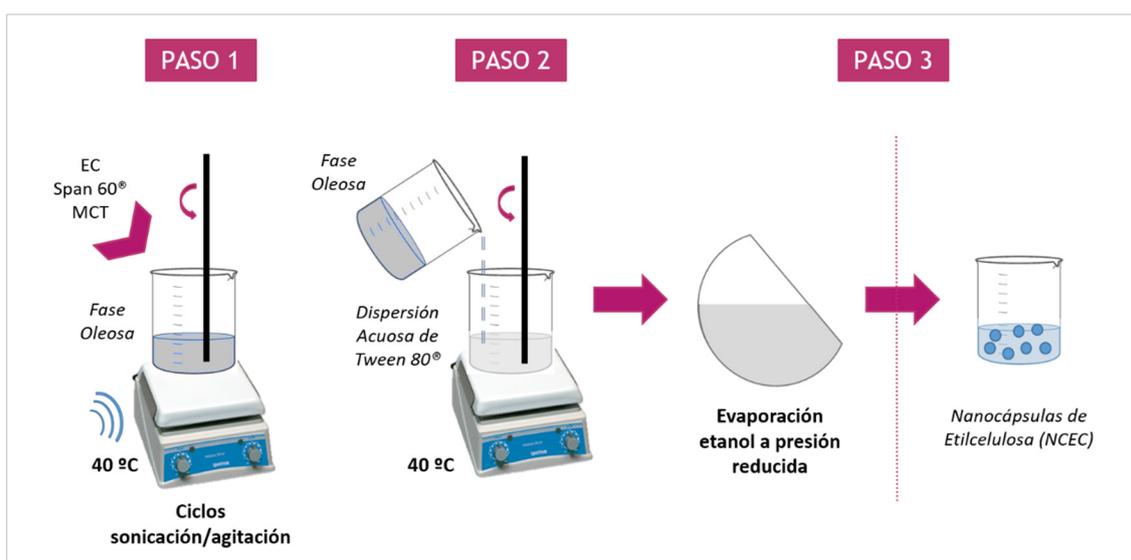


Figura 4.3. Método de emulsificación- evaporación para la obtención de NCECMEs

La respuesta a la dosis se evaluó en nanocápsulas con concentraciones de ME 1 mg.mL⁻¹ (NCECME 1) y 2 mg.mL⁻¹ (NCECME 2). Como control, se prepararon

nanocápsulas blanco sin ME (NCEC). La *tabla 4.1*, muestra la composición cuantitativa de todas las formulaciones evaluadas.

Tabla 4.1. Composición cuantitativa de las suspensiones de nanocápsulas blanco (NCEC), cargadas con ME 1 mg.mL⁻¹ (NCECME 1) y 2 mg.mL⁻¹ (NCECME 2).

<i> Materiales</i>	<i> NCEC</i>	<i> NCECME 1</i>	<i> NCECME 2</i>
<i>Fase acuosa</i>			
<i>Tween 80 (g)</i>	0,077	0,077	0,077
<i>Water (mL)</i>	53	53	53
<i>Fase oleosa</i>			
<i>EC (g)</i>	0,100	0,100	0,100
<i>ME (g)</i>	-	0,010	0,020
<i>MCT (mL)</i>	0,330	0,330	0,330
<i>Span 60 (g)</i>	0,077	0,077	0,077
<i>Ethanol (mL)</i>	27	27	27

*EC: Etilcelulosa; ME: melatonina; MCT: Triglicéridos de cadena media.

4.4.2. Caracterización NCECMEs

4.4.2.1. Estudios de Tamaño de Partícula, Índice de Polidispersidad y Potencial Electrocinético

Se realizó espectroscopia de correlación fotónica y microelectroforesis para determinar los valores de TMP, IP y PZ de las NCECMEs, utilizando un equipo Delsa™ Nano *Zeta Potential and Submicron Particle Size Analyzer* (Beckman Coulter, California, Estados Unidos).

Los diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas e IP se calcularon a partir de los valores de los coeficientes de difusión, utilizando el método "*Cumulants*" descrito en el apartado "*2.3.2.1. Mediciones de tamaño de partícula y potencial electrocinético*" del capítulo 2, provisto en este caso por el software *Delsa™ Nano UI Software v2.20* (Beckman Coulter, California, Estados Unidos).

Todas las mediciones se realizaron en un ángulo de dispersión de 165°, utilizando un láser de diodo a una longitud de onda de 658 nm y temperatura constante de 25°C, de modo que el instrumento pueda optimizar automáticamente la intensidad de la señal de la muestra. Las muestras fueron diluidas en agua ultrapura, en una relación 1:500 para ajustar el nivel de señal, y analizadas por triplicado (n = 3).

4.4.2.2. pH y Osmolaridad

Ambos parámetros fueron determinados según la metodología detallada en el apartado "*2.3.2.2. Osmolaridad y pH*" del capítulo 2.

4.4.2.3. Contenido de ME y Eficiencia de Encapsulación

La cuantificación de ME en las NCECME, se determinó utilizando la técnica de espectroscopia ultravioleta visible (UV-visible), que permite la caracterización de soluciones a determinadas longitudes de onda de radiación, en la región ultravioleta, donde absorbe la molécula de interés dependiendo el medio en el cual se encuentra.

Para el análisis de las muestras, se utilizó un equipo de espectrofotometría UV-visible *ThermoScientific™ Evolution™ 300* (Fisher Scientific SL, Madrid, España) a una longitud de onda de 278 nm. Las mediciones se realizaron siguiendo la ley de *Lambert Beer*, que responde a la siguiente ecuación (*ecuación 4.1*):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Ec. 4.1

Donde *A* es la Absorbancia, ϵ es el Coeficiente de extinción (característico de cada sustancia), *l* es el espesor de la cubeta (cm) y *c* es la concentración (moles.L⁻¹). Previa cuantificación de las muestras, se prepararon curvas de calibrado a partir de una solución madre de ME de concentración 1,722 x 10⁻³ M, de la cual se realizaron diluciones sucesivas tanto en etanol como en PBS. Cada punto se efectuó por triplicado, lo que permitió obtener una óptima regresión lineal con valores de R²: 0,9976 y 0,9967, respectivamente.

Para obtener el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Por un lado, se determinó el contenido total de ME presente en las nanocápsulas mediante la disolución de una alícuota de NCECME 1 y 2 en metanol con agitación magnética, y posterior cuantificación por espectroscopia UV-Vis. En un segundo paso, para obtener la cantidad de fármaco libre, se coloca una alícuota de las muestras de NCECMEs en un dispositivo de filtrado centrífugo Ultra-15 de 10,000 MWCO (Amicon® y Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y por ultrafiltración/centrifugación a 10.000 RCF durante 15 min a 7-8°C se separa de las nanoestructuras y se cuantifica por espectroscopia UV. Todas las muestras se analizaron por triplicado (n=3). El valor %EE se calculó según se describe en el apartado "2.3.2.6. Contenido de fármaco y eficiencia de encapsulación" del capítulo 2.

4.4.2.4. Microscopía Electrónica de Barrido

Las imágenes de las diferentes concentraciones de las NCECME, fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB). El microscopio electrónico de barrido 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).

Para que una muestra pueda analizarse por MEB, debe cumplir con dos requisitos fundamentales: por un lado, debe estar completamente seca, ya que las moléculas de agua que permanezcan en la muestra ocasionarían daños en el microscopio; por otro lado, debe ser conductora de electrones, motivo por el cual suelen ser metalizadas con una delgada lámina de paladio-platino.

Para el estudio morfológico, se depositó una gota (aprox. 2 μL) de cada dispersión de NCECMEs sobre una hoja de cobre que recubre un pocillo de aluminio, se secó a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Posteriormente, se recubrieron con una capa de oro-paladio empleando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica (PELCO Modelo 3). Las fotografías MEB se obtuvieron a partir de un microscopio digital (ZEISS, Oberkochen, Alemania). La magnificación seleccionada permitió observar en detalle la morfología de las muestras.

4.4.2.5. Estudios de Estabilidad del Sistema Coloidal

La estabilidad coloidal de las diferentes NCECMEs obtenidas fue evaluada durante un período de 30 días. Las muestras se almacenaron en viales de vidrio color ámbar, cerrados, en una cabina termostatazada con control de humedad a 25°C.

Para cada sistema evaluado, se determinó contenido de fármaco, pH, tamaño de partícula, PZ y %EE en diferentes períodos de tiempo: 0, 7, 15 y 30 días. Cada medición se analizó por triplicado ($n=3$). A cada tiempo medido, las formulaciones fueron analizadas por espectroscopia UV-Vis y se compararon con el contenido inicial de ME.

4.4.3. Ensayos de Liberación *in vitro* de ME

La liberación *in vitro* de ME desde las nanocápsulas, fue evaluada mediante una técnica de diálisis utilizando membranas semipermeables de celulosa con tamaños de poros de 12 KDa MWCO (Sigma Aldrich®, St. Louis, Estados Unidos).

Para el ensayo, se utilizaron celdas de difusión de Franz modificadas de acrílico (Quinteros et al., 2016). Estas celdas están formadas por un compartimento con el medio donador (1 mL) donde se depositó la formulación a evaluar y otro con el medio receptor (4 mL) que contenía una solución de PBS (pH=6,8). La membrana de celulosa de acetato semipermeable se colocó entre ambos compartimentos (*figura 4.4*). El estudio se realizó a temperatura controlada ($35,0 \pm 0,5$) °C con permanente oxigenación y burbujeo (mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2), con el objetivo de mantener una agitación constante del medio. A determinados intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de 1 mL del medio receptor y se reemplazaron con el mismo volumen de medio fresco. La concentración de ME liberada se determinó mediante espectroscopia UV-Vis (278 nm).

Se evaluaron los perfiles de liberación de los sistemas nanométricos NCECME 1 y 2 y se compararon con una solución de ME en NaCl al 0,9% p/v de concentración 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sol. ME). Cada ensayo fue realizado por triplicado manteniendo las condiciones

de sumidero, tal como se describe en el inciso "2.3.3. Estudios de liberación in vitro de LN" del capítulo 2.

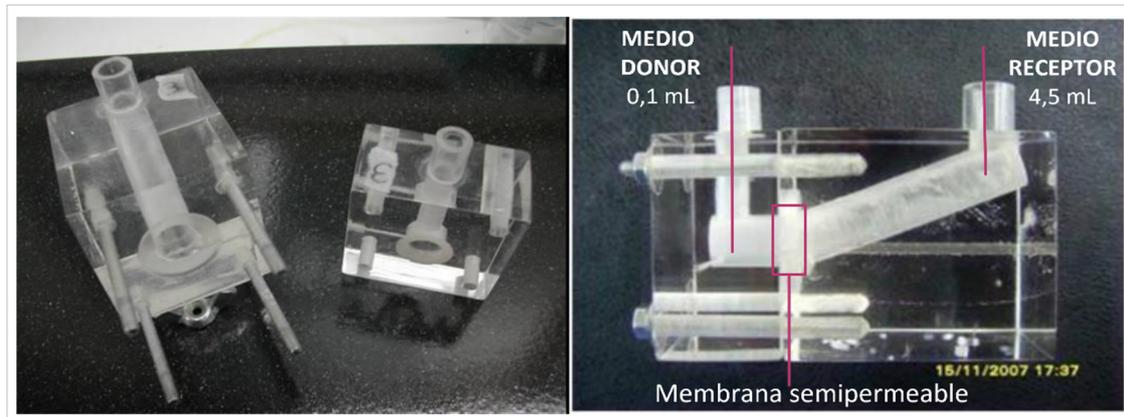


Figura 4.4. Celdas de difusión de Franz modificadas (celdas bicompartimentales). Izquierda: celda desmontada en dos compartimentos; Derecha: celda ensamblada.

El análisis de los datos fue realizado acorde al modelado matemático semiempírico desarrollado por *Korsmeyer y cols.* (Korsmeyer et al., 1983), a partir del cual puede determinarse la velocidad de liberación del fármaco desde el sistema polimérico mediante la siguiente ecuación (ecuación 4.2):

$$\frac{F_t}{F_\infty} = -[e^{-k.t}]$$

Ec 4.2

Donde F_t es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t , F_∞ es la concentración inicial del fármaco contenido en el sistema y k es la constante de velocidad aparente de la cinética de liberación. Asimismo, se realizó una aproximación de los mecanismos de liberación de ME desde NCECMEs que predominan durante el proceso (Korsmeyer and Peppas, 1981; Lee, 1985), ajustando los datos experimentales mediante la siguiente ecuación (ecuación 4.3):

$$f_t = \frac{F_t}{F_\infty} = a.t^n$$

Ec 4.3

Donde f_t es la relación de la cantidad absoluta de fármaco acumulado liberado en un tiempo t y que, en el tiempo infinito, a es una constante (que incorpora características estructurales y geométricas del portador), y n es el exponente de liberación, indicativo del mecanismo de liberación del fármaco. A partir del cálculo del coeficiente n , este modelo desarrollado para matrices poliméricas, propone:

a) sí $n=1$ 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) sí $n=0,5$ (o se halla entre 0,45 y 0,55), la velocidad de liberación se aproxima o es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo. Esto seguiría una cinética fickiana, donde la liberación estaría controlada por la difusión del fármaco a través de la matriz;

c) sí $n: 0,55 < n < 1$ la velocidad de liberación va depender de los procesos de difusión y relajación, conociéndose como liberación no fickiana o anómala (Samaha et al., 2009).

El ajuste de los perfiles de liberación se realizó utilizando el software Kaleidagraph V4 (Synergy Software Reading, Pensilvania, Estados Unidos). La selección del modelo se basó en el mejor coeficiente de correlación.

4.4.4. Ensayos *ex vivo* de Permeación Transcorneal

Se realizaron estudios de permeabilidad transcorneal en NCECME de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, con el fin de concentrar la máxima cantidad de fármaco, y se compararon con Sol. ME como control. Debido a la baja solubilidad del fármaco, no se lograron soluciones de ME en concentraciones más altas.

En este ensayo, se utilizaron celdas bicompartimentales similares a las detalladas en las *Sección 4.3.3*, con la diferencia que entre ambos compartimentos se colocó una córnea con un anillo de esclerótica de 2 mm. La misma fue incorporada con el endotelio corneal en dirección a la solución receptora (PBS, 4 mL), mientras que el lado epitelial estaba en contacto con el medio donador que contenía la formulación a evaluar (1 mL). La temperatura en la cámara de difusión se mantuvo constante ($35,0 \pm 0,5$) °C mediante un baño de agua termostatzado. El área disponible para la permeación en la celda era de $0,785 \text{ cm}^2$.

Para la extracción de las córneas, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina $0,75 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Ketamina $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Holliday Scott S.A., México) y xilacina $0,25 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Xilacina $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Laboratorios Richmond S.A., Buenos Aires, Argentina) previo a la eutanasia. Posteriormente, los animales se sacrificaron con una mezcla de 10% de O_2 y 90% de CO_2 en una cámara de acrílico cerrado herméticamente. Las córneas se extrajeron con un remanente escleral de 2 mm.

Se retiraron muestras de la cámara receptora a los 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 min, y se sustituyeron inmediatamente por el mismo volumen de medio fresco previamente aireado. Posteriormente, se filtraron a través de una membrana microporosa de $0,45 \mu\text{m}$ y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis por espectroscopia UV-Vis. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se mantuvieron las condiciones de sumidero.

El análisis de regresión lineal de los datos de difusión obtenidos, permitió el cálculo de los siguientes parámetros:

- Flujo en estado estacionario (J): $\Delta Q/\Delta t$. Donde Q es la cantidad de ME difundida a través de la córnea en el tiempo t.
- Coeficiente 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 absorción del fármaco. Es el tiempo necesario para saturar la córnea con el fármaco y llegar al compartimento receptor. Se calculó a partir de la intersección de las líneas de regresión con el eje x.

4.4.5. Estudios *in vivo*

4.4.5.1. Administración Tópica de NCECME en Modelo Animal de Degeneración Retiniana

Para evaluar la eficacia terapéutica de ME, se realizaron estudios *in vivo* en un modelo animal de degeneración retiniana (DR). Este modelo fue desarrollado en conejos mediante la administración intravítrea de una única dosis de GLUT y BSO, según el procedimiento descrito previamente en el *capítulo 3*. Para estas condiciones experimentales, se aplicaron tres formulaciones tópicas de ME: NCECMEs a diferentes concentraciones ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y Sol. ME $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Como control, se utilizó una solución de NaCl 0,9% p/v y una suspensión de NCEC blanco. Previo a la intervención, se realizó la ambientación de los animales por manipulación de los mismos.

El tratamiento fue administrado de manera tópica en ambos ojos de los animales sin sedación, a los que previamente se les había inducido el modelo de DR. Cada formulación se aplicó en una dosis de 50 μL con un régimen de aplicación cada 2 horas por 8 horas/día durante un período de 9 días. Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados de acuerdo con los protocolos establecidos, para posterior evaluación histológica e inmunohistoquímica de los tejidos oculares. Este procedimiento se aplicó en todos los experimentos *in vivo*.

4.4.5.2. Evaluación de Irritación Ocular: Prueba de *Draize* Modificada

Para evaluar la potencial irritación y daño ocular causado por las formulaciones desarrolladas se empleó una versión ligeramente modificada de la prueba de *Draize* (J. H. Draize *et al.*, 1944; Tártara *et al.*, 2012). La principal modificación con respecto al método original fue la utilización de una lámpara de hendidura HIS-5000 (SL-14, Kowa, Torrance, California, Estados Unidos), que permitió evaluar microlesiones corneales y conjuntivales mediante un examen biométrico con la previa instilación de fluoresceína sódica 0,25% p/v (Laboratorios Poen S.A.C.I.F.I., Buenos Aires, Argentina). Las valoraciones clínicas se realizaron en grupos de 3 conejos para cada formulación propuesta (n=6 ojos).

Las evaluaciones clínicas pre y post exposición, fueron efectuadas en párpados, conjuntiva, córnea e iris, por un médico oftalmólogo mediante observación externa con iluminación adecuada. El puntaje de irritación o daño del tejido ocular fue calculado para cada observación, al día 0 previo a la inducción del modelo de DR y 9 días posteriores a la aplicación tópica de las formulaciones a evaluar (*tabla 4.2*). A partir del puntaje obtenido se determinó la gravedad de la lesión (*tabla 4.3*). Para la administración tópica, se consideran farmacéuticamente aceptables aquellas formulaciones que presenten puntajes de irritación inferiores al 20%.

Tabla 4.2. Evaluación clínica de irritación ocular (Tártara et al., 2012).

Prueba de irritación ocular*	
Clasificación por área ocular	Ojo
Lesión ocular	Puntaje
Opacidad de la Córnea	
Sin opacidad ni queratitis	0
Opacidad o queratitis difusa, detalles del iris claramente visible	1
Áreas translúcidas fácilmente discernibles, detalles del iris ligeramente oscurecido	2
Áreas opalescentes, no hay detalles visibles del iris, tamaño de la pupila apenas discernible	3
Córnea opaca, iris no discernible	4
Área corneal involucrada	
Un cuarto (o menos) pero no cero	1
Mayor a un cuarto y menos que un medio	2
Mayor que un medio y menos que tres cuartos	3
Mayor que tres cuartos hasta toda el área	4
Iris	
Normal (cámara limpia)	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	1
Enrojecimiento difuso, vasos sanguíneos no fácilmente discernibles	2
Ojo rojo	3
Quemosis	4
Puntaje Total	20 puntos (100%)

*Examen clínico biométrico con lámpara de hendidura realizado mediante la prueba de Draize modificada. Se muestran las áreas y características oculares evaluadas con las puntuaciones correspondientes realizadas en ambos ojos.

Tabla 4.3. Gravedad de la lesión según el puntaje obtenido de la tabla 4.2.

Valor puntaje	Efectos de la Formulación
0% – 8%	No irritación
9% – 20%	Irritación media
21% – 40%	Irritación media a moderada
41% – 60%	Irritación moderada
61% – 80%	Lesión severa
81% – 100%	Lesión muy severa

4.4.5.3. Tomografía de Coherencia Óptica

La tomografía de coherencia óptica (OCT, por sus siglas en inglés "*Optic Coherence Tomography*") es un procedimiento de diagnóstico por imagen que se utiliza para visualizar de forma no invasiva los segmentos anterior y posterior del ojo a alta resolución. Una ventaja significativa de esta técnica es que permite objetivamente la adquisición de datos cuantificables del tejido ocular tanto de forma transversal como longitudinal, y permitir su comparación con un control (Ban *et al.*, 2017).

Con la finalidad de examinar la estructura interna de la retina *in situ* y en tiempo real, antes y después de la administración tópica de las formulaciones, se utilizó un equipo *Heidelberg Spectralis SD-OCT* (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania). El dispositivo se ajustó a una longitud de onda de 820 nm, el cual proporciona 40.000 escaneos por segundo y una resolución axial de 3,4 mm. Al mismo tiempo, se realizó un examen de las capas retinianas más profundas mediante escaneos infrarrojo proporcionados por el instrumento. De esta forma, el equipo proporciona una herramienta auxiliar para identificar cambios en la retina.

Para garantizar una alta calidad de estudio y reducción de ruido, se utilizó un sistema de seguimiento ocular y técnica de promedio, que consta de 50 marcos promediados de imágenes OCT de alta resolución, ambos proporcionados por el programa del equipo *SPECTRALIS software* (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania). Las mediciones del grosor de la retina se efectuaron por un oftalmólogo experto, mediante la implementación de un modelo de calibre integrado al software. Para todos los tratamientos, se realizaron 25 cortes a 500 micrones por debajo del nervio óptico en la región central. El grosor de la retina se midió desde la señal hiper-reflectiva anterior a la membrana limitante interna, y a partir de la señal hiper-reflectiva posterior al epitelio pigmentario de la retina.

El estudio de OCT se llevó a cabo en dos etapas: previo a la inducción del modelo DR y a los 9 días de la administración tópica de los tratamientos propuestos. Con el fin

de mejorar las observaciones oculares, se instiló una gota de Fenilefrina 5%/tropicamida 0,5%, para lograr un efecto midriático (Fotorretin[®], Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina) y una gota de hidrocloreuro de proparacaína al 0,5%, como anestésico local (Anestalcon[®], Laboratorios Alcon, Texas, Estados Unidos) en ambos ojos antes de iniciar el ensayo. Para una medición correcta de los parámetros oculares, durante el estudio se elevaron suavemente los párpados superior e inferior del ojo a evaluar, exponiendo la conjuntiva palpebral lo más perpendicular posible a la línea de visión del observador (mirando hacia al frente). Los escaneos se repitieron hasta obtener una imagen de calidad suficiente.

4.4.5.4. Estudios Farmacocinéticos. Cuantificación de la Concentración Efectiva de ME en Humor Acuoso

El objetivo del estudio farmacocinético es estudiar la presencia de ME en humor acuoso posterior a la administración tópica de las formulaciones. Para tal fin, se llevaron a cabo una serie de pasos que se detallan a continuación:

- **Extracción de humor acuoso**

Previo a la intervención, los conejos fueron sedados por administración intramuscular de una combinación de ketamina $0,75 \text{ mL.kg}^{-1}$ (dosis de 50 mg.mL^{-1}) y xilacina $0,25 \text{ mL.kg}^{-1}$ (dosis de 100 mg.mL^{-1}). Una vez anestesiados, se les colocó un blefarostato infantil (para mantener los párpados abiertos durante el estudio) y se administró, en cada ojo, una gota de clorhidrato de proparacaína al 0,5% como anestésico local. A modo de profilaxis, la zona ocular fue desinfectada con un hisopo embebido en una solución de iodopovidona al 4% (Pervinox[®], Laboratorio Elea Phoenix S.A., Buenos Aires, Argentina). Para la extracción de humor acuoso (HA) se utilizaron jeringas de tuberculina con agujas 30G y el volumen de cada muestra fue de $100 \mu\text{L}$. Al finalizar la extracción, se colocó una gota de antibiótico tobramicina Fotex[®] (Laboratorio Elea Phoenix S.A., Buenos Aires, Argentina) en cada ojo afectado.

La extracción de HA se efectuó al finalizar el tratamiento de 9 días con la administración tópica de las formulaciones NCECME 2 y Sol. ME. El estudio fue realizado por triplicado para cada formulación estudiada ($n=3$) y las muestras de HA se conservaron a -5°C hasta su análisis por HPLC de fluorescencia.

- **Desproteización de las muestras de HA**

Para su cuantificación, las muestras de HA se trataron previamente para eliminar las proteínas presentes del fluido biológico. Inicialmente, se añadieron $100 \mu\text{L}$ de metanol a $150 \mu\text{L}$ de HA, la mezcla se homogeneizó por agitación y centrifugó a 8000 rpm durante 10 min para la desproteización de las muestras. El sobrenadante se separó del precipitado (proteínas) y se analizó mediante HPLC de fluorescencia para la cuantificación de ME.

- **Cuantificación de ME**

La técnica de HPLC de fluorescencia utilizada para la cuantificación de ME, se adaptó de la antes descrita por Ahn J.H. y cols. (Ahn *et al.*, 2017). La cromatografía se realizó utilizando un sistema de HPLC Waters® (Waters Corp., Milford, Estados Unidos) acoplado a un detector de fluorescencia (Waters® 2475) y una columna C8 de fase reversa (Phenomenex® Luna 5 µm, 250 mm × 4,6 mm, 100 Å). La temperatura del horno se mantuvo a 25°C durante todo el estudio (calentador de columna Waters® 1500 Series). Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de metanol y agua, en una proporción de 60:40; con un caudal de flujo de 0,6 mL.min⁻¹ (bomba Waters® 1525). El volumen de inyección fue de 20 µL utilizando un inyector automático (Waters® 717 plus autosampler) y la detección de fluorescencia se realizó a $\lambda_{ex} = 286$ nm y $\lambda_{em} = 352$ nm. El método utilizando demostró ser lineal con concentraciones de hasta 1 µg.mL⁻¹ y un límite de detección <1 ng.mL⁻¹. La adquisición y el procesamiento de datos se realizó mediante el software Empower® (Waters Corp., Milford, Estados Unidos).

4.4.5.5. Estudios Histológicos. Examen Morfológico de la Córnea y Evaluación de Viabilidad Celular

A los 9 días del tratamiento tópico, los conejos se sacrificaron y sus globos oculares se enuclearon inmediatamente y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS para su conservación. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 95% y 100%), se diafanizaron en acetato de butilo y se embebieron en parafina. Se cortaron secciones de 8 µm de espesor a lo largo del meridiano vertical a través de la cabeza del nervio óptico y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

La digitalización de las imágenes se realizó utilizando un microscopio digital BX41 (Olympus®, OM Digital Solutions Corporation) con aumento 20X (Belforte et al., 2010; Foureaux et al., 2015; Kwok et al., 2005). Las imágenes histológicas se tomaron mediante una cámara de microscopía digital *Infinity 1-1M* (Teledyne Lumenera, Ottawa, Canadá) y se analizaron utilizando un programa de captura y procesamiento de imágenes *Infinity Analyze software* (Teledyne Lumenera, Ottawa, Canadá).

Con el fin de evaluar la viabilidad celular post-tratamiento, se cuantificaron las CGRs de las secciones histológicas de cada ojo tratado que contenían la extensión completa de la retina. Como soporte, se utilizó un programa de procesamiento de imágenes *Image J*® software (National Institutes of Health, Maryland, Estados Unidos). La supervivencia de las CGRs se determinó contabilizando varias secciones histológicas de los ojos control, hasta obtener una cantidad de 100 CGR. La misma cantidad de secciones histológicas, se contabilizó para el tratamiento a evaluar y se realizó una comparación estadística de los valores obtenidos. Asimismo, se valoraron los posibles efectos de los

tratamientos administrados sobre la estructura y la integridad de la córnea (Baydoun *et al.*, 2004).

4.4.5.6. Detección *in situ* de Apoptosis Celular

La detección inmunohistoquímica y cuantificación de apoptosis a nivel unicelular en tejidos, se llevó a cabo mediante un kit de detección de muerte celular *in situ*, basado en el marcaje de roturas de hebras de ADN por técnica *TUNEL* y su posterior análisis por microscopía. El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como se detalla en el capítulo anterior en la sección "3.3.2.5. Detección de apoptosis *in situ*: técnica *TUNEL*".

Para el análisis y obtención de las imágenes digitales, se utilizó un microscopio digital BX41 (Olympus[®], OM Digital Solutions Corporation) con aumento 20X, acoplado a una cámara de microscopía digital *Infinity 1-1M* (Teledyne Lumenera, Ottawa, Canadá). Todas las secciones se procesaron mediante el programa *Infinity Analyze software* (Teledyne Lumenera, Ottawa, Canadá) con la asistencia del software *Image J[®]*. Como control positivo, se utilizaron secciones de tejido de glándula mamaria de rata con apoptosis celular proporcionadas por el kit de detección. Para determinar la magnitud del efecto apoptótico, se cuantificaron las células positivas *TUNEL* (de color marrón) y se compararon con el total de células en la capa de CGR. Este resultado se expresó como porcentaje de índice apoptótico (% IA) (Yang *et al.*, 2010).

4.4.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos y su comparación entre grupos, se aplicó el método de la varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el programa InfoStat/L: Statistical Software (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Los valores de probabilidad con un valor de $p < 0,05$ o $p < 0,01$, según el estudio, se consideraron estadísticamente significativos.

4.5. RESULTADOS

4.5.1. Caracterización Fisicoquímica de NCECMEs

Las NCECMEs sintetizadas por el método de evaporación-emulsificación, mostraron una morfología esférica determinada por MEB, con bordes bien definidos, lo que supone ser una cubierta externa del polímero EC como se describe en bibliografía (J. M. Llabot *et al.*, 2008; Quinteros *et al.*, 2016). El tamaño de partícula de los sistemas portadores de fármacos, es un factor determinante que influye en la absorción o permeación de las formulaciones oftálmicas a través de las barreras oculares (Nagarwal *et al.*, 2009). Por ello, se llevaron a cabo estudios de DLS para evaluar la distribución del tamaño de las suspensiones de nanocápsulas con y sin ME. Como se observa en la *tabla 4.4*, todos los sistemas presentaron tamaños nanométricos, con un TMP entre 150 a 180 nm y valores de IP entre 0,092 a 0,200, lo que permitió inferir un tamaño poblacional

homogéneo de las formulaciones obtenidas. Los valores de PZ se encontraron en un rango de -25 y -30 mV, confiriéndole una alta estabilidad a la emulsión con mínima agregación en medio acuoso. Los rendimientos de encapsulación de ME fueron satisfactorios, con valores altos de %EE de 73% para NCECME 1 y 67% para NCECME 2.

Las formulaciones de aplicación ocular deben presentar adecuada isotonicidad y pH compatible con el fluido lagrimal. La osmolaridad del líquido lagrimal oscila entre 280 mOsm.kg⁻¹ y 293 mOsm.kg⁻¹ con un rango de pH entre 6,6 y 7,8. Cabe destacar que el fluido lagrimal tiene una cierta capacidad amortiguadora (Gaudana *et al.*, 2010; Saettone *et al.*, 1987). En nuestro estudio, el valor de pH para todas las dispersiones evaluadas fue ligeramente ácido con valores alrededor de 5,3. A pesar de no ser el pH óptimo para administración ocular, se espera que la instilación de las NCECMEs no produjera efectos secundarios significantes. Asimismo, todas las formulaciones de NCECMEs evaluadas presentaron valores de osmolaridad cercanos al de las lágrimas (288 – 320 mOsm.kg⁻¹). A continuación, en la *tabla 4.4* se detallan los valores de dichas propiedades fisicoquímicas correspondientes a los sistemas nanométricos evaluados.

Tabla 4.4. Propiedades fisicoquímicas de NCEC y NCECMEs.

Resumen de valores de pH, TMP, IP, PZ y %EE de las suspensiones de nanocápsulas obtenidas. Los resultados mostrados se midieron por triplicado y se presentan como media ± DE (n = 3).

Formulación	pH ± DE	TMP ± DE (nm)	IP ± DE	PZ ± DE (mV)	EE ± DE (%)	Osmolaridad ± DE (mOsm.kg ⁻¹)
NCEC	5,35 ± 0,02	157,8 ± 2,1	0,11 ± 0,01	-26,3 ± 0,7	-	288,5 ± 2,1
NCECME 1	5,32 ± 0,03	179,6 ± 1,8	0,20 ± 0,01	-30,5 ± 1,1	73,5 ± 3,8	301,0 ± 4,2
NCECME 2	5,21 ± 0,02	147,4 ± 1,6	0,09 ± 0,01	-30,6 ± 0,6	67,2 ± 6,4	324,0 ± 2,8
Sol. ME	7,34 ± 0,01	-	-	-	-	332,5 ± 0,7

La microestructura de las nanopartículas fue observada por MEB (*figura 4.5*), donde las imágenes mostraron consistencia con las características morfológicas de las nanocápsulas cargadas de fármaco y los parámetros determinados por los diámetros hidrodinámicos.

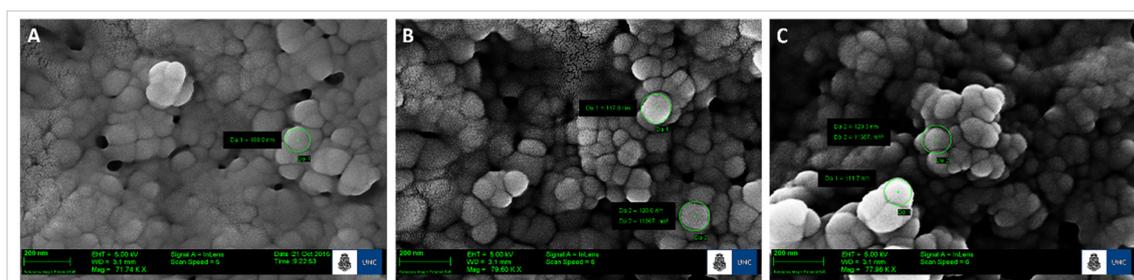


Figura 4.5. Micrografías de Nanocápsulas de Etilcelulosa obtenidas por MEB. Las imágenes muestran a (A) NCEC blanco, (B) NCECME 1, y (C) NCECME 2 (Escala de medición: 200 nm).

Además, se realizó un estudio de estabilidad coloidal de las nanocápsulas blanco y cargadas con ME para determinar si las características se modificaban en las condiciones de almacenamiento (25°C, protegidas de la luz) por un período de 30 días. Como se muestra en la *figura 4.6*, no se observaron variaciones significativas sobre los valores iniciales de TMP, IP, contenido de fármaco, %EE, PZ y pH en todos los tiempos evaluados.

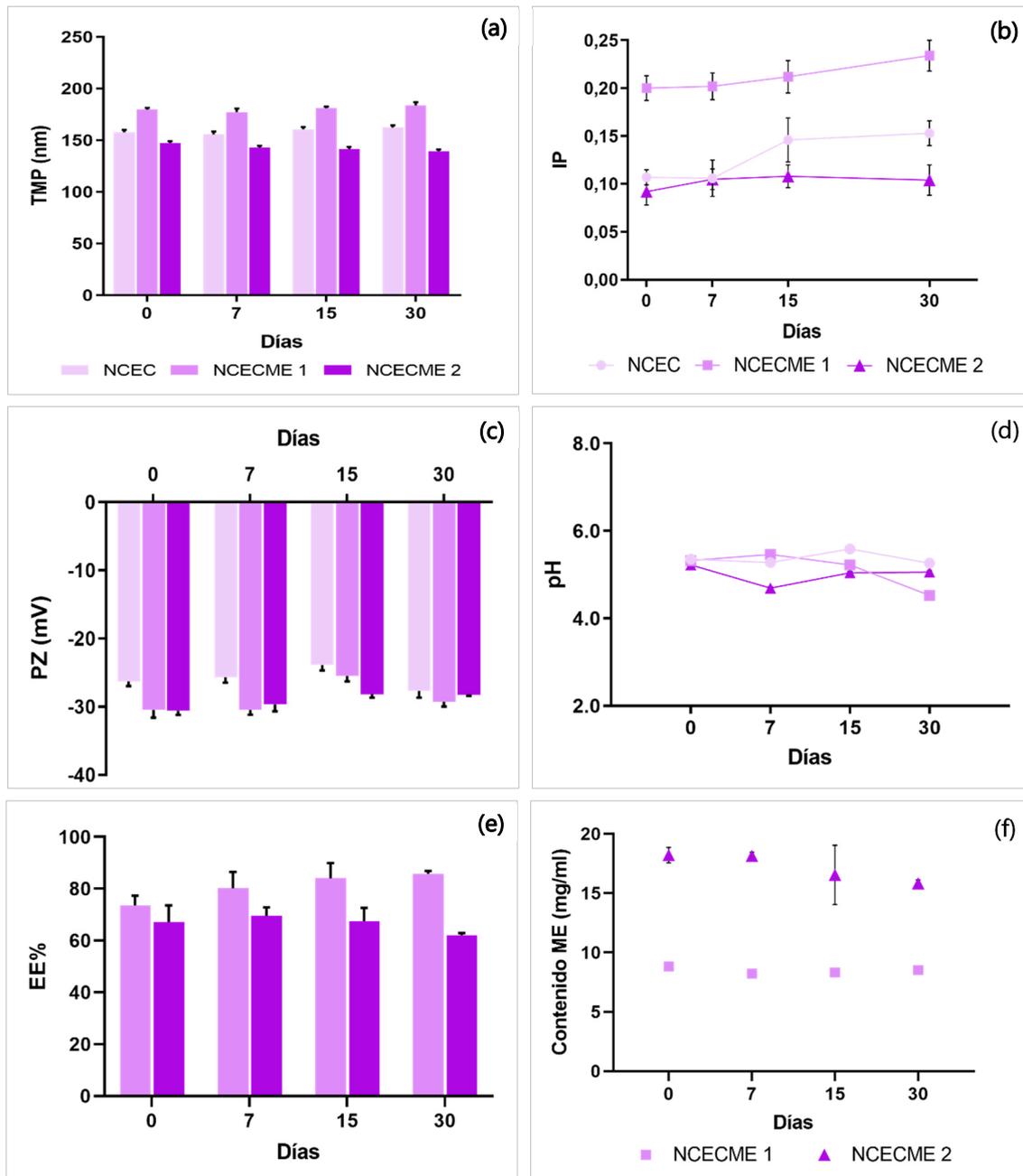


Figura 4.6. Estudios preliminares de estabilidad coloidal de nanocápsulas de etilcelulosa. Se representan las propiedades fisicoquímicas para NCEC, NCECME 1 y 2 evaluados en un período de 30 días. Los gráficos de barras muestran los valores correspondientes al (a) tamaño de partícula (TMP) en nanómetros (nm), (c) medidas de PZ y (e) valores de eficiencia de encapsulación en porcentaje (%EE); mientras que los gráficos de líneas representan los valores (b) de IP, (d) medidas de pH y (f) contenido total de ME en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a cada tiempo evaluado. Todas las mediciones fueron tomadas a temperatura ambiente. Valores expresados como (Media \pm DE, $n = 3$) para cada ensayo.

4.5.2. Ensayos *in vitro* y *ex vivo*: Estudios de Liberación y Permeación Transcorneal de ME desde las NCECMs

Los perfiles de liberación de los fármacos dependen de la naturaleza del sistema de administración. En el caso de las nanocápsulas (sistemas de administración de tipo reservorio), el núcleo lipídico se recubre de una membrana de polímero y la liberación se espera que sea por difusión del fármaco desde el núcleo a través de la capa polimérica (Chevalier *et al.*, 2015).

El estudio de liberación de las NCEC cargadas con ME se realizó durante 3,5 horas, en el cual se observó una modulación en la liberación del fármaco desde los sistemas nanométricos a las concentraciones evaluadas. La *Figura 4.7* muestra los perfiles de liberación de NCECME 1 y 2 en comparación con Sol. ME como control. A partir de los perfiles de liberación, se observó que Sol. ME mostró un aumento constante en la concentración de ME durante el tiempo de estudio, con un porcentaje de liberación de fármaco del 40% al finalizar el ensayo. Mientras que la concentración de ME liberada desde las nanocápsulas fue continua y estable en el tiempo, observándose un porcentaje de fármaco liberado alrededor del 20%. Este comportamiento demuestra la capacidad del sistema de modular la liberación del fármaco de manera sostenida y prolongada en el tiempo.

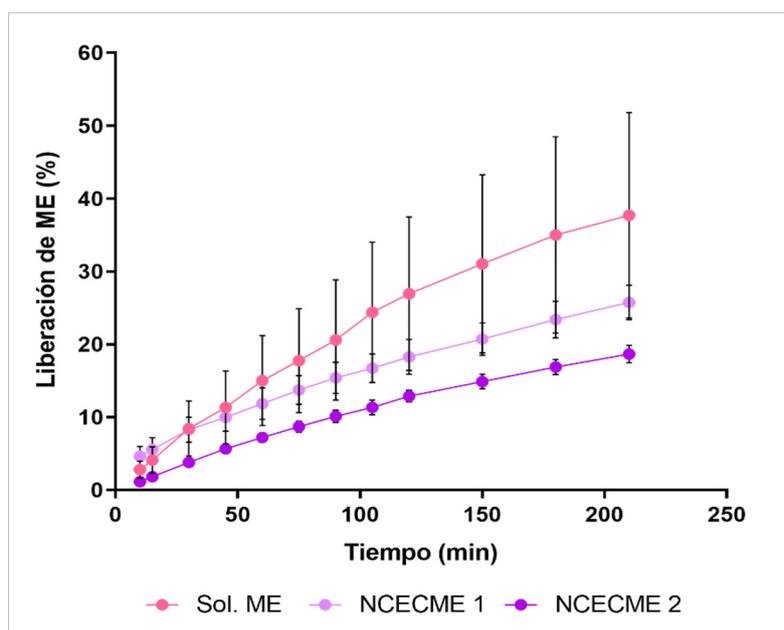


Figura 4.7. Liberación *in vitro* de ME.

El gráfico de líneas representa los perfiles de liberación de ME en PBS (pH=6,8) a 37°C, vehiculizado en las siguientes formulaciones: Sol. ME 1 mg.mL⁻¹, NCECME 1 y 2 mg.mL⁻¹. Los valores son expresados en porcentaje de ME (%) liberado y se representan como (Media ± SEM; n=3).

Posteriormente, se realizó el análisis de los datos mediante la aplicación de diferentes modelos matemáticos, con el fin de determinar el mecanismo por el cual el fármaco fue liberado desde los sistemas nanométricos. Los parámetros de ajuste

obtenidos permitieron predecir que las formulaciones de nanocápsulas sintetizadas (NCECME 1 y 2) siguieron un modelo de *Korsmeyer-Peppas* (Korsmeyer and Peppas, 1981). En la *tabla 4.5* se exhiben los datos obtenidos del análisis matemático. Estos resultados mostraron un comportamiento anómalo para NCECME 1 y 2, con un valor de *n* de 0,59 y 0,79, respectivamente. Cuando los valores de *n* se encuentran entre los valores 0,5 y 1, la liberación del fármaco va a depender de un compromiso entre procesos de difusión y relajación del polímero.

Tabla 4.5. Resumen de parámetros cinéticos calculados para estudios *in vitro* y *ex vivo*.
Evaluación de la cinética de liberación y permeabilidad transcorneal de ME desde NCECME 2-1 y Sol. ME. Los datos se muestran como media \pm DE (*n* = 4).

<i>Test</i>	<i>Formulaciones</i>	<i>NCECME 2</i>	<i>NCECME 1</i>	<i>Sol. ME</i>
Modelo Korsmeyer-Peppas				
<i>In vitro</i>	k (min⁻ⁿ)	7,15 \pm 0,15	12,12 \pm 0,09	15,03 \pm 0,37
	n	0,79 \pm 0,02	0,59 \pm 0,01	0,77 \pm 0,03
	R²	0,996	0,999	0,994
<i>Ex vivo</i>	k (min⁻ⁿ)	17,02 \pm 0,33	-	9,65 \pm 0,21
	n	0,37 \pm 0,03	-	0,46 \pm 0,04
	R²	0,967	-	0,969
Higuchi's Plot				
<i>In vitro</i>	k(min^{-1/2})	8,76 \pm 0,42	12,91 \pm 0,21	18,15 \pm 0,83
	R²	0,903	0,982	0,909
<i>Ex vivo</i>	k(min^{-1/2})	16,59 \pm 0,52	-	9,56 \pm 0,20
	R²	0,894	-	0,963
Zero-Order Plot				
<i>In vitro</i>	K(min)	5,93 \pm 0,18	8,53 \pm 0,49	12,25 \pm 0,41
	R²	0,961	0,793	0,951
<i>Ex vivo</i>	K(min)	13,51 \pm 1,43	-	7,88 \pm 0,67
	R²	0,132	-	0,419

Con respecto a la permeabilidad del epitelio corneal, cabe señalar que este tejido es la principal barrera frente a la absorción del fármaco en el ojo. Aunque la superficie corneal es más permeable que el estrato córneo, es relativamente impermeable en comparación con otros tejidos epiteliales por las estrechas uniones celulares que lo forman (Quinteros *et al.*, 2016). Para evaluar la capacidad de permeabilidad de ME desde los sistemas a través de dicha barrera, se seleccionó la formulación de mayor concentración (NCECME 2) para evitar un sacrificio excesivo de animales de experimentación. La *figura 4.8* muestra los perfiles de permeación de ME en PBS (pH=6,8) a 37°C, para la formulación de NCECME 2 en comparación con Sol. ME 1 mg.mL⁻¹ como control.

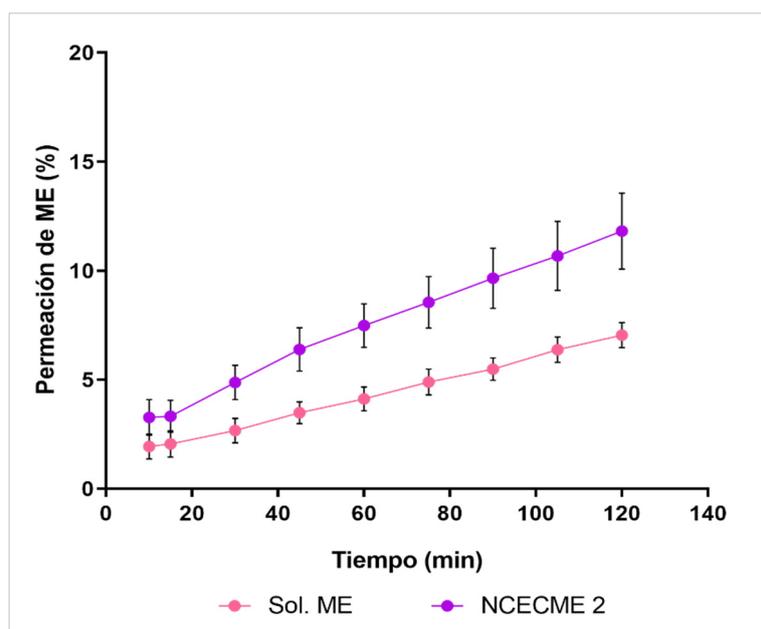


Figura 4.8. Permeación ex vivo de ME

El gráfico de líneas representa los perfiles de permeación de ME vehiculizadas en las siguientes formulaciones: Sol. ME 1 mg.mL⁻¹ y NCECME 2 mg.mL⁻¹. Los valores son expresados como (Media ± SEM; n=4).

A partir de los resultados del estudio de permeación, se obtuvieron los parámetros de flujo (*J*) y coeficiente de permeabilidad (*P_{app}*) para las NCECME 2 y los valores fueron comparados con la solución control (Sol. ME). Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual ME atraviesa la córnea, se analizan y comparan las tasas de difusión y permeación de ambas formulaciones evaluadas (tabla 4.6).

Tabla 4.6. Parámetros de permeación transcorneal.

Se muestran los resultados para las formulaciones NCECME 2 y la Sol. ME por triplicado con n=4. Los valores se presentan como media ± DE.

Formulación	Flujo de estado estacionario (<i>J</i>) (mg.min ⁻¹)	µg Permeados (Después de 2 h)	Coficiente de permeabilidad aparente (<i>P_{app}</i>) (cm.min ⁻¹) (× 10 ⁻⁴)
Sol. ME	0,52 ± 0,04	70,40 ± 1,14	6,59 ± 4,77
NCECME 2	1,18 ± 0,22	118,22 ± 0,19	9,41 ± 1,74

En contraste con los perfiles de liberación, la velocidad con la que el fármaco se libera de NCECME 2 y atraviesa la córnea, fue casi dos veces más rápida que la de Sol. ME. Asimismo, se observó un aumento importante en el coeficiente de permeabilidad a 9.406×10^{-4} (tablas 4.5 y 4.6). Estos resultados evidencian un efecto promotor notable de la formulación de nanocápsulas sobre la permeación de ME a través de la superficie corneal, debido a que la velocidad de liberación del fármaco *in vitro* es más lenta que la velocidad de permeación *ex vivo* para las NCECME 2. El mecanismo por el cual el fármaco atraviesa la córnea sigue el mismo modelo matemático que para los estudios de

liberación, con la salvedad que la velocidad de permeación desde NCECME 2 en comparación con la solución control (Sol. ME), es significativamente mayor.

4.5.3. Estudios *in vivo*

Para determinar si la aplicación tópica de NCECMEs podría generar un efecto neuroprotector en un modelo animal de DR (Bessone *et al.*, 2019), se llevaron a cabo estudios de eficacia *in vivo*. En base a esto, se espera que la aplicación tópica de ME fuera útil en el tratamiento de patologías oculares neurodegenerativas como el glaucoma. Además, se evaluó la potencial toxicidad e irritación posterior a la aplicación tópica de las formulaciones de NCECMEs y Sol. ME sobre la superficie corneal.

4.5.3.1. Estudios de Irritación Ocular: Evaluación con Prueba *Draize* Modificada

La evaluación clínica mediante la prueba *Draize* modificada ofrece la ventaja de ser muy sensible a la detección de lesiones de la superficie ocular y permite valorar la compatibilidad e inocuidad del tratamiento en los tejidos oculares (Morsi *et al.*, 2014). Como se ha descrito previamente, la evaluación de los párpados, conjuntiva, córnea e iris se realizó mediante observación externa con iluminación adecuada, y se proporcionó información adicional mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura.

Inicialmente, todos los animales mostraron una superficie ocular normal con córnea transparente. Tras la generación del modelo DR y 9 días de tratamiento tópico, se observaron córneas transparentes sin enrojecimiento ni lesiones en la mayoría de los animales, excepto ciertos casos en los que se observó queratitis difusa en una cuarta parte del área corneal. La coloración de la conjuntiva se mantuvo normal, sin evidencias de secreciones mucosas o signos de hinchazón o edema. Durante el estudio, los animales no mostraron ninguna molestia o signos de irritación.

Los puntajes de irritación se obtuvieron a partir de las observaciones clínicas utilizando la prueba *Draize* modificada. Las formulaciones evaluadas se consideraron no irritantes y farmacéuticamente aceptables para su administración ocular, debido a que se obtuvieron valores de irritación por debajo del 1% sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos administrados.

4.5.3.2. Examen Histológico: Evaluación de Toxicidad sobre Tejido Corneal

Se evaluaron secciones transversales de córnea, después de 9 días de tratamiento con Sol. ME, NCECMEs o solución de NaCl 0,9% p/v como control, para corroborar la toxicidad de las formulaciones evaluadas sobre el epitelio corneal. Como se puede observar en la *figura 4.9*, para los tratamientos con solución de NaCl al 0,9% p/v y Sol. ME (*figura 4.9.a y 4.9.b*), las capas de epitelio, estroma y endotelio de la córnea mostraron estructuras normales (Michael H. Ross, 2007). Las capas epiteliales estratificadas típicas

pueden reconocerse por la aparición de protuberancias en los núcleos de las células columnares basales y por la presencia de células superficiales escamosas. La misma morfología corneal fue observada posterior a la administración de las formulaciones de NCEC, NCECME 1 o 2 (*figuras 4.9.c, 4.9.d y 4.9.e*) donde ni la estructura ni la integridad del tejido se vieron visiblemente afectadas por la aplicación de los tratamientos. Estos resultados muestran que los sistemas nanométricos obtenidos son biocompatibles y bien tolerados por la superficie ocular.

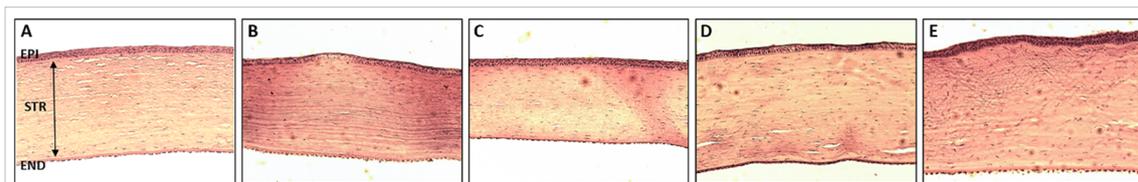


Figura 4.9. Examen histológico de córnea.

Las imágenes de microscopía muestran cortes histológicos transversales de córnea, donde se observan las capas de epitelio, estroma y endotelio, después de 9 días de tratamiento con (A) solución de NaCl al 0,9% p/v como control, (B) Sol. ME, (C) NCEC, (D) NCECME 1 y (E) NCECME 2. Las capas de córnea se representan como EPI: epitelio; STR: estroma; END: endotelio. Barra de escala: 100 μm .

4.5.3.3. Aumento de Viabilidad de CGR post-tratamiento con NCECME en Modelo Animal de DR: Estudios OCT, inmunohistoquímicos, histológicos y concentración efectiva de ME.

Con el objetivo de evaluar la eficacia terapéutica de ME administrada desde las NCEC en un modelo animal de DR, se estudió la integridad estructural de la retina y determinó la supervivencia y viabilidad de las CGR posterior a la aplicación de los tratamientos, mediante estudios de OCT, ensayos histológicos e inmunohistoquímicos. Asimismo, se determinó la concentración efectiva de ME en HA con el objetivo de conocer la biodisponibilidad del fármaco en las estructuras internas oculares, posterior a la aplicación de los tratamientos.

A partir de estos estudios, se evaluaron los siguientes tratamientos tópicos: formulaciones de ME, NCECME 1 y 2 en comparación con Sol. ME 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; y las formulaciones sin fármaco como solución de NaCl 0,9% p/v y NCEC blanco, utilizadas como control.

Inicialmente, se realizaron estudios de OCT para evaluar la estructura y espesor de la retina *in situ*, en animales con el modelo de DR y tratamiento tópico de 9 días con las formulaciones previamente mencionadas. Por un lado, para las formulaciones control, solución de NaCl al 0,9% p/v y NCEC blanco, las mediciones de OCT previo a la inducción del modelo de DR fueron de $(225 \pm 5) \mu\text{m}$ y $(230 \pm 9) \mu\text{m}$, respectivamente. Posterior a los 9 días de tratamiento, se observaron cambios estructurales importantes con una

disminución significativa en el grosor de la retina para ambas formulaciones, con valores de $(196 \pm 7) \mu\text{m}$ para la solución de NaCl al 0,9% p/v y $(203 \pm 6) \mu\text{m}$ para NCEC. Este efecto también fue evidenciado en los análisis histológicos, donde se observó una desorganización estructural de las distintas capas celulares de la retina acompañada de migración celular. Asimismo, los resultados mostraron diferencias en la organización de la capa de fotorreceptores, importante desaparición de las capas plexiformes externas y disminución significativa en la cantidad de células de retina, principalmente de CGR (ver figura 4.10).

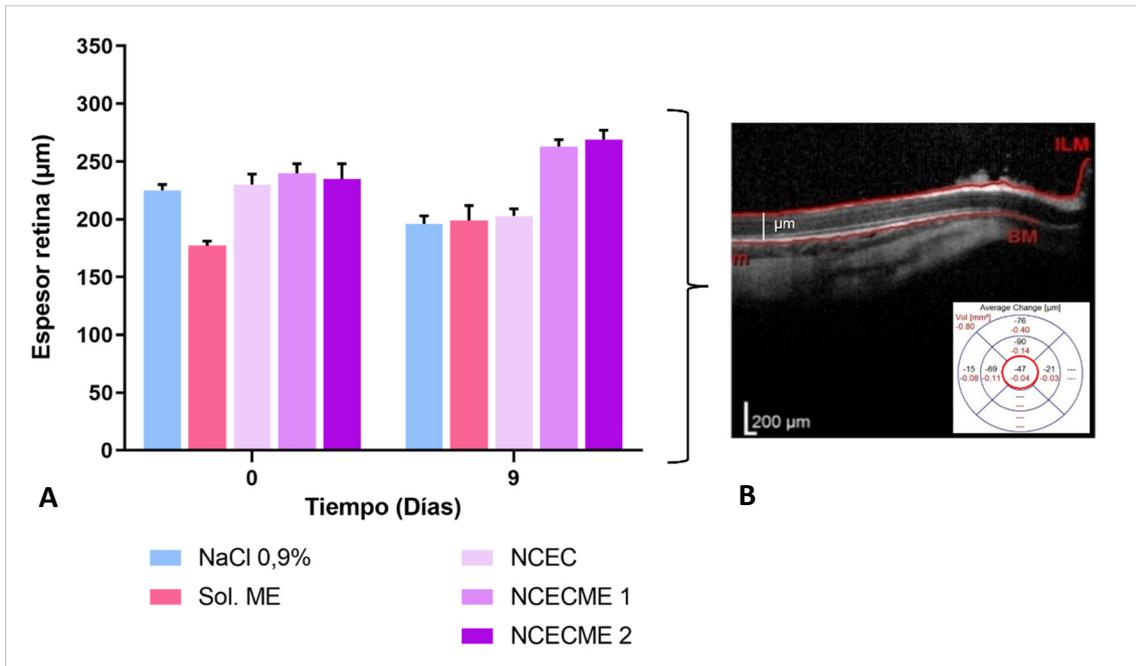


Figura 4.10. Medición in situ OCT de alta resolución post-tratamiento tópico con NCEC. (A) Gráfico de barras comparativo que representa el análisis cuantitativo de las mediciones por OCT de alta resolución en retina de ojos de conejos. El estudio fue llevado a cabo al día 0 (sin tratamiento) y a los 9 días post-tratamiento tópico con las siguientes formulaciones: solución de NaCl al 0,9% p/v (control), Sol. ME, NCEC, NCECME 1 y 2. Los datos se muestran como (Media \pm SEM) para todos los grupos (n=4). (B) Imagen representativa de escaneos-A de OCT de alta resolución y mapa representativo con valores medios del grosor de la retina proporcionados por el sistema OCT. Las líneas rojas indican los cortes transversales de la retina entre la membrana limitante interna (ILM) y la membrana basal (BM) debajo del nervio óptico, siendo el corte central elegido para la medición del espesor. Barra de escala: 200 μm .

Por el contrario, grupos de conejos sometidos al modelo de DR y tratados con las formulaciones de ME (Sol. ME y suspensiones de NCECME 1 y 2) aumentaron o al menos mantuvieron el mismo grosor de la retina con respecto a los valores iniciales obtenidos por OCT. Estos resultados fueron contrastados con los estudios histológicos de retina para los tratamientos con las NCECMEs, los cuales mostraron una menor alteración estructural, mayor organización y definición de las capas celulares, en comparación con las formulaciones control. Además, se observó un mayor porcentaje de supervivencia de CGR proporcional a la concentración de ME en las NCECMEs ($*p < 0,05$, ver figura 4.11). Sin embargo, este efecto no fue observado para el tratamiento con Sol. ME. Los análisis

histológicos mostraron una mayor desorganización estructural, migración celular entre las capas de retina y menor viabilidad de CGR. No obstante, el tratamiento con Sol. ME mostró una mejora en la integridad estructural de la retina en comparación con el tratamiento con solución de NaCl al 0,9% p/v, efecto que podría deberse a procesos metabólicos que generan un ligero aumento del grosor de la retina.

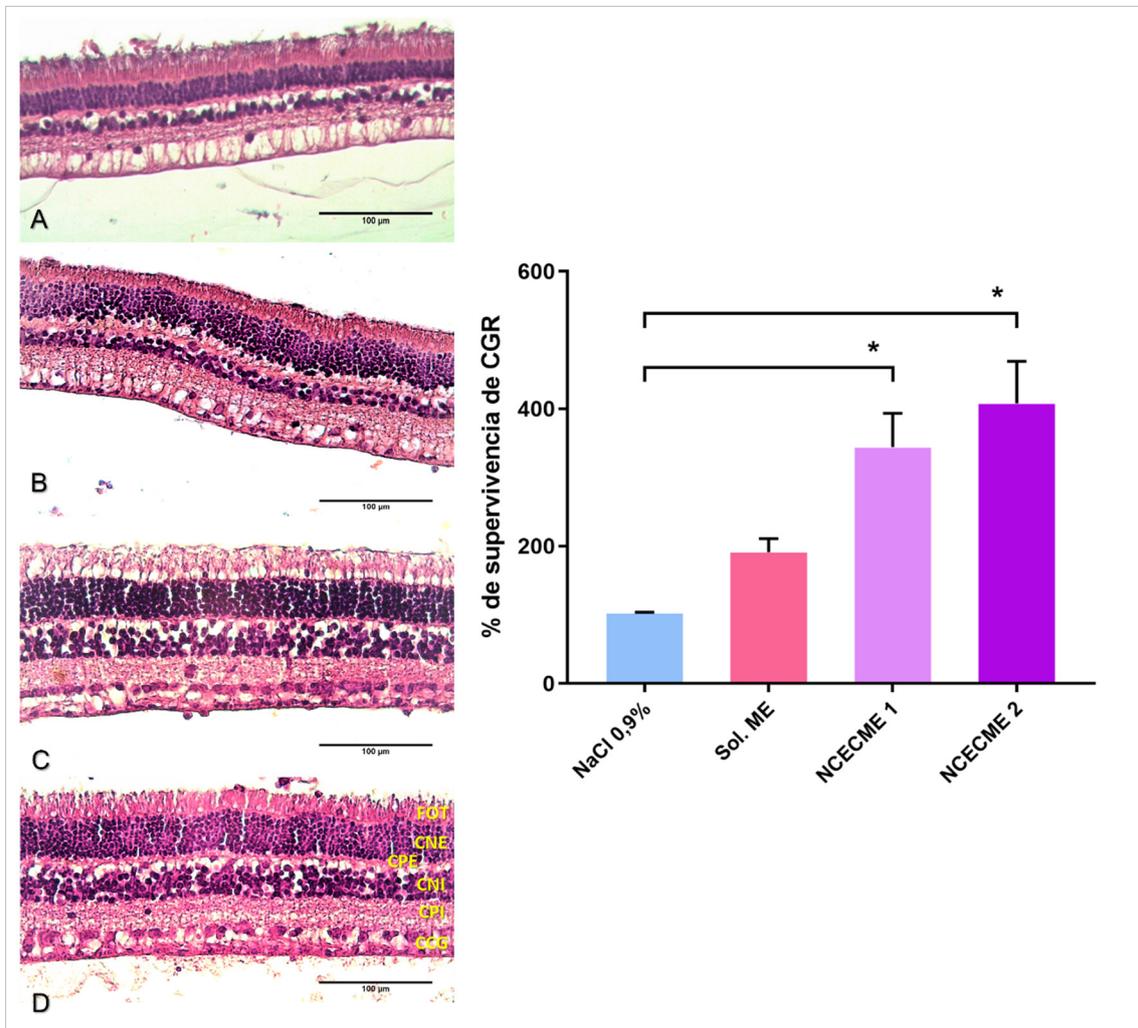


Figura 4.11. Viabilidad celular de CGR post-tratamiento tópico con NCEC.

A la izquierda, se muestran imágenes representativas de secciones de retina con tinción de hematoxilina y eosina, obtenidas por microscopía óptica al noveno día de aplicación de los siguientes tratamientos (A) solución de NaCl al 0,9% p/v como control, (B) Sol. ME, (C) NCECME 1 y (D) NCECME 2. Se pueden observar las diferencias estructurales y celulares en las diferentes capas de la retina. Barra de escala: 100 μ m. Las capas de la retina se describen como **FOT**: segmento fotorreceptor interno y externo; **CNE**: capa nuclear externa; **CPE**: capa plexiforme externa; **CNI**: capa nuclear interna; **CPI**: capa plexiforme interna; **CCG**: capa de células ganglionares. A la derecha, el gráfico de barras representa el análisis cuantitativo del porcentaje (%) de supervivencia de CGR en tejidos de retina tratados con las formulaciones antes mencionadas respecto al control. Los datos se muestran como (Media \pm DE) para todos los grupos (n=4) obtenidos a los 9 días de tratamiento. Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA, se representan respecto al valor del control (*p<0,05).

En base a los resultados anteriores, y con el fin de determinar el porcentaje de CGR en estado apoptótico (%IA), se realizó una prueba de detección inmunohistoquímica *in situ* en tejidos de retina mediante la técnica *TUNEL* (*In Situ Cell Death Detection Kit*, POD). En primer lugar, para los tratamientos con las soluciones de NaCl al 0,9% p/v y Sol. ME (9 días, en conejos con modelo de DR) se observó un aumento significativo en el %IA de CGR, con valores de $(63,5 \pm 3,7)$ %IA y $(66,8 \pm 4,7)$ %IA, respectivamente. Por otra parte, para los tratamientos con las suspensiones de NCECME en dosis de 1 mg.mL^{-1} y 2 mg.mL^{-1} en el mismo período de tiempo, se observó una disminución estadísticamente significativa en el %IA de las CGR con valores de $(50,1 \pm 9,0)$ %IA y $(52,5 \pm 7,3)$ %IA para NCECME 1 y 2, respectivamente. Ambas formulaciones alcanzaron diferencias significativas en comparación con la solución de control de NaCl al 0,9% p/v (** $p < 0,01$, figura 4.12).

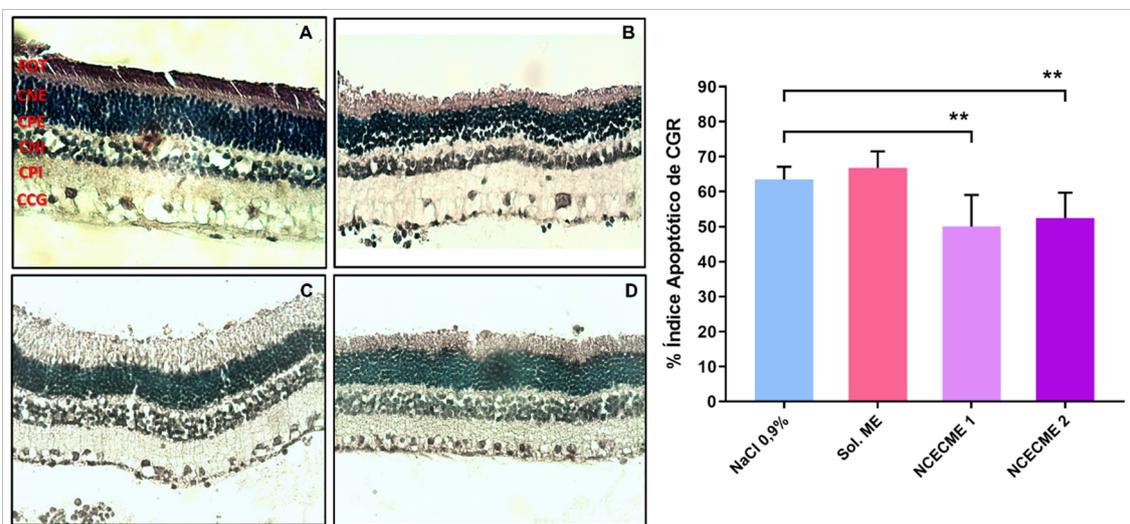


Figura 4.12. Detección de muerte celular por apoptosis de CGR.

Las imágenes de retina son representativas del estudio por técnica *TUNEL*, para la detección de muerte celular por apoptosis de CGR post-tratamiento tópico (9 días) con las siguientes formulaciones: (A) solución de NaCl al 0,9% p/v (control), (B) Sol. ME, (C) NCECME 1, (D) y NCECME 2. Barra de escala: 100 μm . El gráfico de barras presenta el análisis cuantitativo de la proporción de CGR *TUNEL*-positivas para cada tratamiento evaluado con respecto al control. Los resultados se presentan como (Media \pm DE) para todos los grupos ($n=4$). Las diferencias significativas obtenidas por ANOVA, se representan respecto al valor del control (** $p < 0,01$).

Finalmente, se realizaron estudios farmacocinéticos preliminares para conocer la concentración efectiva de fármaco que atravesaba la córnea, luego de 9 días de tratamiento con ME transportada desde las NCECME (2 mg.mL^{-1}) en comparación con la Sol. ME. Posterior a la análisis y cuantificación de las muestras de HA, se obtuvieron las concentraciones efectivas de ME para NCECME 2 ($0,12 \pm 0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y para la Sol. ME ($0,02 \pm 0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$) al finalizar el período de tratamiento.

4.6. DISCUSIÓN

El glaucoma es una neuropatía óptica progresiva, caracterizada por la degeneración gradual del tejido neuronal debido a la pérdida irreversible de CGR y sus axones, cuyo impacto funcional conduce a una pérdida del campo visual (Gupta *et al.*, 2006; Travar, 2016). Diversos estudios han demostrado que el daño generado en las CGRs en esta patología no sólo se limita a deterioros en neuronas primarias, sino que sigue una lesión secundaria que afecta a neuronas vecinas (Baltmr *et al.*, 2010). Esto hace que la perspectiva de descubrir enfoques terapéuticos alternativos e independientes de la reducción de la PIO sea una estrategia eficaz para la farmacoterapia del glaucoma, con modalidades de tratamiento que se dirijan directamente a la degeneración neuronal primaria y secundaria para prevenir la pérdida de CGR (Tian *et al.*, 2015). En este trabajo de tesis, se propone la terapia de neuroprotección como un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento del glaucoma. Esta terapia se centra en la administración exógena de agentes antioxidantes, con el objetivo principal de detener la pérdida de CGR al promover la supervivencia celular, prevenir un mayor daño estructural y funcional del nervio óptico y lograr preservar la visión en pacientes glaucomatosos. En línea a lo propuesto, ME ha demostrado ser una molécula antioxidante y antiinflamatoria, capaz de reducir o mitigar el daño celular asociado con el estrés oxidativo y los procesos apoptóticos desencadenantes, que subyacen a los trastornos neurodegenerativos. Existe evidencia experimental que apoya firmemente las acciones de ME y sus metabolitos como antioxidante directo e indirecto, eliminando radicales libres, estimulando enzimas antioxidantes y promoviendo la acción de antioxidantes endógenos (Esparza and Nogue, 2005; Laurentiis and Sande, 2016; Rosenstein *et al.*, 2010; Tosini *et al.*, 2012b). En función de lo expuesto, en este capítulo de tesis se plantea desarrollar nuevas plataformas de liberación de fármacos para encapsular ME, con el objetivo de optimizar la farmacoterapia ocular, aumentar su biodisponibilidad en las estructuras internas oculares y lograr un efecto antioxidante y neuroprotector en la terapia del glaucoma.

Con el fin de optimizar los resultados terapéuticos, se desarrollaron nanocápsulas cargadas de ME, compuestas por una cubierta de EC (polímero hidrófobo) y un núcleo lipídico oleoso de triglicéridos de cadena media. Estos sistemas, encapsulando diferentes concentraciones de ME, se obtuvieron por el método de deposición interfacial de polímeros preformados. Las formulaciones obtenidas (NCEC y NCECMEs) presentaron TMP de rango nanométricos de 150 - 180 nm con valores de IP cercanos a 0,2, lo que sugiere un tamaño poblacional homogéneo de partículas con valores aceptables para su administración por vía ocular. Asimismo, se observó una tendencia donde, a medida que aumenta la concentración de ME en las nanocápsulas, existe una ligera disminución en su tamaño (NCECME 1 y 2). Estos resultados fueron complementados con imágenes obtenidas por MEB, las cuales muestran que las NCECMEs presentan nanopartículas de forma esférica, homogéneas con TMP similares a los obtenidos por estudios de DLS. La morfología observada es coincidente con otros sistemas basados en NSP de EC (Ozeki

et al., 2012). Cabe destacar, que el TMP de los sistemas portadores aplicados de manera externa, es un factor importante que influye en la absorción o permeación a través de las barreras oculares. Estudios previos, han evidenciado que la administración ocular de partículas pequeñas (100 - 200 nm) exhiben mayor absorción, pudiendo penetrar a través de la barrera corneal, en comparación con partículas más grandes con valores de tamaño entre 800 - 1000 nm (Nagarwal *et al.*, 2009).

La eficacia de las partículas poliméricas en la carga y encapsulación de fármacos, son parámetros importantes para el control de calidad de las nanopartículas, que impactan en la estabilidad y aplicación de estos sistemas (Lu *et al.*, 2011; Nagarwal *et al.*, 2009). Para las suspensiones de nanocápsulas, se obtuvieron rendimientos altos en el proceso de encapsulación del fármaco, con valores de %EE de ME cercanos al 70% para ambas concentraciones. Este efecto puede atribuirse a la naturaleza apolar del fármaco y la capacidad de solubilización del núcleo lipídico (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

El pH fisiológico normal del ojo es de aproximadamente 7,4. Este valor puede permanecer alterado durante más de 30 minutos después de la instilación de una solución fuertemente tamponada (Fiscella, 2008). Las dispersiones NCECMEs evaluadas presentaron un pH cercano a 5-5,3 (*Tabla 4.4*) ligeramente más ácido que el rango de pH óptimo para la administración ocular. Sin embargo, se espera que la aplicación tópica de las NCECMEs no cause efectos irritantes apreciables debido a la capacidad amortiguadora del fluido lagrimal, como se reporta en bibliografía para soluciones oculares tópicas con valores de pH entre 4-5 (Saettone *et al.*, 1987).

Las nanocápsulas mostraron tener cargas negativas en su superficie, con valores entre -25 mV y -30 mV (*tabla 4.4*). Valores de potencial electrocinético altos, le confieren a la formulación una barrera de alta energía, lo que provoca repulsión de las gotas adyacentes y da como resultado una emulsión estable a estos valores de pH (Benita and Levy, 1993). Otros autores observaron comportamientos similares (Suwannateep *et al.*, 2011). En línea con lo expuesto, en estudios preliminares de estabilidad física en dispersión las formulaciones de NCECMEs mostraron ser estables por al menos un período de 30 días. No se observaron modificaciones en las propiedades fisicoquímicas durante el tiempo de estudio.

La osmolaridad del líquido lagrimal oscila entre 280 mOsm.kg⁻¹ y 293 mOsm.kg⁻¹. Una formulación isotónica posee valores de osmolaridad <290 mOsm.kg⁻¹, equivalente a una solución salina al 0,9%, valor óptimo para la administración tópica de soluciones oftálmicas. La película lagrimal ocular tiene una amplia tolerancia a la variación de la presión osmótica (Fiscella, 2008). Como muestra la *tabla 4.4*, el valor de osmolaridad de las dispersiones de NCECMEs es muy cercana al de la película lagrimal, considerándose una formulación isotónica y farmacéuticamente aceptable para su administración por vía ocular. Por lo tanto, es poco probable que estas formulaciones puedan causar irritación

tras su administración tópica (López-Alemaný *et al.*, 1999; Saettone, M.F., Bucci, M., Speiser, 1987).

La liberación *in vitro* de ME desde ambos sistemas portadores NCECMEs (1 y 2 mg.mL⁻¹) fue más lenta y prolongada en el tiempo con respecto al Sol. ME 1 mg.mL⁻¹. Este comportamiento muestra la capacidad del sistema de regular la liberación del fármaco. La pendiente de la curva (% de liberación vs. tiempo) aumenta a medida que disminuye la concentración de ME en la formulación. Estudios previos han reportado un comportamiento similar para NSP cargadas con acetazolamida (Quinteros *et al.*, 2016), indicando que la cantidad de fármaco liberado desde este tipo de sistemas se mantiene prácticamente constante en el tiempo. Este es un comportamiento típico de los dispositivos basados en un reservorio, donde las propiedades de la membrana polimérica modulan la liberación del fármaco, el cual ocurre mediante un proceso de difusión (Arifin *et al.*, 2006). Adicionalmente, se determinó que el mecanismo por el cual ME fue liberado desde los sistemas nanométricos seguía el modelo de *Korsmeyer-Peppas*, mostrando un comportamiento anómalo (valores de *n* entre 0,5 y 1) por el cual la liberación del fármaco es regulada a través de procesos de difusión y relajación de la matriz polimérica (Korsmeyer and Peppas, 1981). Resultados similares han sido reportados por Lokhande y cols. para NSP de polímeros de EC de diferente viscosidad (Lokhande *et al.*, 2013b).

Sin embargo, los estudios *ex vivo* (utilizando córneas aisladas de conejos) han demostrado una mayor permeación del fármaco desde las NCECME 2, el cual atraviesa la córnea con una velocidad aproximadamente dos veces más rápida que la solución control (Sol. ME). Este efecto puede atribuirse al prolongado tiempo de contacto de las nanocápsulas con las membranas de la superficie corneal, conduciendo a una mayor absorción del fármaco hacia los tejidos internos oculares. A su vez, se observó un aumento en el coeficiente de permeabilidad para las NCECMEs, lo que evidencia un efecto promotor de los sistemas sobre la permeación de ME a través del epitelio corneal. Este resultado podría explicarse por diferentes motivos: por un lado, la presencia de EC en la cubierta de las nanocápsulas sintetizadas, podrían interactuar con la mucina ocular, dando lugar a un efecto mucoadhesivo (Lokhande *et al.*, 2013b; Quinteros *et al.*, 2016), lo que favorecería a un contacto más estrecho de los sistemas con la superficie de la córnea. Por otro lado, los núcleos de las NCECMEs están compuestos por triglicéridos de cadena media, dichos lípidos se han reportado como potenciadores de la absorción intestinal (Raymond C Rowe *et al.*, 2009).

Asimismo, las propiedades intrínsecas de ME podrían ser otro factor de influencia en el aumento de absorción observado ya que ME posee un alto coeficiente de partición favoreciendo su permeación a través de las bicapas lipídicas de las membranas. La interacción de ME con las membranas biológicas provoca un efecto protector dependiente de la concentración, generando una reorganización de estas membranas biológicas (Dies *et al.*, 2015). Dichos autores realizaron un ensayo en un modelo de

membrana formado por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) para concentraciones de ME que van desde 0,5 mol% (95 mol% de DMPC) a 30 mol% (70 mol% de DMPC). A bajas concentraciones, se encontró que ME podía fluidificar la membrana, lo que resultaba en dominios fluidos enriquecidos con ME con espesores disminuidos. En función de lo expuesto, estas propiedades llevan a un comportamiento de mayor absorción, mayor tiempo de residencia y mayor permeabilidad transcorneal de ME contenida en las NCEC.

Estos resultados fueron corroborados mediante estudios *in vivo*, a partir de la administración tópica (durante 9 días) de los siguientes tratamientos: NCECME 1 y 2 en comparación con Sol. ME como control, en conejos con un modelo de DR inducido. Se observó que el tratamiento con las NCECMEs otorgó una protección más eficiente a las CGR frente al estrés oxidativo generado por el modelo de DR inducido, que la solución control (Sol. ME). Esto fue evidenciado por una reducción en la muerte celular por apoptosis (%IA), un aumento significativo de la viabilidad de CGR, y el mantenimiento de la integridad y estructura de la retina. Este efecto se puede atribuir a una mayor permanencia del sistema en la zona corneal, permitiendo una mayor efectividad y concentración del fármaco en atravesar la córnea, luego de 9 días de tratamiento.

La mayor capacidad de permeación de ME observada para los sistemas de NCECME, coincidió con los efectos neuroprotectores y antiapoptóticos observados sobre las CGRs. Los resultados demostraron efectos notables sobre la mantención de la integridad y organización estructural de la retina, así como también en una reducción significativa del %IA y aumento de la viabilidad de CGR (*figuras 4.11 y 4.12*). Esta eficacia no fue observada cuando se administró el tratamiento con Sol. ME sin sistema portador. Es decir, que ME administrada desde las nanocápsulas logra alcanzar las estructuras internas oculares del sector posterior.

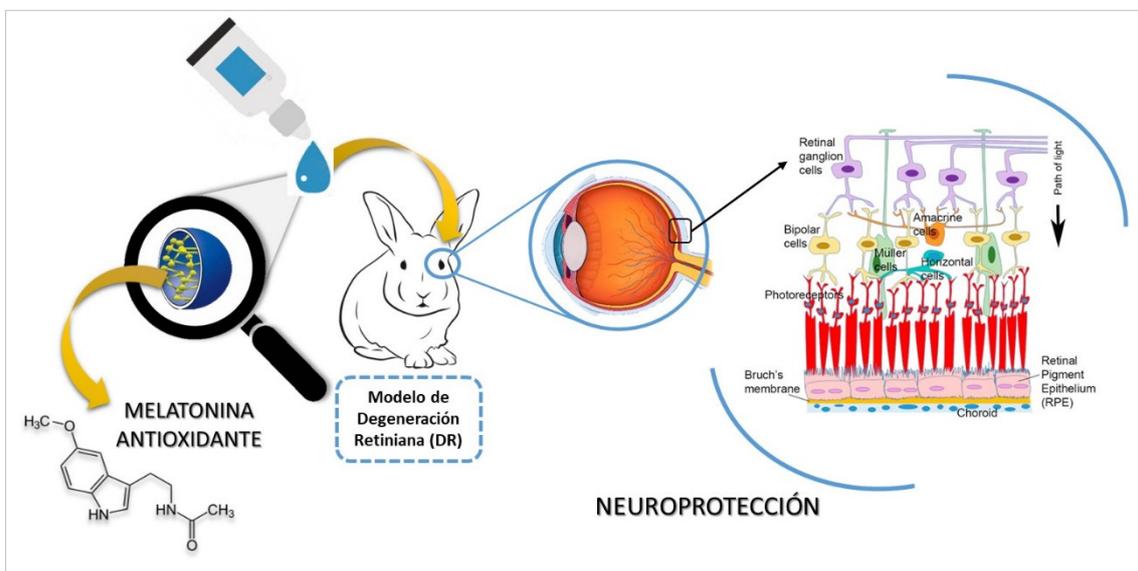
4.7. CONCLUSIONES PARCIALES

En función de lo expuesto y tomando en consideración las limitaciones que presenta la obtención de formas farmacéuticas de administración tópica que alcancen los tejidos internos oculares y el desafío de la terapia de neuroprotección para patologías degenerativas como el glaucoma; los objetivos de este capítulo fueron satisfactoriamente alcanzados. Luego del análisis y discusión de los resultados, se pueden establecer las siguientes conclusiones parciales:

- Se obtuvieron las NCECMEs en concentraciones de 1 y 2 mg.mL⁻¹, por el método de deposición interfacial de polímeros preformados, con propiedades fisicoquímicas adecuadas como sistema de administración tópica ocular y rendimientos de encapsulación de ME cercanos al 70%. Todas las formulaciones resultaron estables en el tiempo.

- Mediante estudios *in vitro*, se demostró la capacidad de las NCECMEs de modular la liberación de ME de forma lenta y sostenida en el tiempo, con respecto a la solución control (Sol. ME).
- Ensayos *ex vivo* (utilizando córneas de conejos) mostraron que dichos sistemas fueron promotores de la permeación de ME, efecto atribuible al prolongado tiempo de contacto de las NCECMEs con el tejido ocular y, en consecuencia, a una mayor absorción del fármaco.
- El tratamiento tópico *in vivo* con NCECMEs, otorgó un efecto neuroprotector y antiapoptótico eficiente frente al estrés oxidativo por el modelo de DR inducido, con efectos notables sobre la integridad y organización estructural de la retina, reducción del %IA y aumento de la viabilidad de CGRs.

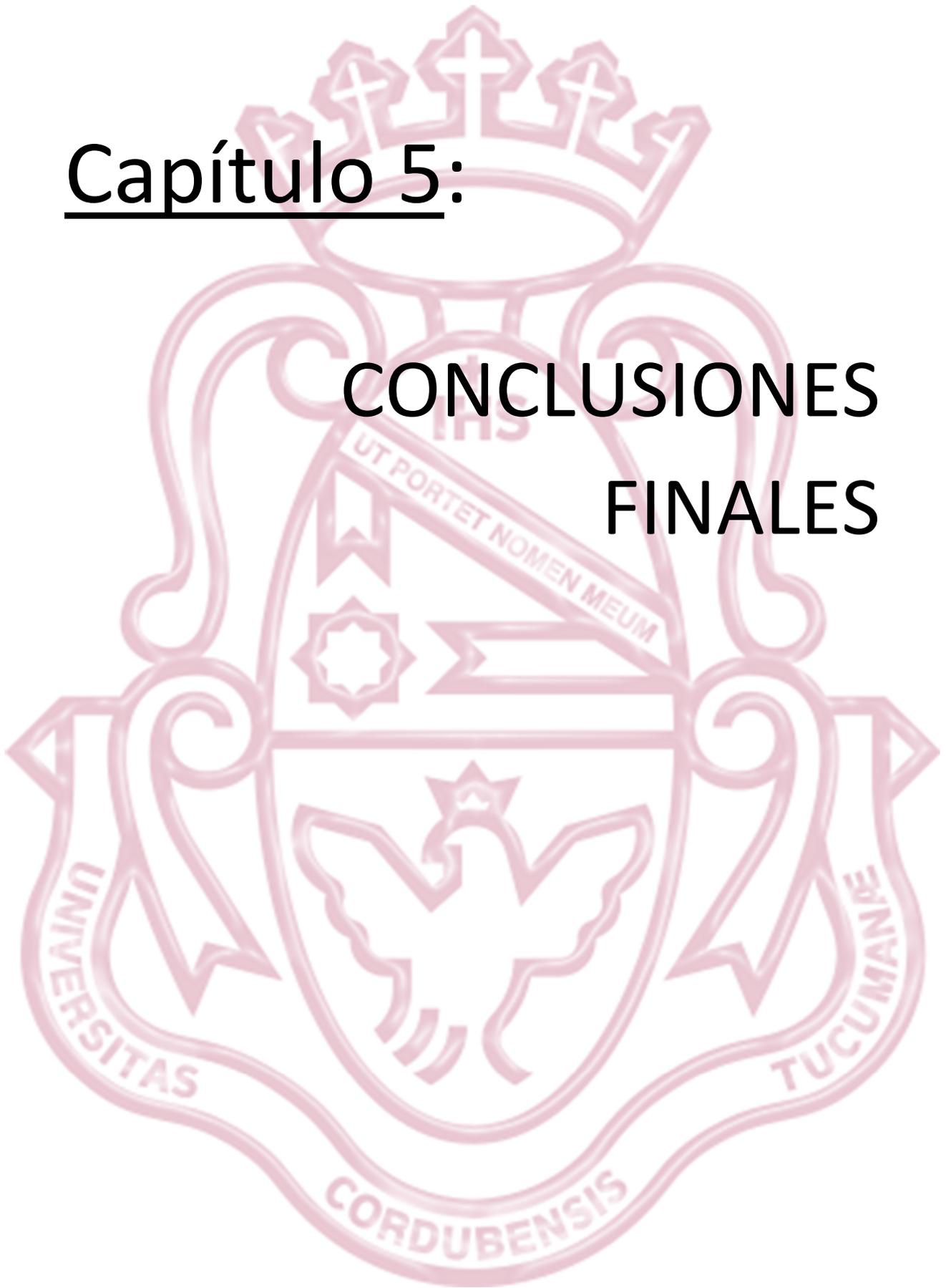
Estos hallazgos añaden nuevas perspectivas prometedoras al conocimiento actual sobre la administración de fármacos neuroprotectores en tratamientos de enfermedades degenerativas de la retina, como el glaucoma. Asimismo, permiten sustentar el potencial uso de NCEC como plataforma de liberación controlada de ME en el segmento posterior, prolongando el tiempo de permanencia en la superficie ocular y, de esta manera, aumentar la absorción y biodisponibilidad del fármaco en los tejidos internos oculares.



*Imagen resumen de los resultados obtenidos en el **Capítulo 4** mediante la obtención, caracterización y evaluación *in vivo* de las NCECME como tratamiento neuroprotector en enfermedades degenerativas de la retina.*

Capítulo 5:

CONCLUSIONES FINALES



CAPÍTULO 5: Conclusiones Finales

La presente Tesis Doctoral enfocó su trabajo en una posible terapia combinada para la enfermedad del glaucoma, mediante el desarrollo e implementación de nuevos sistemas portadores de fármacos (SPF) nanotecnológicos para mejorar la administración de los tratamientos por vía ocular.

Por un lado, se abordó la optimización de la terapia hipotensora con prostaglandinas, tratamiento de primera línea asociado a numerosos efectos adversos, mediante el diseño y desarrollo de cristales líquidos nanoparticulados (cubosomas) para la vehiculización de latanoprost (LN) como fármaco modelo. En paralelo, se estudió el efecto neuroprotector y antioxidante de melatonina (ME), como terapia alternativa de neuroprotección. Para ello, se desarrolló un modelo *in vivo* de degeneración retiniana (DR) en conejos mediante la administración de una dosis combinada de agentes oxidantes. En este punto, se avanzó en estudios *in vivo* mediante la administración intravítrea de ME, con el fin de evaluar la eficacia y dosis terapéutica para postular este fármaco como posible tratamiento de neuroprotección ante el avance de la enfermedad del glaucoma. En pos de los resultados obtenidos, se abordó el desarrollo y obtención de nanocápsulas de etilcelulosa (NCEC) como sistema portador de ME para optimizar su administración por vía tópica ocular. A continuación, la *Figura 5.1* presenta un esquema resumen de la metodología de trabajo llevada a cabo en la Tesis Doctoral.

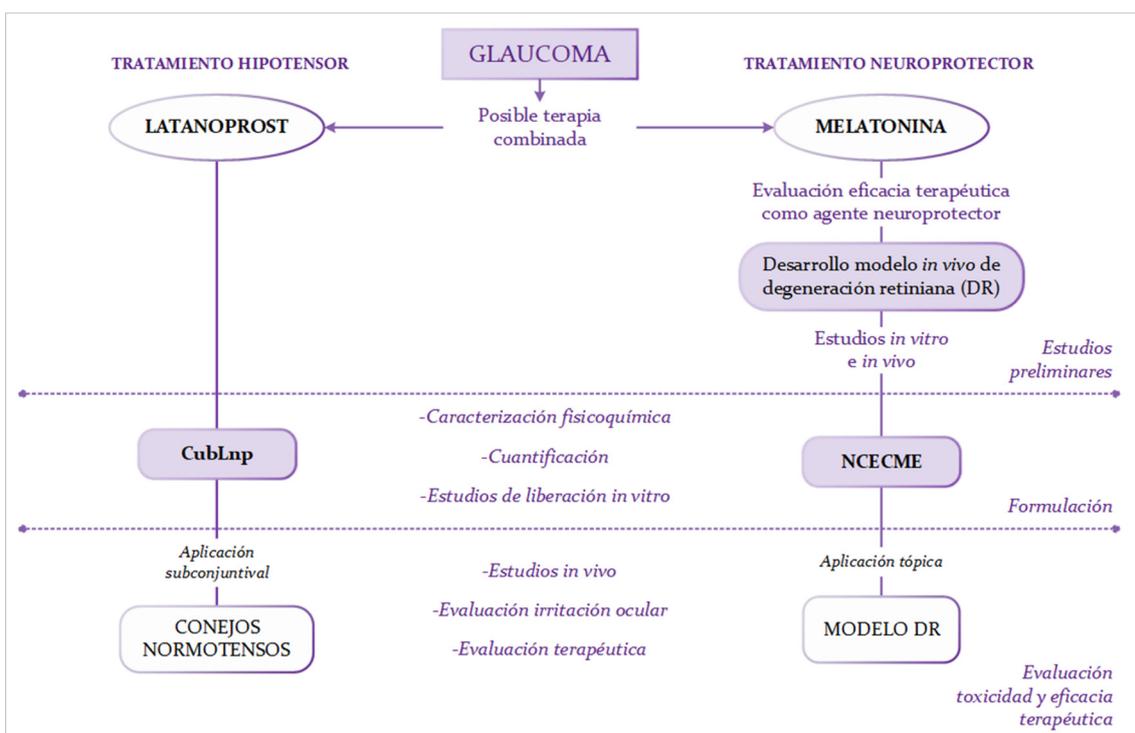


Figura 5.1. Esquema metodológico desarrollado en el Trabajo de Tesis Doctoral.

Para abordar el mejoramiento de la terapia convencional del glaucoma con fármacos hipotensores, se desarrollaron cubosomas cargados con LN (CubLnp) mediante el método *top-down* como plataformas nanotecnológicas. La incorporación de

diferentes concentraciones de LN no generaron alteraciones en la estructura interna y conformación del sistema cúbico, lográndose encapsular por el método propuesto alrededor del 90% del fármaco. Los CubLnp presentaron características fisicoquímicas y morfológicas adecuadas para ser administrados por vía ocular. Además, las formulaciones no mostraron variaciones en las propiedades estudiadas durante su almacenamiento, evidenciando su estabilidad física a largo plazo. Mediante estudios *in vitro*, se demostró que CubLnp como plataforma tecnológica, fue capaz de modular la liberación de LN de manera sostenida y prolongada en el tiempo. Este resultado fue confirmado en estudios *in vivo*, donde una única aplicación subconjuntival de CubLnp a bajas concentraciones alcanza un efecto hipotensor prolongado. La administración de una única dosis de CubLnp logró una reducción de la PIO de alrededor del 30%, con extensión del efecto farmacológico por al menos 9 días. Estos resultados permitirían reducir la frecuencia de administración, aumentar la adherencia del paciente al tratamiento y, por ende, mejorar la eficacia de la terapia hipotensora. Finalmente, las formulaciones resultaron compatibles y bien tolerados en los tejidos oculares tras su administración subconjuntival, con leve irritación local en la zona de intervención.

Como punto de partida para estudiar el efecto neuroprotector de ME sobre las células neuronales de retina, se desarrolló un modelo de DR mediante la administración conjunta de GLUT y BSO. La comparación de estudios de toxicidad *in vitro* en cultivos primarios CGR con los resultados obtenidos *in vivo* en conejos *New Zealand*, permitió seleccionar la dosis adecuada de agentes oxidantes, capaz de desencadenar un mecanismo progresivo de citotoxicidad y estrés oxidativos a nivel de las células neuronales de la retina. La obtención del modelo *in vivo* fue una herramienta fundamental para una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de degeneración y muerte celular inducidos en patologías neurodegenerativas como el glaucoma. Esto permitió la posterior evaluación del efecto terapéutico de ME como potencial tratamiento de neuroprotección. Los resultados del tratamiento con ME, tanto en cultivos de CGR como en conejos sometidos al modelo de DR, permitieron demostrar el notable efecto neuroprotector y antioxidante del fármaco sobre las células neuronales. A su vez, a través de estudios histológicos e inmunohistoquímicos se logró evidenciar la capacidad de ME de promover la viabilidad celular, principalmente de CGR, mantener la ultraestructura de la retina y prevenir la apoptosis celular ante el daño generado por la inducción del modelo. Estos resultados se consideraron satisfactorios y alentadores para postular a ME como fármaco modelo para una terapia de neuroprotección complementaria a la actualmente utilizada en el tratamiento del glaucoma.

Ante las bases previamente establecidas y para generar una farmacoterapia de neuroprotección eficiente, se propuso el desarrollo de nanocápsulas de etilcelulosa como estrategia nanotecnológica para la vehiculización de ME (NCECME). El método de obtención permitió incorporar adecuadamente el fármaco en la matriz lipídica, logrando una eficiencia de encapsulación cercana al 70% evaluado en dos concentraciones de ME, 1 y 2 mg.mL⁻¹. Las formulaciones de NCECMEs obtenidas presentaron una estabilidad coloidal óptima y propiedades fisicoquímicas compatibles para su administración por vía

tópica ocular. A su vez, estudios *in vitro* y *ex vivo*, demostraron la capacidad de las NCECMEs de modular la liberación y promover la permeación del fármaco a través de los tejidos oculares. Además, se le atribuyen propiedades de mucoadhesión que prolongarían el tiempo de contacto del sistema portador con la superficie ocular. Estas condiciones favorecieron el tratamiento tópico con NCECME en un modelo *in vivo* de DR, el cual demostró un aumento de la viabilidad y reducción de la apoptosis de CGR acompañado mejoras notables sobre la integridad estructural de la retina. A partir de estos resultados, se puede inferir la efectividad terapéutica de ME y la capacidad del sistema portador de alcanzar las estructuras internas oculares del segmento posterior cuando es administrado de manera tópica y mantener la biodisponibilidad del fármaco en el blanco terapéutico.

En función de lo expuesto, se resumen las siguientes **conclusiones finales** del Trabajo de Tesis Doctoral:

- Obtención de *CubLnp* como formulaciones de administración subconjuntival, compatibles con los tejidos oculares y capaces de lograr efectos hipotensores prolongados y más efectivos en menores concentraciones que la formulación comercial seleccionada como referencia comparativa.
- Obtención de un modelo *in vivo* de DR, para demostrar el efecto neuroprotector de ME sobre los mecanismos de degeneración y muerte de CGR, y proponerlo como potencial candidato para nuevas terapias de neuroprotección en patologías degenerativas como el glaucoma.
- Obtención de *NCECMEs* como formulaciones innovadoras de administración tópica, capaces de superar las barreras biológicas oculares y lograr efectos antiapoptóticos y neuroprotectores en los tejidos intraoculares del segmento posterior.
- Proyección de una farmacoterapia combinada, mediante la administración conjunta de un tratamiento hipotensor (segmento anterior) y otro neuroprotector (segmento posterior), para mantener la función y campo visual del paciente, evitar el progreso de la enfermedad y lograr una terapia efectiva en la patología del glaucoma.

Estos hallazgos proponen nuevas perspectivas innovadoras sobre la administración ocular de fármacos convencionales en el tratamiento del glaucoma, mediante el desarrollo e implementación de sistemas nanoparticulados como estrategia tecnológica para superar los obstáculos que impone la vía ocular y generar farmacoterapias más optimizadas, seguras y eficientes en beneficio del paciente.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abe, M., Rj, R., Pb, O., Hara, M., Inhibitory, P.B., 1994. Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: Evidence for an antioxidative role for melatonin. *J. Pineal Res.* 17, 94–100. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1994.tb00119.x>.
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Rodriguez, M.I., Lopez, L.C., 2007. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front. Biosci.* 12, 947–963. <https://doi.org/10.2741/2116>.
- Acuña-Castroviejo D., López L.C., Escames G., López A., García J.A., Reiter, R.J., 2011. Melatonin-mitochondria Interplay in Health and Disease. *Curr Top Med Chem* 11, 221–240. <https://doi.org/10.2174/156802611794863517>.
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M.E., Lima-Cabello, E., López, L.C., Rosales-Corral, S., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2014. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>.
- Adams, C.M., Papillon, J.P.N., 2020. Recent Developments for the Treatment of Glaucoma. *Top Med Chem.* 35, 189–256. https://doi.org/10.1007/7355_2019_92.
- Adeleke, O.A., 2019. Premium ethylcellulose polymer based architectures at work in drug delivery. *Int. J. Pharm.* X. 1, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100023>.
- Agarwal, P., Huang, D., Thakur, S.S., Rupenthal, I.D., 2018. Nanotechnology for ocular drug delivery. *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813667-6.00004-8>.
- Aiello, L.P., Brucker, A.J., Chang, S., Cunningham, E.T., D'Amico, D.J., Flynn, H.W., Grillone, L.R., Hutcherson, S., Liebmann, J.M., O'Brien, T.P., Scott, I.U., Spaide, R.F., Ta, C., Trese, M.T., 2004. Evolving guidelines for intravitreal injections. *Retina* 24, 3–19. <https://doi.org/10.1097/00006982-200410001-00002>.
- Akbar, S., Anwar, A., Ayish, A., Elliott, J.M., Squires, A.M., 2017. Phytantriol based smart nano-carriers for drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 101, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.035>.
- Akhlaghi, S.P., da Silveira Balestrin, L.B., Brinatti, C., Pirolto, F., Loh, W., Glatter, O., 2020. Preparation and Characterization of Stabilizer-Free Phytantriol-Based Water-in-Oil Internally Liquid Crystalline Emulsions. *J. Pharm. Sci.* 109, 2024–2032. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.02.022>.
- Akhlaghi, S.P., Ribeiro, I.R., Boyd, B.J., Loh, W., 2016. Impact of preparation method and variables on the internal structure, morphology, and presence of liposomes in phytantriol-Pluronic F127 cubosomes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 145, 845–853. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.091>.
- Alm, A., 2014. Latanoprost in the treatment of glaucoma. *Clin. Ophthalmol.* 8, 1967–1985. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S59162>.
- Alvarez-Trabado, J., Diebold, Y., Sanchez, A., 2017. Designing lipid nanoparticles for topical ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* Elsevier B.V. 1, 204–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.017>.
- Andrés-Guerrero, V., Bravo-Osuna, I., Pastoriza, P., Molina-Martinez, I.T., Herrero-Vanrell, R., 2017. Novel technologies for the delivery of ocular therapeutics in glaucoma. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 42, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.001>.

- Anton, N., Benoit, J.P., Saulnier, P., 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J. Control. Release* 128, 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>.
- Aoun, P., Simpkins, J.W., Agarwal, N., The, P.U., 2003. Role of PPAR- γ Ligands In Neuroprotection against Glutamate-Induced Cytotoxicity in Retinal Ganglion Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2999-3004. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-1060>.
- Aranda, M.L., Narvaez, O., Altschuler, F., Calanni, J.S., González Fleitas, M.F., Sande, P.H., Dorfman, D., Concha, L., Rosenstein, R.E., 2021. Chronobiotic effect of melatonin in experimental optic neuritis. *Neuropharmacology* 182, 108401. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108401>.
- Arifin, D.Y., Lee, L.Y., Wang, C., 2006. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 1274–1325. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.007>.
- Arroyo, C.M., Quinteros, D., Cózar-Bernal, M.J., Palma, S.D., Rabasco, A.M., González-Rodríguez, M.L., 2018. Ophthalmic administration of a 10-fold-lower dose of conventional nanoliposome formulations caused levels of intraocular pressure similar to those induced by marketed eye drops. *Eur. J. Pharm. Sci.* 111, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.024>.
- Aslan, M., Cort, A., Yucel, I., 2008. Oxidative and nitrative stress markers in glaucoma. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.026>.
- Azmi, I.D.M., Moghimi, S.M., Yaghmur, A., 2015. Cubosomes and hexosomes as versatile platforms for drug delivery. *Ther. Deliv.* 6, 1347–1364. <https://doi.org/10.4155/tde.15.81>.
- Azmi, I.D.M., Østergaard, J., Stürup, S., Gammelgaard, B., Urtti, A., Moghimi, S.M., Yaghmur, A., 2018. Cisplatin Encapsulation Generates Morphologically Different Multicompartment in the Internal Nanostructures of Nonlamellar Liquid-Crystalline Self-Assemblies. *Langmuir* 34, 6570–6581. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01149>.

B

- Baltmr, A., Duggan, J., Nizari, S., Salt, T.E., Cordeiro, M.F., 2010. Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role? *Experimental Eye Research* 91, 554–566. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.08.009>.
- Ban, N., Siegfried, C.J., Apte, R.S., 2018. Monitoring Neurodegeneration in Glaucoma: Therapeutic Implications. *Trends Mol. Med.* 24, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.11.004>.
- Banker, G.S., Rhodes, C.T., 2002. Modern Pharmaceutics Revised and Expanded, Fourth edition. ed, CRC Press, New York, USA. <https://doi.org/10.3109/9780203908839>.
- Barar, J., Aghanejad, A., Fathi, M., Omid, Y., 2016. Advanced drug delivery and targeting technologies for the ocular diseases. *BiolImpacts* 6, 49–67. <https://doi.org/10.15171/bi.2016.07>.
- Barauskas, J., Johnsson, M., Joabsson, F., Tiberg, F., 2005. Cubic phase nanoparticles (cubosome): Principles for controlling size, structure, and stability. *Langmuir* 21, 2569–2577. <https://doi.org/10.1021/la047590p>.
- Barauskas, J., Landh, T., 2003. Phase Behavior of the Phytantriol / Water System. *Langmuir* 19, 9562–9565. <https://doi.org/10.1021/la0350812>.

- Barret, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H.L., 2010. Ganong Fisiología médica, 23a edition. ed, McGraw-Hill Companies, Inc.
- Barriga, H.M.G., Holme, M.N., Stevens, M.M., 2019. Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles? *Angew. Chem. Int. Ed.* 58, 2958–2978. <https://doi.org/10.1002/anie.201804067>.
- Batra, R., Tailor, R., Mohamed, S., 2014. Ocular surface disease exacerbated glaucoma: Optimizing the ocular surface improves intraocular pressure control. *J. Glaucoma* 23, 56–60. <https://doi.org/10.1097/IJG.0b013e318264cd68>.
- Battaglia, L., D'Addino, I., Peira, E., Trotta, M., Gallarate, M., 2012. Solid lipid nanoparticles prepared by coacervation method as vehicles for ocular cyclosporine. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 22, 125–130. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(12\)50016-X](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(12)50016-X).
- Baydoun, E.A., Pavlencheva, N., Cumming, C.M., Waldron, K.W., Brett, C.T., 2004. Control of dehydrodiferulate cross-linking in pectins from sugar-beet tissues. *Phytochemistry* 65, 1107–1115. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.02.014>.
- Beck, D.E.R., El-Assal, K., McGarry, K., Wride, N.K., 2017. Switching to preservative-free latanoprost: Impact on tolerability and patient satisfaction. *Clin. Ophthalmol.* 11, 1565–1566. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S143287>.
- Belforte, N.A., Moreno, M.C., De Zavalía, N., Sande, P.H., Chianelli, M.S., Keller Sarmiento, M.I., Rosenstein, R.E., 2010. Melatonin: A novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma. *J. Pineal Res.* 48, 353–364. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00762.x>.
- Belouqui, A., Solinís, M.Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A.J., Préat, V., 2016. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biol. Med.* 12, 143–161. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>.
- Benita, S., Levy, M.Y., 1993. Submicron Emulsions as Colloidal Drug Carriers for Intravenous Administration: Comprehensive Physicochemical Characterization. *J. Pharm. Sci.* 82, 1069–1079. <https://doi.org/10.1002/jps.2600821102>.
- Bessone, V., Diaz, H., Edit, G., Barboza, D. De, Graciela, N., Talamoni, T. De, Alberto, D., Rita, A., Alejandra, D., 2019. Protective role of melatonin on retinal ganglionar cell: In vitro and in vivo evidences. *Life Sci.* 218, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.053>.
- Better, S., Patients, H.F., 2004. The Pharmaceutical Innovation Platform. *International Federation of Pharmaceutical Manufacturers Associations*, ed. Genevoise SA, Switzerland.
- Bhattacharjee, A., Das, P.J., Adhikari, P., Marbaniang, D., Pal, P., Ray, S., Mazumder, B., 2019. Novel drug delivery systems for ocular therapy: With special reference to liposomal ocular delivery. *Eur. J. Ophthalmol.* 29, 113–126. <https://doi.org/10.1177/1120672118769776>.
- Boga, J.A., Caballero, B., Potes, Y., Perez-Martinez, Z., Reiter, R.J., Vega-Naredo, I., Coto-Montes, A., 2019. Therapeutic potential of melatonin related to its role as an autophagy regulator: A review. *J. Pineal Res.* 66, 1–21. <https://doi.org/10.1111/jpi.12534>.
- Boiero, C., 2017. Nanopartículas proteínicas como sistemas bioadhesivos de administración oftálmica de fármacos. [Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba]. <https://rdu.unc.edu.ar/>.
- Bourges, J.L., Gautier, S.E., Delie, F., Bejjani, R.A., Jeanny, J.C., Gurny, R., BenEzra, D., Behar-

- Cohen, F.F., 2003. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3562–3569. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-1068>.
- Bourlais, L., Acar, L., Zia, H., Sado, P.A., Needham, T., Leverg, R., 1998. Ophthalmic Drug Delivery Systems Recent Advances. *Prog. Retin. Eye Res.* 17, 33–58. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(97\)00002-5](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(97)00002-5).
- Braun, S., 2011. Encapsulation of cells (cellular delivery) using sol-gel systems. *Comprehensive Biomaterials* 4, 529–543. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-055294-1.00141-0>.
- Bruschi, M.L., Borghi-Pangoni, F.B., Junqueira, M. V., de Souza Ferreira, S.B., 2017. Chapter 12: Nanostructured therapeutic systems with bioadhesive and thermoresponsive properties. In *Micro and Nano Technologies, Nanostructures for Novel Therapy: Synthesis, Characterization and Applications*. Elsevier Inc. 313–342. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46142-9.00012-8>.
- Bua, S., Supuran, C.T., 2019. Diagnostic markers for glaucoma: a patent and literature review (2013–2019). *Expert Opin. Ther. Pat.* 29, 829–839. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1667336>.
- Bui, B. V., Fortune, B., 2004. Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *J. Physiol.* 555, 153–173. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.052738>.
- Buitrago, E., Del Sole, M.J., Torbidoni, A., Fandino, A., Asprea, M., Croxatto, J.O., Chantada, G.L., Bramuglia, G.F., Schaiquevich, P., 2013. Ocular and systemic toxicity of intravitreal topotecan in rabbits for potential treatment of retinoblastoma. *Exp. Eye Res.* 108, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.01.002>.

C

- Cafaro, T.A., Suarez, M.F., Maldonado, C., Croxatto, J.O., Insfrán, C., Urrets-Zavalía, J.A., Serra, H.M., 2015. On the Cornea of Healthy Merino Sheep: A Detailed Ex Vivo Confocal, Histological and Ultrastructural Study. *J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.* 44, 247–254. <https://doi.org/10.1111/ahe.12131>.
- Carey, J.W., Pinarci, E.Y., Penugonda, S., Karacal, H., Ercal, N., 2011. In vivo inhibition of l-buthionine-(S,R)-sulfoximine-induced cataracts by a novel antioxidant, N-acetylcysteine amide. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.017>.
- Carpentieri, A., Marchionatti, A., Areco, V., Perez, A., Centeno, V., Tolosa De Talamoni, N., 2014. Antioxidant and antiapoptotic properties of melatonin restore intestinal calcium absorption altered by menadione. *Mol. Cell. Biochem.* 387, 197–205. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1885-2>.
- Checa-Casalengua, P., Jiang, C., Bravo-Osuna, I., Tucker, B.A., Molina-Martínez, I.T., Young, M.J., Herrero-Vanrell, R., 2011. Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit e PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure. *J. Control. Release.* <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.023>.
- Chen, Y., Ma, P., Gui, S., 2014. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. *Biomed Res. Int.* 2014, 815981. <https://doi.org/10.1155/2014/815981>.
- Cheng, Y., Tsai, T., Jhan, Y., Chiu, A.W., Tsai, K., Chien, C., Chiou, S., Liu, C.J., 2016.

- Thermosensitive chitosan-based hydrogel as a topical ocular drug delivery system of latanoprost for glaucoma treatment. *Carbohydr. Polym.* 144, 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.080>.
- Cheng, Y.H., Hung, K.H., Tsai, T.H., Lee, C.J., Ku, R.Y., Chiu, A.W.H., Chiou, S.H., Liu, C.J.L., 2014. Sustained delivery of latanoprost by thermosensitive chitosan-gelatin-based hydrogel for controlling ocular hypertension. *Acta Biomater.* 10, 4360–4366. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.031>.
- Cheng, Y.H., Ko, Y.C., Chang, Y.F., Huang, S.H., Liu, C.J. ling, 2019. Thermosensitive chitosan-gelatin-based hydrogel containing curcumin-loaded nanoparticles and latanoprost as a dual-drug delivery system for glaucoma treatment. *Exp. Eye Res.* 179, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.11.017>.
- Cheng, Y.H., Tsai, T.H., Jhan, Y.Y., Chiu, A.W.H., Tsai, K.L., Chien, C.S., Chiou, S.H., Liu, C.J.L., 2016. Thermosensitive chitosan-based hydrogel as a topical ocular drug delivery system of latanoprost for glaucoma treatment. *Carbohydr. Polym.* 144, 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.080>.
- Chevalier, M.T., Gonzalez, J., Alvarez, V., 2015. Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices. VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB. IFMBE Proceedings. *Springer, Cham* 49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13117-7_49.
- Chidlow, G., Wood, J.P.M., Casson, R.J., 2007. Pharmacological neuroprotection for Glaucoma. *Drugs* 67, 725–759. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767050-00006>.
- Chong, R.S., Su, D.H.W., Tsai, A., Jiang, Y., Htoon, H.M., Lamoureux, E.L., Aung, T., Wong, T.T., 2013. Patient acceptance and attitude toward an alternative method of subconjunctival injection for the medical treatment of glaucoma. *J. Glaucoma* 22, 190–194. <https://doi.org/10.1097/IJG.0b013e318237c6c4>.
- Cirilo, A.D., Llombart, C.M., Tamargo, J.J., 2003. Introducción a la química terapéutica, 2da edición. ed. *Díaz de Santos, S.A.*, España.
- Colorcon, 2021. ETHOCEL™ Premium Ethylcellulose Polymers. <https://www.colorcon.com/products-formulation/all-products/film-coatings/sustained-release/ethocel>.
- Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, 2003. Farmacopea Argentina 7° Ed. Volumen I. ed, Ministerio de Salud de la Nación, Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/farmacopea-argentina>.
- Coto-montes, A., 2005. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J. Pineal Res.* 39, 99–104. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x>.
- Klein, L., Aparicio, M., Jitianu, A., 2018. Handbook of Sol-Gel Science and Technology. Processing, Characterization and Applications. ed, *Springer Int.* <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19454-7>.

D

- Davis, B.M., Pahlitzsch, M., Guo, L., Balendra, S., Shah, P., Ravindran, N., Malaguarnera, G., Sisa, C., Shamsheer, E., Hamze, H., Noor, A., Sornsute, A., Somavarapu, S., Cordeiro, M.F., 2018. Topical Curcumin Nanocarriers are Neuroprotective in Eye Disease. *Sci. Rep.* 8, 11066. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29393-8>.

- De Campo, L., Yagmur, A., Sagalowicz, L., Leser, M.E., Watzke, H., Glatter, O., 2004. Reversible phase transitions in emulsified nanostructured lipid systems. *Langmuir* 20, 5254–5261. <https://doi.org/10.1021/la0499416>.
- Díaz de Barboza, G., Rodríguez, V., Ponce, R., Theiler, G., Maldonado, C., Tolosa de Talamoni, N., 2014. Association of cellular and molecular alterations in Leydig cells with apoptotic changes in germ cells from testes of *Graomys griseoflavus* × *Graomys centralis* male hybrids. *Acta Histochem.* 116, 1037–1045. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.04.007>.
- Dies, H., Cheung, B., Tang, J., Rheinstädter, M.C., 2015. The organization of melatonin in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1848, 1032–1040. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.01.006>.
- Dogra, A., Kaur, K., Ali, J., Baboota, S., Narang, R.S., Narang, J.K., 2020. Nanoformulations for Ocular Delivery of Drugs - A Patent Perspective. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 13, 255–272. <https://doi.org/10.2174/1872211314666200127101149>.
- Domínguez-Gil Hurlé, A., Martín Suárez, A., 1997. Avances en Tecnología Farmacéutica. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Salamanca, 57–122.
- Dong, Y. Da, Dong, A.W., Larson, I., Rappolt, M., Amenitsch, H., Hanley, T., Boyd, B.J., 2008. Impurities in commercial phytantriol significantly alter its lyotropic liquid-crystalline phase behavior. *Langmuir* 24, 6998–7003. <https://doi.org/10.1021/la8005579>.
- Duranova, H., Valkova, V., Knazicka, Z., Olexikova, L., Vasicek, J., 2020. Mitochondria: A worthwhile object for ultrastructural qualitative characterization and quantification of cells at physiological and pathophysiological states using conventional transmission electron microscopy. *Acta Histochem.* 122, 151646. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151646>.

E

- Egunsola, O., Dowsett, L.E., Diaz, R., Brent, M., Rac, V., Clement, F.M., 2021. Diabetic Retinopathy Screening: A Systematic Review of Qualitative Literature. *Can. J. Diabetes.* 3, 1499–2671. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2021.01.014>.
- El Hoffy, N.M., Abdel Azim, E.A., Hathout, R.M., Fouly, M.A., Elkheshen, S.A., 2021. Glaucoma: Management and Future Perspectives for Nanotechnology-Based Treatment Modalities. *Eur. J. Pharm. Sci.* 158, 105648. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105648>.
- Eldeeb, A.E., Salah, S., Ghorab, M., 2019a. Formulation and evaluation of cubosomes drug delivery system for treatment of glaucoma: Ex-vivo permeation and in-vivo pharmacodynamic study. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 52, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.036>.
- Erisgin, Z., Ozer, M.A., Tosun, M., Ozen, S., Takir, S., 2019. The effects of intravitreal H₂S application on apoptosis in the retina and cornea in experimental glaucoma model. *Int. J. Exp. Pathol.* 100, 330–336. <https://doi.org/10.1111/iep.12334>.
- Esparza, L., Nogue, M.R., 2005. Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats. *J. Pineal Res.* 39, 129–136. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00225.x>.
- Etheridge, M.L., Campbell, S.A., Erdman, A.G., Haynes, C.L., Wolf, S.M., McCullough, J., 2013. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved

nanomedicine products. *Nanomedicine* 9, 1-14.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013>.

ETPN Association, 2021. ETPN - Nanomedicine European Technology Platform. What is Nanomedicine? <https://etp-nanomedicine.eu/>.

F

Fagan, X.J., Al-Qureshi, S., 2013. Intravitreal injections: A review of the evidence for best practice. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 41, 500-507. <https://doi.org/10.1111/ceo.12026>.

Falavarjani, K.G., Nguyen, Q.D., 2013. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: A review of literature. *Eye* 27, 787-794. <https://doi.org/10.1038/eye.2013.107>.

Farid, R.M., El-Salamouni, N.S., El-Kamel, A.H., El-Gamal, S.S., 2017. Chapter 16: Lipid-based nanocarriers for ocular drug delivery. *Micro and Nano Technologies, Nanostructures for Drug Delivery. Elsevier.* 495-522. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-46143-6.00016-6>.

Feghali, J.G., Jin, J.C., Odom, J. V., 1991. Effect of short-term intraocular pressure elevation on the rabbit electroretinogram. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 2184-2189. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2160453>.

Fernández-Sánchez, L., Bravo-Osuna, I., Lax, P., Arranz-Romera, A., Maneu, V., Esteban-Pérez, S., Pinilla, I., Del Mar Puebla-González, M., Herrero-Vanrell, R., Cuenca, N., 2017. Controlled delivery of tauroursodeoxycholic acid from biodegradable microspheres slows retinal degeneration. *PLoS One* 12, e0177998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177998>.

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, 1-4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0).

Fiscella, R.G., 2008. *Ophthalmic Drug Formulations, Fifth Edit. ed, Clinical Ocular Pharmacology.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-7576-5.50007-0>.

Fischer, T.W., Hardkop, L.H., 2013. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J. Pineal Res.* 54, 303-312. <https://doi.org/10.1111/jpi.12018>.

Fong, L.P., de la Maza, M.S., Rice, B.A., Kupferman, A.E., Foster, C.S., 1991. Immunopathology of Scleritis. *Ophthalmology* 98, 472-479. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(91\)32280-2](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(91)32280-2).

Formica, M.L., 2018. *Sistemas nanoparticulados basados en lipidops destinados al tratamiento de neovascularizaciones oculares.* [Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba]. <https://rdu.unc.edu.ar/>.

Forrester, J. V., Dick, A.D., McMenemy, P.G., Roberts, F., Pearlman, E., 2016. Chapter 1: Anatomy of the eye and orbit. *The Eye, Fourth Edition. ed, Elsevier Inc.* 1-102.e2. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-5554-6.00001-0>.

Forssmann, W.G., Ito, S., Weihe, E., Aoki, A., Dym, M., Fawcett, D.W., 1977. An improved perfusion fixation method for the testis. *Anat. Rec.* 188, 307-314. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880304>.

Fortune Business Insights, 2019. Market Research Report. Glob. Drug Deliv. Syst. Mark. <https://www.fortunebusinessinsights.com/drug-delivery-systems-market-103070>.

- Foulkes, R., Man, E., Thind, J., Yeung, S., Joy, A., Hoskins, C., 2020. The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: Current and future perspectives. *Biomater. Sci.* 8, 4653–4664. <https://doi.org/10.1039/d0bm00558d>.
- Foureaux, G., Franca, J.R., Nogueira, J.C., De Oliveira Fulgêncio, G., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Yoshida, M.I., Fuscaldi, L.L., Fernandes, S.O.A., Cardoso, V.N., Cronemberger, S., Faraco, A.A.G., Ferreira, A.J., 2015. Ocular inserts for sustained release of the angiotensin-converting enzyme 2 activator, diminazene aceturate, to treat glaucoma in rats. *PLoS One* 10, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133149>.
- Francine Behar-Cohen, Gelizé, E., Jonet, L., Lassiaz, P., 2020. Anatomie de la rétine. *Med Sci (Paris)* 36, 594–599. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020094>.
- Friedman, D.S., 2007. Epidemiology of Angle-closure Glaucoma. *Journal of Current Glaucoma Practice* 1, 1–3. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10008-1039>.
- Fuma, S., Shimazawa, M., Imamura, T., Kanno, Y., Takano, N., Tsuruma, K., Hara, H., 2016. Neuroprotective Effect of Ocular Hypotensive Drugs: Latanoprost/Timolol in Combination Are More Effective than Each as Monotherapy in RGC-5. *Biol. Pharm. Bull.* 39, 192–198. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00584>.

G

- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., Cosco, D., 2021. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Front. Pharmacol.* 12, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>.
- Gan, L., Han, S., Shen, J., Zhu, J., Zhu, C., Zhang, X., Gan, Y., 2010. Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving preocular retention and ocular bioavailability. *Int. J. Pharm.* 396, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.015>.
- Garbarino-Pico, E., Carpentieri, A.R., Contin, M.A., Keller Sarmiento, M.I., Brocco, M.A., Panzetta, P., Rosenstein, R.E., Caputto, B.L., Guido, M.E., 2004. Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *J. Biol. Chem.* 279, 51172–51181. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309248200>.
- Garg, G., Saraf, Shailendra, Saraf, Swarnlata, 2007. Cubosomes: An Overview. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 350–353. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.350>.
- Gaudana, R., Ananthula, H.K., Parenky, A., Mitra, A.K., 2010. Ocular drug delivery. *AAPS J.* 12, 348–360. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9183-3>.
- George C.Y. Chiou, Marsha A. McLaughlin, 1984. Studies on the Involvement of Melatonergic. Mechanism in Intraocular Pressure Regulation. *Ophthalmic Res.* 16, 302–306. <https://doi.org/10.1159/000265334>.
- Gerstle, C.L., Anderson, D.R., Hamasaki, D.I., 1973. Pressure Effect on ERG and Optic Nerve Conduction of Visual Impulse: Short-Term Effects in Owl Monkeys. *Arch. Ophthalmol.* 90, 121–124. <https://doi.org/10.1001/archopht.1973.01000050123010>.
- Gholizadeh, S., Wang, Z., Chen, X., Dana, R., Annabi, N., 2021. Advanced nanodelivery platforms for topical ophthalmic drug delivery. *Drug Discov. Today* 26, 1437–1449. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.02.027>.
- Giarmoukakis, A., Labiris, G., Sideroudi, H., Tsimali, Z., Koutsospyrou, N., Avgoustakis, K., Kozobolis, V., 2013. Biodegradable nanoparticles for controlled subconjunctival delivery of latanoprost acid: In vitro and in vivo evaluation. Preliminary results. *Exp. Eye Res.* 112, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.04.007>.

- Gibaldi, M. y Perrier, D., 1982. Pharmacokinetics, revised and expanded 2nd Edition. ed, Marcel Dekker, New York, USA. *Biopharm. Drug Dispos.* 15, 45–109. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510040213>.
- Grant, R.L., 2019. Toxicology in Vitro Primary cultures of rabbit corneal epithelial cells as an experimental model to evaluate ocular toxicity and explore modes of action of toxic injury. *Toxicol. Vitr.* 64, 104634. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104634>.
- Grassiri, B., Zambito, Y., Bernkop-Schnürch, A., 2021. Strategies to prolong the residence time of drug delivery systems on ocular surface. *Adv. Colloid Interface Sci.* 288, 102342. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102342>.
- Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 922–935. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00176-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00176-8).
- Griffith, W., Biol, a J., 1979. Potent and Specific Inhibition of Glutathione Synthesis by Buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* 254, 7558–7560.
- Guo, C., Wang, J., Cao, F., Lee, R.J., Zhai, G., 2010. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discov. Today* 15, 1032–1040. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.09.006>.
- Gupta, N., Ang, L.C., De Tilly, L.N., Bidaisee, L., Yücel, Y.H., 2006. Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 674–678. <https://doi.org/10.1136/bjo.2005.086769>.

H

- H. Ljusberg-Wahren, L. Nyberg, K.L., 1996. Dispersion of the cubic liquid crystalline phase: Structure, preparation and functionality aspects. *Chim. Oggi-chemistry Today* 14, 40–43.
- Hafner, A., Lovrić, J., Romić, M.D., Juretić, M., Pepić, I., Cetina-Čižmek, B., Filipović-Grčić, J., 2015. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur. J. Pharm. Sci.* 75, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.04.003>.
- Harasymowycz, P., Hutnik, C., Rouland, J.F., Negrete, F.J.M., Economou, M.A., Denis, P., Baudouin, C., 2021. Preserved Versus Preservative-Free Latanoprost for the Treatment of Glaucoma and Ocular Hypertension: A Post Hoc Pooled Analysis. *Adv. Ther.* 38, 3019–3031. <https://doi.org/10.1007/s12325-021-01731-9>.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S.R., 2005. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr. Metab.* 2, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-22>.
- Hare, W.A., Wheeler, L., 2009. Experimental glutamatergic excitotoxicity in rabbit retinal ganglion cells: Block by memantine. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 2940–2948. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2103>.
- Harper, M.M., Adamson, L., Blits, B., Bunge, M.B., Grozdanic, S.D., Sakaguchi, D.S., 2009. Brain-derived neurotrophic factor released from engineered mesenchymal stem cells attenuates glutamate- and hydrogen peroxide-mediated death of staurosporine-differentiated RGC-5 cells. *Exp. Eye Res.* 89, 538–548. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.05.013>.
- Hartl, D., de Luca, V., Kostikova, A., Laramie, J., Kennedy, S., Ferrero, E., Siegel, R., Fink, M.,

- Ahmed, S., Millholland, J., Schuhmacher, A., Hinder, M., Piali, L., Roth, A., 2021. Translational precision medicine: an industry perspective. *J. Transl. Med.* 19, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02910-6>.
- Hildebrand, G.D., Fielder, A.R., 2011. Anatomy and physiology of the retina. ed, Springer, Berlin, Heidelberg. *Pediatr. Retin.* 39–65. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12041-1_2.
- Hirao, M., Oku, H., Goto, W., Sugiyama, T., Kobayashi, T., Ikeda, T., 2004. Effects of adenosine on optic nerve head circulation in rabbits. *Exp. Eye Res.* 79, 729–735. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.08.008>.
- Hoffy, N.M. El, Azim, E.A.A., Hathout, R.M., Fouly, M.A., Elkheshen, S.A., 2020. Glaucoma: Management and Future Perspectives for Nanotechnology-Based Treatment Modalities. *Eur. J. Pharm. Sci.* 158, 105648. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105648>.
- Hollinger, M.A., Editor, S., Methods, I., Brousseau, P., Payette, Y., Logan, A., Weiss, B., 2004. Drug Delivery Systems, 2nd edition. ed, CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420040142>.
- Honary, S., Zahir, F., 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Trop J Pharm Res* 12, 265–273. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>.
- Hsiao, M.H., Chiou, S.H., Larsson, M., Hung, K.H., Wang, Y.L., Liu, C.J.L., Liu, D.M., 2014. A temperature-induced and shear-reversible assembly of latanoprost-loaded amphiphilic chitosan colloids: Characterization and in vivo glaucoma treatment. *Acta Biomater.* 10, 3188–3196. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.016>.
- Huang, J., Peng, T., Li, Y., Zhan, Z., Zeng, Y., Huang, Y., Pan, X., Wu, C.-Y., Wu, C., 2017. Ocular Cubosome Drug Delivery System for Timolol Maleate: Preparation, Characterization, Cytotoxicity, Ex Vivo, and In Vivo Evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 18, 2919–2926. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0763-8>.

-
- Ikonen, M., Murtomäki, L., Kontturi, K., 2010. Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 78, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.017>.
- Imperiale, J.C., Acosta, G.B., Sosnik, A., 2018. Polymer-based carriers for ophthalmic drug delivery. *J. Control. Release* 285, 106–141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.031>.
- Irache, J.M., 2008. Nanomedicina: Nanopartículas con aplicaciones médicas. *An. Sist. Sanit. Navar.* 31, 7–10. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272008000100001>.
- Izzotti, A., Bagnis, A., Saccà, S.C., 2006. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat. Res.* 612, 105–14. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.11.001>.

-
- J. H. Draize, G. Woodard, H. O. Calvery, 1944. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377–390.
- Jabbehdari, S., Handa, J.T., 2020. Oxidative stress as a therapeutic target for the

- prevention and treatment of early age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 66, 123-440. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2020.09.002>.
- Jabłonowska, E., Matyszewska, D., Nazaruk, E., Godlewska, M., Gawęł, D., Bilewicz, R., 2021. Lipid membranes exposed to dispersions of phytantriol and monoolein cubosomes: Langmuir monolayer and HeLa cell membrane studies. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1865, 129738. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129738>.
- Janagam, D.R., Wu, L., Lowe, T.L., 2017. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 122, 31-64. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.04.001>.
- Januleviciene, I., Siaudvytyte, L., Barsauskaite, R., 2012. Ophthalmic drug delivery in glaucoma - A review. *Pharmaceutics* 4, 243-251. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010243>.
- Jiang, C., Moore, M.J., Zhang, X., Klassen, H., Langer, R., Young, M., 2007. Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol. Vis.* 24, 1783-1792.
- Jiang, X., Varma, R., Wu, S., Torres, M., 2012. Baseline risk factors that predict open-angle glaucoma in a population: The LALES. *Ophthalmology* 119, 2245-2253. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted.

K

- Kalser, M.H., 1971. Medium chain triglycerides. *Adv. Intern. Med.* 17, 301-322. <https://doi.org/10.1056/nejm196905082801906>.
- Karami, Z., Hamidi, M., 2016. Cubosomes: Remarkable drug delivery potential. *Drug Discov. Today* 21, 789-801. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.004>.
- Karslıoğlu, M.Z., Hoşal, M.B., Tekeli, O., 2015. Periocular changes in topical bimatoprost and latanoprost use. *Turkish J. Med. Sci.* 45, 925-930. <https://doi.org/10.3906/sag-1405-23>.
- Khattab, A., Marzok, S., Ibrahim, M., 2019. Development of optimized mucoadhesive thermosensitive pluronic based in situ gel for controlled delivery of Latanoprost: Antiglaucoma efficacy and stability approaches. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 53, 101134. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101134>.
- Kim, B., Hochella, M.F., 2015. Chapter 4: Analytical Transmission Electron Microscopy and Scanning Transmission Electron Microscopy. *Techniques for the Characterization of Nanomaterial Composition, Phase and Crystallinity. Frontiers of Nanoscience.* ed, Elsevier. 8, 123-152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099948-7.00004-X>.
- Klimko, P.G., Sharif, N.A., 2019. Discovery, characterization and clinical utility of prostaglandin agonists for the treatment of glaucoma. *Br. J. Pharmacol.* 176, 1051-1058. <https://doi.org/10.1111/bph.14327>.
- Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A., 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25-35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9).
- Korsmeyer, R.W., Peppas, N.A., 1981. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *J. Memb. Sci.* 9, 211-227. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)80265-3](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)80265-3).
- Kotler, M., Rodriguez, C., Rm, S., Antolin, I., Sdinz, R.M., Antolin, Isaac, Menhdez-peldez, A., 2007. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain

- cortex. *Journal of Pineal Research* 24, 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1998.tb00371.x>.
- Krumrey, M., 2019. Chapter 3.2.2: Small angle x-ray scattering (SAXS). Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles. ed, *Elsevier Inc.* 173–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00011-0>.
- Kuntsche, J., Horst, J.C., Bunjes, H., 2011. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 417, 120–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.001>.
- Kwok, A.K.H., Lai, T.Y.Y., Yeung, C.K., Yeung, Y.S., Li, W.W.Y., Chiang, S.W., 2005. The effects of indocyanine green and endoillumination on rabbit retina: An electroretinographic and histological study. *Br. J. Ophthalmol.* 89, 897–900. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.061093>.

L

- Ladbury, J.E., 2001. Isothermal titration calorimetry: Application to structure-based drug design. *Thermochim. Acta* 380, 209–215. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00674-8](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00674-8).
- Lalu, L., Tambe, V., Pradhan, D., Nayak, K., Bagchi, S., Maheshwari, R., Kalia, K., Tekade, R.K., 2017. Novel nanosystems for the treatment of ocular inflammation: Current paradigms and future research directions. *J. Control. Release* 268, 19–39. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.035>.
- Laurentiis, A. De, Sande, P.H., 2016. Neuroprotective effect of melatonin in experimental optic neuritis in rats. *Journal of Pineal Research* 60, 360–372. <https://doi.org/10.1111/jpi.12318>.
- Lavik, E., Kuehn, M.H., Kwon, Y.H., 2011. Novel drug delivery systems for glaucoma. *Eye* 25, 578–586. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.82>.
- Lee, P.I., 1985. Kinetics of drug release from hydrogel matrices. *J. Control. Release* 2, 277–288. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(85\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0168-3659(85)90051-3).
- Leonardi, A., Bucolo, C., Drago, F., Salomone, S., 2015. Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. *Int. J. Pharm.* 478, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.032>.
- Letchford, K., Burt, H., 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.11.009>.
- Levin, L.A., Crowe, M.E., Quigley, H.A., Cordeiro, M.F., Donoso, L.A., Liao, Y.J., Libby, R.T., Masland, R.H., Nickells, R.W., Sieving, P.A., Sommer, A., 2017. Neuroprotection for glaucoma: Requirements for clinical translation. *Exp. Eye Res.* 157, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.12.005>.
- Levine, M.W., 2011. Vision | Inner Retina and Ganglion Cells, *Encyclopedia of Fish Physiology.* ed, Academic Press 123–130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00092-7>.
- Li, F., Shi, X., 2013. Cubic phase nanoparticles for sustained release of ibuprofen: formulation, characterization, and enhanced bioavailability study. *Int J Nanomedicine* 8, 845–854. <https://doi.org/10.2147/IJN.S40547>.
- Li, J., Qiao, Y., Wu, Z., 2017. Nanosystem trends in drug delivery using quality-by-design

- concept. *J. Control. Release* 256, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.019>.
- Linda A. Felton, P., 2013. Remington Essentials of Pharmaceutics, First edit. ed, Pharmaceutical Press, UK. <https://doi.org/10.5688/ajpe7710233>.
- Liu, J.H.K., Dacus, A.C., 1991. Endogenous Hormonal Changes and Orcadian Elevation of Intraocular Pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 496-500.
- Liu, M., Chen, M., Xu, P., Yang, Z., 2015. Nanostructured Cubosomes as a Platform for Oral Drug Delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 313–321. <https://doi.org/10.2174/1389201016666150118134805>.
- Liu, Q., Dong, Y., Hanley, T.L., Boyd, B.J., 2013. Sensitivity of Nanostructure in Charged Cubosomes to Phase Changes Triggered by Ionic Species in Solution. *Langmuir* 29, 14265–14273. <https://doi.org/10.1021/la402426y>.
- Liu, S., Jones, L., Gu, F.X., 2012. Nanomaterials for Ocular Drug Delivery. *Macromol. Biosci.* 12, 608–620. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100419>.
- Llabot, J., Palma, S.D., Allemandi, D., Scientific, N., 2008. Nanopartículas poliméricas sólidas. *Nuestra Farmacia* 53, 40-47. https://www.researchgate.net/publication/236679562_Nanopartículas_poliméricas_sólidas.
- Lokhande, A.B., Mishra, S., Kulkarni, R.D., Naik, J.B., 2013a. Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer. *J. Pharm. Res.* 7, 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.04.049>.
- Lokhande, A.B., Mishra, S., Kulkarni, R.D., Naik, J.B., 2013b. Influence of different viscosity grade ethylcellulose polymers on encapsulation and in vitro release study of drug loaded nanoparticles. *J. Pharm. Res.* 7, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.04.050>.
- López-Aleman, A., Montés-Micó, R., García-Valldecabres, M., 1999. Ocular physiology and artificial tears. *Optometry* 70, 455–460.
- Lu, X.Y., Wu, D.C., Li, Z.J., Chen, G.Q., 2011. Chapter 7: Polymer nanoparticles, 1st ed, Progress in Molecular Biology and Translational Science. ed, Academic Press. 104, 299-323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3>.
- Lundmark, P., Pandi-perumal, S.R., Srinivasan, V., Cardinali, D.P., 2006. Role of melatonin in the eye and ocular dysfunctions. *Visual Neuroscience* 23, 853–862. <https://doi.org/10.1017/S0952523806230189>.

M

- M. Escribano, B., L. Colin-Gonzalez, A., Santamaria, A., Tunez, I., 2014. The Role of Melatonin in Multiple Sclerosis, Huntington's Disease and Cerebral Ischemia. *CNS Neurol. Disord.* 13, 1096–1119. <https://doi.org/10.2174/1871527313666140806160400>.
- Maclver, S., Stout, N., Ricci, O., 2021. New considerations for the clinical efficacy of old and new topical glaucoma medications. *Clin. Exp. Optom.* 104, 350–366. <https://doi.org/10.1080/08164622.2021.1877529>.
- Madheswaran, T., Kandasamy, M., Bose, R.J., Karuppagounder, V., 2019. Current potential and challenges in the advances of liquid crystalline nanoparticles as drug delivery systems. *Drug Discov. Today* 24, 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.004>.

- Maher, P., Hanneken, A., 2005. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 749–757. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0883>.
- Marco, E.D., Jha, J.C., Sharma, A., Wilkinson-Berka, J.L., Jandeleit-Dahm, K.A., de Haan, J.B., 2015. Are reactive oxygen species still the basis for diabetic complications? *Clin. Sci.* 129, 199–216. <https://doi.org/10.1042/CS20150093>.
- Marshak, D.W., 2009. Retinal ganglion cells: Anatomy. *En cycl. Neurosci.* ed, Academic Press. 211–218. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00897-4>.
- Martinez-de-la-Casa, J.M., Donde, S., Wierzbowska, J., 2019. Latanoprost, a balanced prostaglandin. *Expert Rev. Ophthalmol.* 14, 61–72. <https://doi.org/10.1080/17469899.2019.1567331>.
- Matsuo, M., Kuse, Y., Takahashi, K., Kuwahara, K., Tanito, M., Kaidzu, S., Shimazawa, M., Hara, H., Ohira, A., 2019. Carteolol hydrochloride reduces visible light-induced retinal damage in vivo and BSO/glutamate-induced oxidative stress in vitro. *J. Pharmacol. Sci.* 139, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.11.010>.
- McGoogan, J.M., Cassone, V.M., 1999. Circadian regulation of chick electroretinogram: Effects of pinealectomy and exogenous melatonin. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, 1418–1427. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.5.R1418>.
- Meng, T., Kulkarni, V., Simmers, R., Brar, V., Xu, Q., 2019. Therapeutic implications of nanomedicine for ocular drug delivery. *Drug Discov. Today* 24, 1524–1538. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.006>.
- Michael H. Ross, W.P., 2007. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*, 5ta edición. ed, Médica Panamericana S.A.
- Moghimpour, E., Salimi, A., Yousefvand, T., 2017. Preparation and evaluation of celecoxib nanoemulsion for ocular drug delivery. *Asian J. Pharm.* 11, 543–550. <http://dx.doi.org/10.22377/ajp.v11i03.1457>.
- Mohammed, A., Elshaer, A., Sareh, P., Elsayed, M., Hassanin, H., 2020. Additive Manufacturing Technologies for Drug Delivery Applications. *Int. J. Pharm.* 580, 119245. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119245>.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385, 113–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.
- Morrison, P.W.J., Khutoryanskiy, V. V., 2014. Advances in ophthalmic drug delivery. *Ther. Deliv.* 5, 1297–1315. <https://doi.org/10.4155/tde.14.75>.
- Morrone, L.A., Rombolà, L., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Nucci, C., Russo, R., 2015. Natural compounds and retinal ganglion cell neuroprotection, 1st edition. *Progress in Brain Research*. ed, Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.05.004>.
- Morsi, N.M., Mohamed, M.I., Refai, H., El Sorogy, H.M., 2014. Nanoemulsion as a novel ophthalmic delivery system for acetazolamide. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 227–236.
- Mozaffarieh, M., Flammer, J., 2013. New insights in the pathogenesis and treatment of normal tension glaucoma. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.10.001>.
- Musumeci, T., Bucolo, C., Carbone, C., Pignatello, R., Drago, F., Puglisi, G., 2013. Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits. *Int. J. Pharm.* 440, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.014>.

- Nacucchio, M.N., Manzo, R.H., 2019. Tópicos de Tecnología Farmacéutica, Volumen 1. ed, Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires.
- Nagai, N., Tsukamoto, A., Kotake, T., Ito, Y., Okamoto, N., Shimomura, Y., 2016. Evaluation of Rabbit Model for Glaucoma Study: Drug Interaction in a Rabbit Model Instilled with Ophthalmic Preparation containing Latanoprost and Timolol. *Iryo Yakugaku (Japanese J. Pharm. Heal. Care Sci.)* 42, 645–650. <https://doi.org/10.5649/jjphcs.42.645>.
- Nagarwal, R.C., Kant, S., Singh, P.N., Maiti, P., Pandit, J.K., 2009. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *J. Control. Release* 136, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.12.018>.
- Naik, S., Pandey, A., Lewis, S.A., Rao, B.S.S., Mutalik, S., 2020. Neuroprotection: A versatile approach to combat glaucoma. *Eur. J. Pharmacol.* 881, 173208. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173208>.
- National Science and Technology Council and Society, 2014. National Nanotechnology Initiative. Strategic Plan. ed, National Nanotechnology Initiative. <https://www.nano.gov/>.
- Nayak, K., Misra, M., 2018. A review on recent drug delivery systems for posterior segment of eye. *Biomed. Pharmacother.* 107, 1564–1582. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.138>.
- Nell, G.K.H., Medicine, P., Medicine, P., 2018. Chapter 1: The specialty of pharmaceutical medicine. *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research*. ed, Elsevier Inc. 3-15. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802103-3.00001-8>.
- Nickelk, R.W., Zack, D.J., 1996. Apoptosis in ocular disease: a molecular overview. *Ophthalmic Genetics* 17, 145-165. <https://doi.org/10.3109/13816819609057889>.
- Nikezić, A.V.V., Bondžić, A.M., Vasić, V.M., 2020. Drug delivery systems based on nanoparticles and related nanostructures. *Eur. J. Pharm. Sci.* 151, 105412. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105412>.
- Nordmann, J., Auzanneau, N., Ricard, S., Berdeaux, G., 2003. Vision related quality of life and topical glaucoma treatment side effects. *Health Qual Life Outcomes* 1, 75. <https://doi.org/10.1186/1477-7525-1-75>.
- Nuschke, A.C., Farrell, S.R., Levesque, J.M., Chauhan, B.C., 2015a. Assessment of retinal ganglion cell damage in glaucomatous optic neuropathy: Axon transport, injury and soma loss. *Exp. Eye Res.* 141, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.006>.



- Ogden, T.E., 2006. *Clinical Electrophysiology. Retina*, Fifth edition. ed, Elsevier Inc. 1, 202-226. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00008-4>.
- Orihasi, M., Shima, Y., Tsuneki, H., Kimura, I., 2005. Potent reduction of intraocular pressure by nipradilol plus latanoprost in ocular hypertensive rabbits. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 65–68. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.65>.
- Osborne, N.N., Núñez-Álvarez, C., Joglar, B., del Olmo-Aguado, S., 2016. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur. J. Pharmacol.* 787, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.032>.
- Ozeki, T., Akiyama, Y., Takahashi, N., Tagami, T., Tanaka, T., Fujii, M., Okada, H., 2012. Development of a novel and customizable two-solution mixing type spray nozzle for one-step preparation of nanoparticle-containing microparticles. *Biol. Pharm.*

Bull. 35, 1926–1931. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00273>.

P

- Pakzad, Y., Fathi, M., Omid, Y., Zamanian, A., Mozafari, M., 2020. Chapter 21: Nanotechnology for ocular and optic drug delivery and targeting. *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*. ed, Elsevier Ltd. 499-523. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102985-5.00021-8>.
- Paolino, D., Fresta, M., 2006. Drug Delivery Systems. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. ed, J.G. Webster. <https://doi.org/10.1002/0471732877.emd274>.
- Patel, M., Herzlich, A.A., Sauer T., Chan, C., 2016. Retinal Anatomy and Pathology. *Retinal Pharmacotherapeutics. Dev Ophthalmol.* 55, 7–17. <https://doi.org/10.1159/000431128>.
- Patel, S.S., Spencer, C.M., 1996. Latanoprost. A review of its pharmacological properties, clinical efficacy and tolerability in the management of primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs and Aging* 9, 363–378. <https://doi.org/10.2165/00002512-199609050-00007>.
- Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F., Campos, E.V.R., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, L.S., Diaz-Torres, L.A., Grillo, R., Swamy, M.K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H.-S., 2018. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology* 16, 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- Peña, C.M.G., Espinosa, V.M., Cortezón, A.G., 2012. Validación de un método cromatográfico para la cuantificación de latanoprost 50 µg/mL en el colirio de producción nacional. *Rev. Cuba. Farm.* 46, 394–401.
- Pfizer Health, A., 2020. Product monograph XALATAN Latanoprost Ophthalmic Solution, 50 mcg/mL. *Toxicology* 1–55. <https://www.pfizermedicalinformation.com/en-us/xalatan>.
- Phu, J., Khuu, S.K., Agar, A., Domadiou, I., Ng, A., Kalloniatis, M., 2020. Visualizing the Consistency of Clinical Characteristics that Distinguish Healthy Persons, Glaucoma Suspect Patients, and Manifest Glaucoma Patients. *Ophthalmol. Glaucoma* 3, 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.ogla.2020.04.009>.
- Piguet, B., Wells, J.A., Palmvang, I.B., Wormald, R., Chisholm, I.H., Bird, A.C., 1993. Age-related Bruch's membrane change: A clinical study of the relative role of heredity and environment. *Br. J. Ophthalmol.* 77, 400–403. <https://doi.org/10.1136/bjo.77.7.400>.
- Prencipe, M., Perossini, T., Brancoli, G., Perossini, M., 2020. The photopic negative response (PhNR): measurement approaches and utility in glaucoma. *Int. Ophthalmol.* 40, 3565–3576. <https://doi.org/10.1007/s10792-020-01515-0>.

Q

- Quinteros, D., Vicario-de-la-Torre, M., Andrés-Guerrero, V., Palma, S., Allemandi, D., Herrero-Vanrell, R., Molina-Martínez, I.T., 2014. Hybrid formulations of liposomes and bioadhesive polymers improve the hypotensive effect of the melatonin analogue 5-MCA-NAT in rabbit eyes. *PLoS One* 9, e110344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110344>.

Quinteros, D.A., Ferreira, L.M., Schaffazick, S.R., Palma, S.D., Allemandi, D.A., Cruz, L., 2016. Novel Polymeric Nanoparticles Intended for Ophthalmic Administration of Acetazolamide. *J. Pharm. Sci.* 105, 3183–3190. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.06.023>.

R

- Rajabalaya, R., Musa, M.N., Kifli, N., David, S.R., 2017. Oral and transdermal drug delivery systems: Role of lipid-based lyotropic liquid crystals. *Drug Des. Devel. Ther.* 11, 393–406. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S103505>.
- Ratnaparkhi M. P., Gupta J.P., 2013. Sustained Release Oral Drug Delivery System - An Overview. *Int. J. Pharma Res. Rev.* 2, 11–21.
- Raymond C Rowe, Paul J Sheskey, Marian E Quinn, 2009. Medium-chain Triglycerides, in: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition. ed, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, UK. 454.
- Reimondez-Troitiño, S., Csaba, N., Alonso, M.J., De La Fuente, M., 2015a. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95, 279–293. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.019>.
- Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1995.tb00133.x>
- Rivera, J.C., Dabouz, R., Noueihed, B., Omri, S., Tahiri, H., Chemtob, S., 2017. Ischemic Retinopathies: Oxidative Stress and Inflammation. <https://doi.org/10.1155/2017/3940241>.
- Rizwan, S.B., Mcburney, W.T., Young, K., Hanley, T., Boyd, B.J., Rades, T., Hook, S., 2013. Cubosomes containing the adjuvants imiquimod and monophosphoryl lipid A stimulate robust cellular and humoral immune responses. *J. Control. Release* 165, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.10.020>.
- Rojas-aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., González-Méndez, I., 2016. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química* 27, 286–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>.
- Romic, M.D., Juretic, M., Pepic, I., Hafner, A., Lovric, J., 2015. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 75, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.04.003>.
- Rosaralis, T., Santiesteban, P., Marta, D., Plasencia, F., Santiesteban, D.R., 2005. Electrorretinograma . Valores normales con diferentes protocolos de estudio. *Rev Cubana Oftalmol* 18. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21762005000200004&lng=es&nrm=iso.
- Rosenstein, R., Pandi-perumal, S.R., Srinivasan, V., Spence, D.W., Gregory, M., Cardinali, D.P., 2010. Melatonin as a therapeutic tool in ophthalmology: implications for glaucoma and uveitis. *Journal of Pineal Research* 49, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00764.x>.
- Ross, M.H., Wojciech Pawlina, 2015. Histología texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular, 7ma edición. ed, Wolters Kluwer, Barcelona, España.
- Rowe, R.C., Paul J. Sheskey, Quinn, M.E., 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients,

6th edition. ed, Pharmaceutical Press. London, UK.

S

- Sabogal-Guáqueta, A.M., Hobbie, F., Keerthi, A., Oun, A., Kortholt, A., Boddeke, E., Dolga, A., 2019. Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity. *Biomed. Pharmacother.* 118, 109295. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109295>.
- Saettone, M.F., Bucci, M., Speiser, P., 1987. Ophthalmic Drug Delivery. Biopharmaceutical, Technological and Clinical Aspects, FIDIA RESE. ed, Springer Science, New York, USA. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4175-9>.
- Sahoo, S.K., Dilnawaz, F., Krishnakumar, S., 2008. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov. Today* 13, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.10.021>.
- Samaha, D., Shehayeb, R., Kyriacos, S., 2009. Modeling and comparison of dissolution profiles of diltiazem modified-release formulations. *Dissolution Technol.* 16, 41–46. <https://doi.org/10.14227/DT160209P41>.
- Saniples, J.R., Krause, G., Lewy, A.J., 2000. Effect of melatonin on intraocular pressure. *Current Eye Research* 7, 649–653. <https://doi.org/10.3109/02713688809033192>.
- Schuhmacher, A., Wilisch, L., Kuss, M., Kandelbauer, A., Hinder, M., Gassmann, O., 2021. R&D efficiency of leading pharmaceutical companies – A 20-year analysis. *Drug Discovery Today* 26, 1784–1789. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.005>.
- Sharma, O.P., Patel, V., Mehta, T., 2016. Nanocrystal for ocular drug delivery: hope or hype. *Drug Deliv. Transl. Res.* 6, 399–413. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0292-0>.
- Shi, Z., Li, S.K., Charoenputtakun, P., Liu, C.Y., Jasinski, D., Guo, P., 2018. RNA nanoparticle distribution and clearance in the eye after subconjunctival injection with and without thermosensitive hydrogels. *J. Control. Release* 270, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.028>.
- Shirlee Tan, B.S.P., David Schubert, B.S.P., Pamela Maher, B.S.P., 2001. Oxytosis: A Novel Form of Programmed Cell Death. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 497–506. <https://doi.org/10.2174/1568026013394741>.
- Singh, M., Bharadwaj, S., Lee, K.E., Kang, S.G., 2020. Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. *J. Control. Release* 328, 895–916. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.025>.
- Siu, A.W., Maldonado, M., Sanchez-Hidalgo, M., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2006. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J. Pineal Res.* 40, 101–109. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00304.x>.
- Sjöquist, B., Stjernschantz, J., 2002. Ocular and systemic pharmacokinetics of latanoprost in humans. *Surv. Ophthalmol.* 47, S6. [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(02\)00302-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(02)00302-8).
- Smith, B.J., Wang, X., Chauhan, B.C., Côté, P.D., Tremblay, F., 2014. Contribution of retinal ganglion cells to the mouse electroretinogram. *Doc. Ophthalmol.* 128, 155–168. <https://doi.org/10.1007/s10633-014-9433-2>.
- Souto, E.B., Dias-Ferreira, J., López-Machado, A., Ettcheto, M., Cano, A., Espuny, A.C., Espina, M., Garcia, M.L., Sánchez-López, E., 2019. Advanced formulation approaches for ocular drug delivery: State-of-the-art and recent patents. *Pharmaceutics* 11, 1–

29. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090460>.
- Stegemann, S., 2016. The future of pharmaceutical manufacturing in the context of the scientific, social, technological and economic evolution. *Eur. J. Pharm. Sci.* 90, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.11.003>.
- Stenhoff, A., Steadman, L., Nevitt, S., Benson, L., White, R., Hill, B., 2020. Acceptance and commitment therapy and subjective wellbeing: A systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials in adults. *J. Context. Behav. Sci.* 18, 105398. <https://doi.org/10.1016/j.jcbs.2020.08.008>.
- Stjernschantz, J.W., 2001. From PGF2 α -isopropyl ester to latanoprost: A review of the development of xalatan: The proctor lecture. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1134–1145.
- Strier, S.E., 1997. The additive effect of latanoprost 0.005% in patients on maximally tolerated medical therapy. *Clin. Eye Vis. Care* 9, 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0953-4431\(97\)10015-7](https://doi.org/10.1016/S0953-4431(97)10015-7).
- Subramaniam, M.D., Iyer, M., Nair, A.P., Venkatesan, D., Mathavan, S., Eruppakotte, N., Kizhakkilach, S., Chandran, M. kumar, Roy, A., Gopalakrishnan, A.V., Vellingiri, B., 2020. Oxidative stress and mitochondrial transfer: A new dimension towards ocular diseases. *Genes Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.11.020>.
- Sur, S., Rathore, A., Dave, V., Reddy, K.R., Chouhan, R.S., Sadhu, V., 2019. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures and Nano-Objects* 20, 100397. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100397>.
- Suwannateep, N., Banlunara, W., Wanichwecharungruang, S.P., Chiablaem, K., Lirdprapamongkol, K., Svasti, J., 2011. Mucoadhesive curcumin nanospheres: Biological activity, adhesion to stomach mucosa and release of curcumin into the circulation. *J. Control. Release* 151, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.011>.
- Swetledge, S., Jung, J.P., Carter, R., Sabliov, C., 2021. Distribution of polymeric nanoparticles in the eye: implications in ocular disease therapy. *J. Nanobiotechnology* 19, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00745-9>.

T

- Tapply, I., Broadway, D.C., 2021. Improving adherence to topical medication in patients with glaucoma. *Patient Prefer. Adherence* 15, 1477–1489. <https://doi.org/10.2147/PPA.S264926>.
- Tartara, L.I., Leavi, S., Campana, V., Allemandi, D., Palma, S., 2018. Comparación de dos modelos experimentales de glaucoma en conejos. *Rev. Fac. Cienc. Med.* 75, 25. <https://doi.org/10.31053/1853-0605.v75.n1.16811>.
- Tártara, L.I., Quinteros, D.A., Saino, V., Allemandi, D.A., Palma, S.D., 2012. Improvement of acetazolamide ocular permeation using ascorbyl laurate nanostructures as drug delivery system. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 28, 102–109. <https://doi.org/10.1089/jop.2011.0104>.
- Tezel, G., 2006. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. *Prog. Retin. Eye Res.* <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.07.003>.
- The U.S. Food and Drug Administration, 2020. Nanotechnology: Over a Decade of

- Progress and Innovation: A Report by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). ed, U.S. Department of Health and Human Services FDA. <https://www.fda.gov/science-research/fda-grand-rounds/nanotechnology-over-decade-progress-and-innovation-fda-08132020-08132020>.
- The U.S. Food and Drug Administration, 2011. Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology. *Biotechnol. Law Rep.* 30, 613–616. <https://doi.org/10.1089/blr.2011.9814>.
- Tian, K., Shibata, S., Pahlitzsch, M., Cordeiro, M.F., 2015. Current perspective of neuroprotection and glaucoma. *Clin Ophthalmol* 11, 2109–2118. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S80445>.
- Tilekar, K., Khade, P., Kakade, S., Kotwal, S., Patil, R., 2014. Cubosomes-A Drug Delivery System. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 4, 812–824.
- Tilley, A.J., Drummond, C.J., Boyd, B.J., 2013. Disposition and association of the steric stabilizer Pluronic® F127 in lyotropic liquid crystalline nanostructured particle dispersions. *J. Colloid Interface Sci.* 392, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.09.051>.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., Bannerjee, S.K., 2012. Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharma Investig* 2, 2-11. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>.
- Torchilin, V., 2006. Nanocarriers for Drug Delivery: Needs and Requirements, in: Nanoparticulates as Drug Carriers. ed, Imperial College Press 1–8. https://doi.org/10.1142/9781860949074_0001.
- Tosini, G., Baba, K., Hwang, C.K., Iuvone, P.M., 2012a. Melatonin: An underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp. Eye Res.* 103, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.08.009>.

U

- Ung, L., Pattamatta, U., Carnt, N., Wilkinson-Berka, J.L., Liew, G., White, A.J.R., 2017. Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease. *Clin. Sci. (Lond)* 131, 2865–2883. <https://doi.org/10.1042/CS20171246>.
- United States Pharmacopeial Convention, 2008. USP 31–NF 26, ed, United States Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, USA.

V

- Varma, D.K., Simpson, S.M., Rai, A.S., Ahmed, I.I.K., 2017. Undetected angle closure in patients with a diagnosis of open-angle glaucoma. *Can. J. Ophthalmol.* 52, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.jcjo.2016.12.010>.
- Veneroso, C., Russel, J., 2013. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J. Pineal Res.* 54, 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01014.x>.
- Vila Jato, J.L., 2007. Nuevos aspectos biofarmacéuticos en nanotecnología farmacéutica. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* 73, 813–832.

W

- Walash, M., El-Shaheny, R., 2016. Fast separation and quantification of three anti-

- glaucoma drugs by high-performance liquid chromatography UV detection. *J. Food Drug Anal.* 24, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.11.006>.
- Wan, J., Wang, S. mei, Gui, Z. ping, Yang, Z. zhuan, Shan, Q. qian, Chu, X. qin, Gui, S. ying, Yang, Y., 2018. Phytantriol-based lyotropic liquid crystal as a transdermal delivery system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 125, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.018>.
- Wang, X., Li, T., Ma, B., Zhao, Z., Ni, L., Zhang, R., Niu, S., Liu, C., 2021. Melatonin attenuates restenosis after vascular injury in diabetic rats through activation of the Nrf2 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 548, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.02.070>.
- Wang, Yao, Xu, K., Zhang, H., Zhao, J., Zhu, X., Wang, Yangzheng, Wu, R., 2014. Retinal ganglion cell death is triggered by paraptosis via reactive oxygen species production: A brief literature review presenting a novel hypothesis in glaucoma pathology. *Mol. Med. Rep.* 10, 1179–1183. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2346>.
- Washington, N., Washington, C., Wilson, C.G., 2001. *Physiological Pharmaceutics. Barriers to drug absorption.* 2nd edition. ed, CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203483701>.
- Weinreb, R.N., Aung, T., Medeiros, F.A., 2015. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma. *JAMA Intern. Med.* 311, 1901–1911. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192>.
- Weng, Y., Liu, J., Jin, S., Guo, W., 2017. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. *Acta Pharm. Sin. B* 7, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.09.001>.
- Wilcox, D.K., Bruner, L.H., 1990. In Vitro Alternatives for Ocular Safety Testing: An Outline of Assays and Possible Future Developments. *Altern. to Lab. Anim.* 18, 117–128. <https://doi.org/10.1177/026119299001800115.1>.
- Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., Car, H., 2012. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Reports* 64, 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5).
- Wong, A.B.C., Wang, M.T.M., Liu, K., Prime, Z.J., Danesh-Meyer, H. V., Craig, J.P., 2018. Exploring topical anti-glaucoma medication effects on the ocular surface in the context of the current understanding of dry eye. *Ocul. Surf.* 16, 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2018.03.002>.
- Wu, G., Lee, K.Y.C., 2009. Interaction of poloxamers with liposomes: An isothermal titration calorimetry study. *J. Phys. Chem. B* 113, 15522–15531. <https://doi.org/10.1021/jp906331m>.

X

- Xu, H., Chen, M., 2016. Targeting the complement system for the management of retinal inflammatory and degenerative diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 787, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.001>.
- Xu, Q., Kambhampati, S.P., Kannan, R.M., 2013. Nanotechnology approaches for ocular drug delivery. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* 20, 26–37. <https://doi.org/10.4103/0974-9233.106384>.
- Xu, Y., Lu, X., Hu, Y., Yang, B., Tsui, C.K., Yu, S., Lu, L., Liang, X., 2018. Melatonin attenuated retinal neovascularization and neuroglial dysfunction by inhibition of HIF-1 α -VEGF pathway in oxygen-induced retinopathy mice. *J. Pineal Res.* 64, e12473.

<https://doi.org/10.1111/jpi.12473>.

Y

- Yadav, K.S., Rajpurohit, R., Sharma, S., 2019. Glaucoma: Current treatment and impact of advanced drug delivery systems. *Life Sci.* 221, 362–376. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.029>.
- Yang, D., Zhang, M., Huang, X., Fang, F., Chen, B., Wang, S., Cai, J., Shi, X., Qu, J., Geng, Y.-J., 2010. Protection of retinal vasculature by losartan against apoptosis and vasculopathy in rats with spontaneous hypertension. *J. Hypertens.* 28, 510–519. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328333663f>.
- Yang, Z., Tan, Y., Chen, M., Dian, L., Shan, Z., Peng, X., Wu, C., 2012. Development of amphotericin B-loaded cubosomes through the SolEmuls technology for enhancing the oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech* 13, 1483–1491. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9876-2>.
- Yi, C., Pan, X., Yan, H., Guo, M., Pierpaoli, W., 2005. Effects of melatonin in age-related macular degeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1057, 384–392. <https://doi.org/10.1196/annals.1356.029>.
- Yu, H.-S., Yee, R.W., Howes, K.A., Reiter, R.J., 1990. Diurnal rhythms of immunoreactive melatonin in the aqueous humor and serum of male pigmented rabbits. *Neurosci Lett.* 116, 309–314. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90092-n](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90092-n).

Z

- Zierden, H.C., Josyula, A., Shapiro, R.L., Hsueh, H.T., 2020. Avoiding a Sticky Situation: Bypassing the Mucus Barrier for Improved Local Drug Delivery. *Trends Mol. Med.* 27, 436–450. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.12.001>.
- Zr, L., Rj, R., Cs, O., Cataractogenesis, D.Y.P., 1997. Cataractogenesis and lipid peroxidation in newborn rats treated with buthionine sulfoxirnine: Preventive actions of melatonin. *J Pineal Res.* 22, 117–123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1997.tb00312.x>.



**PRODUCCIÓN
CIENTÍFICA**

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES GENERADAS A PARTIR DE ESTA TESIS

- ***Protective role of melatonin on retinal ganglionar cell: In vitro and in vivo evidences.*** Carolina Del Valle Bessone, Hugo Diaz Fajreldines, Gabriela Edit Diaz de Barboza, Nori Graciela Tolosa de Talamoni, Daniel Allemandi, Agata Carpentieri, Daniela Alejandra Quinteros. *Life Sciences*, Volume 218. Pág. 233-240. (2019)
- ***Neuroprotective effect of melatonin loaded in ethylcellulose nanoparticles applied topically in a retinal degeneration model in rabbits.*** Carolina Del Valle Bessone, Sofia M. Martinez, José D. Luna, Marilyn A. Marquez, María L. Ramírez, Daniel A. Allemandi, Ágata R. Carpentieri, Daniela A. Quinteros. *Experimental Eye Research*, Volume 200. Pág. 108222. (2020)
- ***Latanoprost-loaded phytantriol cubosomes for the treatment of glaucoma.*** Carolina Del Valle Bessone, Daniela Alejandra Quinteros, Seyedeh Parinaz Akhlaghi, Luis Ignacio Tártara, Watson Loh, Daniel Alberto Allemandi. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 160. Pág. 105748. (2021)
- ***COVID-19: epidemiological situation of Argentina and its neighbor countries after three months of pandemic.*** María Laura Ramírez, Sofía Mickaela Martínez, Carolina Del Valle Bessone, Daniel Alberto Allemandi, Daniela Alejandra Quinteros. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, Pág. 1-23. (2021)