

Evaluación del efecto terapéutico de una nueva formulación hipotensora en un modelo de glaucoma en conejos

Mariana Andrea Guaycochea^{a*}, Carolina del Valle Bessone^{b*}, Lucía Bacigalupo^a, David Cremonuzzi^c, Daniel Allemandi^b, Vilma Campana^a, Luis Ignacio Tártara^{a-b}

^a Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

^b Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

^c 1º Cátedra de Patología, Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Recibido: 10 de junio de 2021.

Aprobado: 3 de julio de 2021.

Autor correspondiente

Dr. Luis Ignacio Tártara
Santa Rosa 1085
(5000) Córdoba, Argentina.
i.tartara@gmail.com

Oftalmol Clin Exp (ISSN 1851-2658)
2021; 14(3): 171-180.

Resumen

Objetivo: Evaluar y comparar la eficacia y toxicidad de una formulación hipotensora ocular compuesta por cristales líquidos liotrópicos nanométricos (cubosomas) (CLL) y latanoprost 0,005% (LT) en un modelo de glaucoma en conejos.

Materiales y métodos: Se utilizaron 24 conejos hembra divididos en cuatro grupos: 1) normotensos oculares (NTO) tratados con CLL-LT; 2) NTO tratados con LT comercial (Louten® solución); 3) hipertensos oculares (HTO) tratados con CLL-LT, y 4) HTO tratados con LT comercial.

La inducción del modelo de glaucoma se realizó con una inyección de 0,1 ml de α -quimiotripsina (3 mg/ml) en cámara posterior del ojo derecho. La forma de administración del tratamiento fue con una única inyección subconjuntival (50 μ l) de las formulaciones en estudio. Se evaluaron midiendo la PIO una vez al día durante una semana al igual que la valoración clínica. Los datos se analizaron utilizando test t para muestras independientes, considerando $p < 0,05$ para diferencias significativas.

Resultados: Los CLL-LT disminuyeron la PIO en conejos HTO ~20% y en NTO ~25%. En comparación con la solución comercial, CLL-LT generó un mayor descenso ($p < 0,05$). La irritación inicial pos-inyección cedió en 24 horas.

* Ambos autores han contribuido por igual en este trabajo de investigación.

Conclusión: El CLL-LT resultó ser más efectivo para reducir la PIO que la solución comercial en conejos NTO y con HTO, sin presentar daños permanentes en la superficie ocular.

Palabras clave: glaucoma experimental, farmacoterapia ocular, cubosomas, latanoprost, hipertensión ocular.

Evaluation of therapeutic effect of a new hypotensive formulation in a glaucoma model in rabbits

Abstract

Purpose: To evaluate and compare the efficacy and toxicity of an ocular hypotensive formulation composed of nanometric lyotropic liquid crystals (cubosomes) (CLL) and latanoprost 0.005% (LT) in a glaucoma model in rabbits.

Materials and methods: 24 female rabbits were used, divided into 4 groups: 1. Ocular normotensive (NTO) treated with CLL-LT; 2. NTO treated with commercial LT (Louten® solution); 3. With ocular hypertensive (HTO) treated with CLL-LT and 4. With HTO treated with commercial LT. The induction of the glaucoma model was performed with an injection of 0.1 ml of α -chymotrypsin (3 mg/ml) in the posterior chamber of the right eye. The treatment administration method was with a single subconjunctival injection (50 μ l) of the study formulations. They were evaluated by measuring the IOP once a day for a week as well as the clinical assessment. The data were analyzed using the *t* test for independent samples, considering $p < 0.05$ for significant differences.

Results: The CLL-LT decreased IOP in rabbits HTO ~ 20%, and in NTO ~ 25%. Compared with the commercial solution, CLL-LT generated a greater decrease ($p < 0.05$). The initial post-injection irritation subsided within 24 hours.

Conclusion: CLL-LT turned out to be more effective in reducing IOP than the commercial solution in NTO and OHT rabbits, without presenting permanent damage to the ocular surface.

Key words: experimental glaucoma; ocular drug therapy; cubosomes; latanoprost; ocular hypertension.

Avaliação do efeito terapêutico de uma nova formulação hipotensora em um modelo de glaucoma em coelhos

Resumo

Objetivo: Avaliar e comparar a eficácia e a toxicidade de uma formulação hipotensora ocular composta por cristais líquidos liotrópicos nanométricos (cubossomos) (CLL) e latanoprost 0,005% (LT) em um modelo de glaucoma em coelhos.

Materiais e métodos: Foram utilizadas 24 coelhas divididas em quatro grupos: 1) normotensos oculares (NTO) tratado com CLL-LT; 2) NTO tratado com LT comercial (Louten® solução); 3) hipertensos oculares (HTO) tratados com CLL-LT, e 4) HTO tratados com LT comercial. A indução do modelo de glaucoma foi realizada com injeção de 0,1 ml de α -quimiotripsina (3 mg/ml) na câmara posterior do olho direito. O método de administração do tratamento foi com uma única injeção subconjuntival (50 μ l) das formulações em estudo. Eles foram avaliados medindo a PIO uma vez por dia durante uma semana, bem como a avaliação clínica. Os dados foram analisados por meio do teste *t* para amostras independentes, considerando $p < 0,05$ para diferenças significativas.

Resultados: Os CLL-LT diminuíram a PIO em coelhos HTO ~ 20% e em NTO ~ 25%. Comparado com a solução comercial, o CLL-LT gerou uma redução maior ($p < 0,05$). A irritação inicial pós-injeção diminuiu em 24 horas.

Conclusão: O CLL-LT mostrou-se mais eficaz na redução da PIO do que a solução comercial em coelhos NTO e HTO, sem apresentar dano permanente à superfície ocular.

Palavras chave: glaucoma experimental, farmacoterapia ocular, cubossomos, latanoprost, hipertensão ocular.

Introducción

El glaucoma describe un grupo de trastornos oculares de etiología multifactorial cuyo factor común es la neuropatía óptica progresiva con pérdida creciente del campo visual y posterior

ceguera¹. Se estima que existen 70 millones de personas que padecen esta enfermedad en el mundo². La presión intraocular (PIO) es uno de los factores de riesgo que está fuertemente asociado con la aparición y la progresión de la enfermedad³. Por esto, los tratamientos que disminuyen la PIO y estabilizan el flujo ocular son imprescindibles para los pacientes que padecen glaucoma⁴. Para la comprensión de la causa y progresión de una enfermedad, como así también para la evaluación de la eficacia de nuevos tratamientos, la utilización de modelos biológicos para la investigación experimental representa una herramienta valiosa. La pertinencia, utilidad y validez de cualquier modelo debe ser, en parte, basado en la similitud con la enfermedad humana⁵. El uso de animales, especialmente conejos, en patologías oculares son muy atractivos por su potencialidad experimental: manipulación, corta vida útil, bajo costo y estructura ocular anatómica y fisiológica relativamente comparable al humano⁶. En trabajos previos, nuestro grupo de investigación describió cambios evolutivos en el modelo de glaucoma similares a los hallazgos clínicos, tales como aumento de la PIO, modificación en la estructura corneal, atrofia del iris, excavación de la papila óptica y disminución del reflejo pupilar⁷. Actualmente en el mercado existen diferentes alternativas de tratamientos hipotensores, la mayoría en forma de colirios. El descenso de la PIO permite ralentizar o, en el mejor de los casos, detener los cambios patológicos característicos de la enfermedad⁸. La finalidad de los tratamientos farmacológicos se basa en la modificación de dos mecanismos fisiológicos: disminuir la producción del humor acuoso, o aumentar el flujo de salida como lo hacen los análogos de las prostaglandinas⁹. Estos últimos son los fármacos de elección para el inicio del tratamiento del glaucoma ya que tienen marcada efectividad en la reducción y estabilización de las fluctuaciones diarias de la PIO. Sin embargo, estas drogas presentan gran cantidad de reacciones adversas locales evidentes, tales como hiperemia conjuntival, pigmentación del iris, hipertriosis y ojo seco, entre otros¹⁰. Además, el uso diario intensifica los efectos secundarios, disminuyendo la tolerancia y adherencia del paciente a la terapia.

El diseño de nuevas estrategias para la mejora de la farmacoterapia en oftalmología está orientado a sostener el tiempo de contacto del fármaco con la córnea u otro tejido idóneo para la absorción (conjuntiva o esclera), reducir la tasa de eliminación del principio activo y aumentar la permeabilidad del fármaco (*enhancers*). En este propósito trabaja un grupo de investigadores de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba: el diseño de nuevos sistemas portadores de fármacos destinados a la terapia de patologías oculares como el glaucoma¹¹⁻¹³. Para abordar este problema y asegurar una mejora en la eficacia terapéutica con respecto de la vía de administración, se propuso el desarrollo de cristales líquidos liotrópicos (CLL) nanométricos (cubosomas) como un nuevo sistema portador de fármacos para latanoprost (LT). Los cubosomas se obtuvieron a partir del lípido polar fitantriol y cargados con latanoprost en una concentración de 0,005%. Según testeos *in vitro*, la liberación de latanoprost fue muy lenta, evidenciando un perfil de liberación sostenida¹⁴.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad y toxicidad de CLL-LT en un modelo experimental en conejos y compararlas con la solución comercial (Louten® solución, Poen, Buenos Aires, Argentina).

Materiales y métodos

Se realizó un estudio experimental en el cual se utilizaron 24 conejos hembra albinos, tipo New Zealand de 2.00-3.00 kg, de 6 meses de edad. Los animales dispusieron de alimento balanceado y agua *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada $21 \pm 5^\circ\text{C}$, expuestos a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad; ubicados en jaulas individuales con enriquecimiento ambiental, en el bioterio de la Escuela Práctica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Se tomaron las medidas pertinentes para minimizar el malestar y el dolor en los animales. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las pautas establecidas por el CICUAL (FCM-UNC), coincidentes con las guías

para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicadas por el *National Institute of Health (NIH)*. El presente proyecto ha sido aprobado por *CICUAL-FCM-UNC (N° 44/2017)*.

Procedimientos, anestesia y eutanasia

Para anestesia general se utilizó una mezcla de ketamina (3-5 mg/kg)/xilacina (0,5-1 mg/kg) y para anestesia local: proparacaína 0,5% en forma de colirio (Anestalcon®). Luego de los procedimientos invasivos, se les administró antibiotico-terapia (Tobramicina-Fotex®) y antiinflamatorios no esteroides en gotas (Nevanac®) a modo de profilaxis. Los animales se sacrificaron por inhalación de dióxido de carbono en campana de acrílico, previa anestesia general.

Todas las formulaciones fueron administradas a una dosis de 50 µl, en los ojos derechos de los animales en forma inyectable (subconjuntival), en la conjuntiva bulbar superior.

Modelo de glaucoma

La inducción del modelo de hipertensión ocular (HTO) se realizó mediante una inyección de 0,1 ml de α -quimiotripsina (C425-250 mg de laboratorio Sigma) en una concentración de 3 mg/ml según la técnica desarrollada y descrita en publicaciones previas de nuestro equipo⁷. El ojo izquierdo no fue intervenido con la intención de resguardar el bienestar del animal.

Tratamientos farmacológicos

- Análogos de prostaglandina comercial 0,005% (Louten® solución).
- Sistemas nanoparticulados-cubosomas con latanoprost 0,005% (CLL-LT)¹⁴. Latanoprost se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos).

Diseño experimental

Se dividieron los conejos en cuatro grupos (n=24).

Grupo 1: normotensos oculares (NTO) tratados con CLL-LT.

Grupo 2: NTO tratados con latanoprost (Louten® solución).

Grupo 3: HTO tratados con CLL-LT.

Grupo 4: HTO tratados con latanoprost (Louten® solución).

Evaluación de los tratamientos

La PIO se midió con un tonómetro de rebote TonoVet (Tiolat, Helsinki, Finlandia), estableciendo como tiempo cero a la lectura basal tomada 30 minutos antes de la administración subconjuntival. Las determinaciones de la PIO se realizaron una vez al día a la misma hora para evitar las variaciones circadianas, durante 1 semana. El valor de PIO registrado es el promedio de 6 tomas consecutivas siempre y cuando el tonómetro no haya registrado desviación estándar o una desviación insignificante (menor o igual a 1 mmHg).

Las evaluaciones de irritación ocular se realizaron diariamente, antes y después de la administración de los tratamientos hasta la completa desaparición de los signos. La valoración clínica se llevó a cabo en párpados, conjuntiva, córnea e iris, mediante observaciones externas con iluminación adecuada, y se proporcionó información adicional mediante examen de biomicroscopía con lámpara de hendidura (Huvitz HIS 5000, Corea del Sur) con cámara fotográfica integrada en la lámpara (Canon réflex EOS rebel T6, Tokio, Japón). Adicionalmente y con el propósito de mejorar la imagen panorámica del globo ocular y sus anexos se usó un adaptador de imágenes oculares para Smart Phone Quik Vue® VPA-100 (Shanghai Visu Science Meditech, Shanghai, China) con un aumento de 10X y emisión de luz blanca o azul complementaria. Todas las imágenes se digitalizaron para realizar un análisis clínico comparativo más detallado con el fin de disminuir la subjetividad del estudio clínico.

Para poner de manifiesto lesiones corneales y conjuntivales se instiló una gota de fluoresceína sódica 0,25% en la superficie ocular de cada ojo a evaluar. Todas las observaciones y los análisis cualitativos fueron realizados por un oftalmólogo. La tabla 1 detalla una puntuación diseñada de acuerdo con el grado de toxicidad observado.

Tabla 1. Test de irritación ocular.

| Test de irritación ocular | Puntaje |
|---|-------------------|
| Enrojecimiento conjuntival | |
| Vasos sanguíneos normales | 0 |
| Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (inyección conjuntival) | 1 |
| Enrojecimiento difuso, vasos sanguíneos no fácilmente discernibles | 2 |
| Ojo rojo | 3 |
| Quemosis | 4 |
| Opacidad corneal | |
| Sin opacidad ni queratitis | 0 |
| Opacidad o queratitis difusa, detalles del iris claramente visibles | 1 |
| Áreas translúcidas fácilmente discernibles, detalles del iris ligeramente oscurecidos | 2 |
| Áreas opalescentes, no hay detalles visibles del iris, tamaño de la pupila apenas discernible | 3 |
| Córnea opaca, iris no discernible a través de la opacidad | 4 |
| Área de la córnea 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 | 0 |
| Turbidez del humor acuoso | 8 |
| Profundización de las criptas y/o congestión y edema del iris con inyección periquerática | 10 |
| Hemorragia, destrucción del iris, pupila o pupila no reactiva a la luz | 12 |
| Puntaje Total | |
| 0 a 2 | no hay irritación |
| 3 a 7 | leve |
| 8 a 12 | moderado |
| 13 o mayor | grave |

El valor otorgado al tejido o compartimento ocular dañado está dado en relación con el grado de la secuela producida. De esta forma, además de los posibles efectos secundarios provocados por el fármaco, también se tuvo en cuenta el daño causado por la inyección¹⁵. El seguimiento se realizó hasta constatar la normalidad en los tejidos oculares.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente en el *software Infostat* versión actualizada 2020. Los resultados de toxicidad y PIO se analizaron con el test T de *student* para muestras independientes, considerando significativas las diferencias para $p < 0,05$.

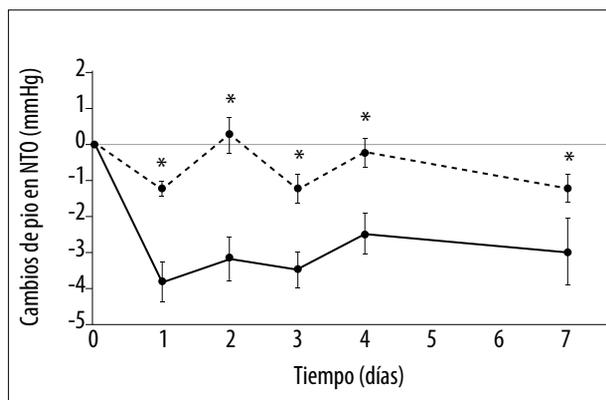


Figura 1. Cada punto representa el descenso de PIO \pm Error Estándar (EE) en el grupo de conejos NTO tratados con Louten® solución (línea discontinua) y CLL-LT (línea continua) en los diferentes días de tratamiento. El asterisco (*) representa diferencia significativa con el punto correspondiente al mismo tiempo entre los grupos ($p<0,05$).

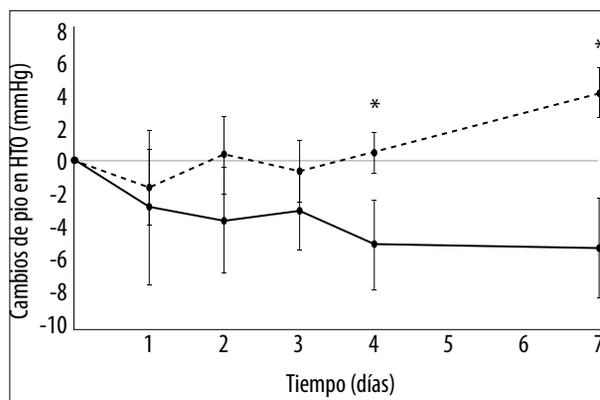


Figura 2. Cada punto representa descenso de PIO \pm EE en conejos HTO tratados con Louten® solución (línea discontinua) y CLL-LT (línea continua) en los diferentes días de tratamiento. El asterisco (*) representa diferencia significativa con el punto correspondiente al mismo tiempo entre los grupos ($p<0,05$).

Tabla 2. Valores de PIO en mmHg \pm Error Estándar (EE) y porcentaje máximo de descenso.

| Grupo | Valor medio de PIO tiempo 0 (mmHg) \pm EE | PIO max descenso (mmHg) \pm EE | Porcentaje max de descenso (%) |
|---------------------|---|----------------------------------|--------------------------------|
| 1) NTO CLL-LT | 14,3 \pm 0,76 | 10,5 \pm 0,56 | 26,5 |
| 2) NTO Louten® sol. | 12,8 \pm 0,20 | 11,5 \pm 0,24 | 10,1 |
| 3) HTO CLL-LT | 27 \pm 4,89 | 21,7 \pm 4,86 | 19,7 |
| 4) HTO Louten® sol. | 24,2 \pm 3,1 | 22,5 \pm 3,95 | 7,1 |

Resultados

Presión intraocular

Los resultados de la variación de PIO se presentan en las figuras 1 y 2, comparando los grupos NTO y HTO respectivamente, con cada uno de los tratamientos administrados. En la figura 1 se observa un descenso estadísticamente significativo con respecto de la solución comercial, de aproximadamente un 25% en el día 1 y se mantuvo estable durante los 7 días de observación. En la figura 2, conejos hipertensos, el descenso fue más lento observándose una diferencia significativa entre grupos recién en el día 4 y logrando un máximo de descenso de aproximadamente un 20%. En la tabla 2 se comparan los valores iniciales (tiempo 0) de PIO y el pico de descenso en cada grupo.

Toxicidad farmacológica

Al momento de la administración subconjuntival del medicamento, los conejos no manifestaron reacciones de incomodidad o dolor. En todos los grupos se observó una irritación inicial postinyección que ocasionó cambios leves, especialmente a nivel de la conjuntiva, próximo al lugar de inoculación de las formulaciones. Este efecto cedió rápidamente a las 24 horas posteriores al tratamiento. A los 5 días en todos los grupos no se observaba irritación ocular. En la figura 3 se observa el puntaje de irritación ocular alcanzada en cada grupo tratado al primer día de estudio. En todos los casos la irritación observada fue leve.

En las fotografías que se muestran en la figura 4 se puede observar que el componente irritativo de CLL-LT fue levemente superior que el de la

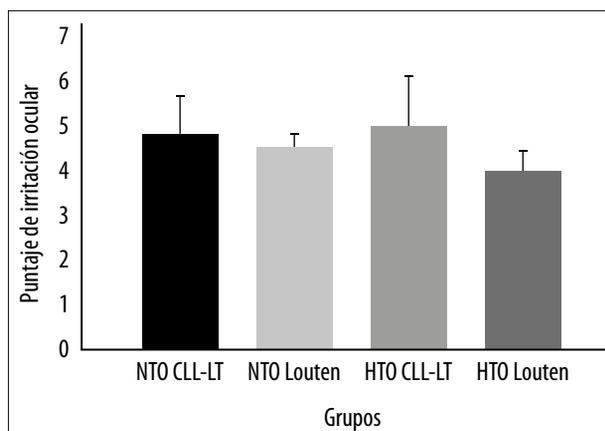


Figura 3. Cada barra representa el puntaje de irritación \pm el EE del día 1 de la observación oftalmológica. La comparación entre grupos no presentó diferencias estadísticas ($p > 0,05$).

formulación comercial, aunque no hay diferencias estadísticas y el tiempo de duración de la irritación no fue permanente. También se evidencia en las imágenes del lado derecho (fig. 4a-c) con respecto de las imágenes del lado izquierdo (fig. 4b-d) que el tiempo de permanencia en el espacio subconjuntival de la formulación CLL-LT es superior al de la muestra comercial.

Discusión

En el presente trabajo experimental se evaluó la eficacia y tolerancia de un nuevo compuesto nanoparticulado de liberación prolongada (CLL-cubosomas), inyectable en el espacio subconjuntival para la vehiculización de latanoprost 0,005% como principio activo para el tratamiento del glaucoma. Para determinar si CLL-LT tenía mayor actividad hipotensora que el análogo comercial (Louten® solución) y evaluar posibles cambios irritativos oculares, se llevaron a cabo estudios *in vivo* en conejos albinos. Basándonos en estudios previos⁷ se indujo hipertensión ocular a un grupo de animales con α -quimiotripsina con el fin de provocar un glaucoma. Con el objetivo de lograr suficiente información y generar un proceso comparativo, todos los ensayos se repitieron en conejos normotensos.



Figura 4. Fotografías de la superficie ocular realizadas posterior a la administración subconjuntival de CLL-LT y a la formulación comercial: a) CLL-LT día 1; b) CLL-LT día 4; c) Louten® solución día 1; d) Louten® solución día 4.

El desarrollo de nuevas plataformas de liberación prolongada de fármacos pretende mejorar la adherencia al tratamiento sin disminuir la eficacia del principio activo y espaciar sustancialmente su posología. La falta de adherencia se considera uno de los mayores problemas en el avance de las enfermedades crónicas como el glaucoma¹⁶ y los factores involucrados son olvidos, negación de la enfermedad y aumento de procesos irritativos locales y/o sistémicos, producto de la posología diaria continua¹⁷. Por lo tanto, el aumento de la adherencia terapéutica en patologías crónicas podría tener un gran impacto en salud, incluso igual o mayor que cualquier mejora de los avances de tratamientos específicos que se producen¹⁸.

El desarrollo de un sistema inyectable pretende restar cierta autonomía de tratamiento por parte del paciente, ofreciendo una potencial nueva alternativa para aquellos que deban realizar cambios importantes en sus rutinas por períodos cortos y no puedan seguir adecuadamente con su tratamiento habitual con colirios.

La efectividad del compuesto CLL-LT se estudió midiendo la PIO, mientras que la toxicidad se evaluó mediante la inspección de la superficie ocular con instrumental óptico oftalmológico.

Yadav y colaboradores reportaron un ensayo en ratones hipertensos tratados con un implante gelificante *in situ* termosensible, con liberación

sostenida de bimatoprost 0,003% mediante inyección subconjuntival, logrando un pico de descenso de PIO de aproximadamente el 20% que se mantuvo por 9 días¹⁹. Si bien el descenso coincide con nuestros resultados, se debe tener en cuenta que estos autores usaron un fármaco más potente²⁰, otra especie animal y la dosis inyectada fue 30 µl de un compuesto termosensible que puede tener el inconveniente de la gelificación antes de su inyección. Por otro lado, Fahmy *et al.* desarrollaron portadores de fármacos liposomales para el suministro ocular de latanoprost y timoquinona e investigaron su eficacia en la disminución de la PIO²¹. En concordancia con nuestro trabajo, utilizaron la misma especie animal, la misma forma de administración, dosis y el mismo principio activo. Lograron un descenso del 30% a las 10 horas, normalizándose a los 4 días. Si bien generaron un mayor descenso porcentual, cabe destacar, que la inducción de glaucoma en conejos fue mediante inyección subconjuntival de dexametasona, y la toma de PIO se hizo con un tonómetro analógico (Schiotz), cuya fidelidad es menor al tonómetro digital (iCare®) utilizado en nuestra investigación.

Cheng *et al.* desarrollaron un hidrogel inyectable subconjuntival termosensible de quitosano/gelatina/fosfato de glicerol como un sistema de liberación sostenida de latanoprost para el tratamiento del glaucoma, logrando un descenso significativo de la PIO durante 8 días con la primera inyección²². Del mismo modo que Fahmy, Cheng también utilizó un modelo de glaucoma en conejos con la variante que la inyección fue de triamcinolona en forma intravítrea; importante diferencia con nuestro modelo inducido con la inyección de α -quimiotripsina. Ambos autores demostraron descensos —al igual que nuestros resultados— de la PIO no mayores a 10 días.

En otra publicación encabezada por Natarajan y colaboradores lograron disminuir la PIO aproximadamente un 35% por 90 días con una sola inyección de un sistema compuesto por liposomas egg-fosfatidilcolina cargados con latanoprost²³. Los resultados demuestran un efecto porcentual mayor y más prolongado que los obtenidos en la presente investigación.

Por otro lado, en el estudio clínico piloto realizado por Wong *et al.* participaron pacientes con hipertensión ocular y glaucoma, los autores evaluaron la seguridad y eficacia de una inyección subconjuntival única de latanoprost nanoliposomal y obtuvieron como resultado que la aplicación fue bien tolerada por los pacientes con una reducción significativa de la PIO $\geq 20\%$ ($p = 0.001$ a 0.049) hasta 3 meses después de la inyección²⁴. Este trabajo piloto demuestra que la inyección subconjuntival de un medicamento para tratamiento crónico es factible y bien tolerada. Si bien no es adecuado comparar animales con pacientes, en nuestros conejos de experimentación tampoco se observaron reacciones de defensa o dolor en el momento de la inyección y posterior al mismo.

Cuando comparamos CLL-LT con la solución comercial se observó mayor efecto hipotensor del primero sobre el segundo, tanto en conejos NTO como HTO, y logró mantenerse por debajo de la PIO basal durante 7 días, mientras que la solución comercial perdió efectividad rápidamente. Posiblemente la solución comercial de latanoprost no tenía la capacidad de mantenerse en el espacio subconjuntival por tiempo prolongado, produciéndose un rápido lavado por absorción sistémica del principio activo. Dato evidenciable en el control clínico oftalmológico que se realizaba diariamente en el que se pudo observar CLL-LT en el espacio subconjuntival durante al menos 4 días. Si bien la solución comercial de latanoprost no fue diseñada para ser inyectada en forma subconjuntival, ha sido de utilidad para el desarrollo de un modelo experimental comparativo que demuestra el trabajo de tecnología farmacéutica en el diseño de la nueva formulación. Por otro lado, cuando se comparan las fluctuaciones de la PIO entre conejos NTO e HTO, si bien se observa un descenso en ambos casos, en los conejos que tienen glaucoma el efecto es más tardío. Este efecto se puede justificar debido a los cambios anatómicos y funcionales que se provocaron en el animal para producir el modelo.

Para evaluar la posible irritación se modificó el test de Draize para valorar clínicamente con lámpara de hendidura y fotografía digitales las probables lesiones en la superficie ocular e intraocular²⁵. Antes del estudio, todos los animales mos-

traron una superficie ocular normal con córneas transparentes. Después de la administración subconjuntival de las formulaciones se observó una leve irritación menor del 13% que corresponde a una toxicidad leve en el primer día, con una intensidad decreciente a lo largo del tiempo y una normalización tisular casi completa al cuarto día de administración en todos los grupos. Las lesiones observadas en los ojos de los conejos en su mayoría fueron congestión conjuntival y edema palpebral asociado a la zona conjuntival de la inyección. El “depósito” que se formaba en el espacio subconjuntival —más notorio en las formulaciones con CLL-LT— disminuyó con el tiempo hasta desaparecer por completo al cuarto día de administración. Este comportamiento se correlacionó con la disminución gradual de la irritación observada. Por lo general, cuando se compara la administración tópica con una dosis subconjuntival, se observa una diferencia sustancial en la irritación. Sin embargo, se conoce que la administración tópica a largo plazo con prostaglandinas, debido a su carácter proinflamatorio, produce alteraciones de la superficie ocular tales como: cambios en la estabilidad de la película lagrimal, hiperemia conjuntival, ardor, prurito, sensación de cuerpo extraño y ojo seco. Estas causas se relacionan con el abandono del tratamiento²⁶⁻²⁷.

Conclusiones

El nuevo compuesto nanoparticulado con latanoprost 0.005% (CLL-LT) demostró ser más efectivo que la solución comercial (Louten solución®) para reducir la PIO en conejos durante una semana, sin presentar daños permanentes en la superficie ocular tras su administración inyectable subconjuntival.

Los resultados de este trabajo nos predisponen de forma optimista con respecto de la potencial utilidad de CLL-LT como una nueva alternativa para casos especiales en la vida del paciente, como por ejemplo: viajes, internaciones, cirugías, ya que sería posible reducir la frecuencia de aplicaciones tópicas y seguir manteniendo la adhesión al tratamiento.

Referencias

1. Casson RJ, Chidlow G, Wood JPM *et al.* Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clin Exp Ophthalmol* 2012; 40: 341-349.
2. Bourne RRA, Taylor HR, Flaxman SR *et al.* Number of people blind or visually impaired by glaucoma worldwide and in world regions 1990-2010: a meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0162229.
3. De Moraes CGV, Juthani VJ, Liebmann JM *et al.* Risk factors for visual field progression in treated glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2011; 129: 562-568.
4. Bagnis A, Papadia M, Scotto R, Traverso CE. Current and emerging medical therapies in the treatment of glaucoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 2011; 16: 293-307.
5. Chew J, Werner L, Stevens S *et al.* Evaluation of the effects of hydrodissection with antimiotics using a rabbit model of Soemmering's ring formation. *Clin Exp Ophthalmol* 2006; 34: 449-456.
6. Del Amo EM, Urtti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: clinical predictability and quality of the published data. *Exp Eye Res* 2015; 137: 111-124.
7. Tartara LI, Leavi S, Campana V *et al.* Comparación de dos modelos experimentales de glaucoma en conejos [Comparison of two experimental models of glaucoma in rabbits]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 2018; 75: 25-31.
8. Jonas JB, Aung T, Bourne RR *et al.* Glaucoma. *Lancet* 2017; 390: 2183-2193.
9. Toris CB, Zhan GL, Zhao J *et al.* Potential mechanism for the additivity of pilocarpine and latanoprost. *Am J Ophthalmol* 2001; 131: 722-728.
10. Fellman RL, Sullivan EK, Ratliff M *et al.* Comparison of travoprost 0.0015% and 0.004% with timolol 0.5% in patients with elevated intraocular pressure: a 6-month, masked, multicenter trial. *Ophthalmology* 2002; 109: 998-1008.
11. Aillegas NA, Tártara LI, Caballero G *et al.* Antioxidant status in rabbit aqueous humor after instillation of ascorby laurate-based nanos-

structures. *Pharmacol Rep* 2019; 71: 794-797.

12. Llabot JM, Luis de Redín I, Agüeros M *et al.* In vitro characterization of new stabilizing albumin nanoparticles as a potential topical drug delivery system in the treatment of corneal neovascularization (CNV). *J Drug Deliv Sci Technol* 2019; 52: 379-385.

13. Luis de Redín I, Boiero C, Recalde S *et al.* In vivo effect of bevacizumab-loaded albumin nanoparticles in the treatment of corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 2019; 185: 107697.

14. Bessone CDV, Akhlaghi SP, Tártara LI *et al.* Latanoprost-loaded phytantriol cubosomes for the treatment of glaucoma. *Eur J Pharm Sci* 2021; 160: 105748.

15. Shi Z, Li SK, Charoenputtakun P *et al.* RNA nanoparticle distribution and clearance in the eye after subconjunctival injection with and without thermosensitive hydrogels. *J Control Release* 2018; 270: 14-22.

16. Broadway DC, Cate H. Pharmacotherapy and adherence issues in treating elderly patients with glaucoma. *Drugs Aging* 2015; 32: 569-581.

17. Newman-Casey PA, Robin AL, Blachley T *et al.* The most common barriers to glaucoma medication adherence: a cross-sectional survey. *Ophthalmology* 2015; 122: 1308-1316.

18. Meier-Gibbons F, Berlin MS, Töteberg-Harms M. Influence of new treatment modalities on adherence in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2019; 30: 104-109.

19. Yadav M, Guzman-Aranguez A, Perez de Lara MJ *et al.* Bimatoprost loaded nanovesicular long-acting sub-conjunctival in-situ gelling implant: in vitro and in vivo evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; 103: 109730.

20. Tang W, Zhang F, Liu K, Duan X. Efficacy and safety of prostaglandin analogues in primary open-angle glaucoma or ocular hypertension patients: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98: e16597.

21. Fahmy HM, Saad EAES, Sabra NM *et al.* Treatment merits of latanoprost/thymoquinone: encapsulated liposome for glaucomatus rabbits. *Int J Pharm* 2018; 548: 597-608.

22. Cheng YH, Hung KH, Tsai TH *et al.* Sustained delivery of latanoprost by thermosensitive chitosan-gelatin-based hydrogel for controlling ocular hypertension. *Acta Biomater* 2014; 10: 4360-4366.

23. Natarajan JV, Ang M, Darwitan A *et al.* Nanomedicine for glaucoma: liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 123-131.

24. Wong TT, Novack GD, Natarajan JV *et al.* Nanomedicine for glaucoma: sustained release latanoprost offers a new therapeutic option with substantial benefits over eyedrops. *Drug Deliv Transl Res* 2014; 4: 303-309.

25. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1944; 82: 377-390.

26. Wong ABC, Wang MTM, Liu K *et al.* Exploring topical anti-glaucoma medication effects on the ocular surface in the context of the current understanding of dry eye. *Ocul Surf* 2018; 16: 289-293.

27. Batra R, Tailor R, Mohamed S. Ocular surface disease exacerbated glaucoma: optimizing the ocular surface improves intraocular pressure control. *J Glaucoma* 2014; 23: 56-60.