



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE INSERTOS OCULARES CARGADOS CON DEXAMETASONA COMO NUEVA FORMA FARMACÉUTICA DE USO VETERINARIO PARA EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES INFLAMATORIAS OFTÁLMICAS EN PERROS**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**L.F. KARLA STELLA CONSTANTINO GONZÁLEZ**

**Tutor Principal: DR. JOSÉ JUAN ESCOBAR CHÁVEZ**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

**Comité Tutor: DRA. DINORAH VARGAS ESTRADA**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

**DR. ROBERTO DÍAZ TORRES**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de pertenecer al programa de Maestría, permitiendo así la continuidad de mi formación académica.

La sustentante recibió el apoyo de la Beca 629872 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A los proyectos de investigación:

-PAPIIT IT 200218 “Desarrollo y caracterización de lentillas poliméricas cargadas de sustancias de interés terapéutico para el tratamiento de afecciones oculares”.

-PIAPI 1817 “Diseño, desarrollo y caracterización de sistemas de administración de fármacos por vía oftálmica para uso humano y veterinario”.

- PIAPIME 2.12.27.19 “Manual de prácticas para la Asignatura de Estancia de Investigación III de la Licenciatura en Tecnología en el área Tecnología Farmacéutica (Vías de Administración de Fármacos No Convencionales).

Agradezco a mi tutor principal Dr. José Juan Escobar Chávez y a los miembros de mi comité tutor la Dra. Dinorah Vargas Estrada y el Dr. Roberto Díaz Torres, por todo el apoyo brindado durante el posgrado.

- i. ÍNDICE GENERAL**
- ii. ÍNDICE DE ABREVIATURAS**
- iii. ÍNDICE DE FIGURAS**
- iv. ÍNDICE DE TABLAS**
- v. ÍNDICE DE DIAGRAMAS**

## ÍNDICE GENERAL

1.	GENERALIDADES.....	1
1.1.1	Sistema Nasolagrimal.....	2
1.1.2	Inmunidad Ocular.....	3
1.2	Inflamación Ocular.....	4
1.2.1	Blefaritis.....	5
1.2.2	Conjuntivitis.....	6
1.2.3	Queratitis.....	7
1.2.4	Uveítis.....	10
1.3	Examinación oftálmica y diagnóstico.....	12
1.4	Farmacología clínica y terapéutica.....	13
1.4.1	Administración oftálmica.....	14
1.4.2	Formas farmacéuticas de uso oftálmico.....	16
1.5	Antiinflamatorios.....	18
1.5.1	Glucocorticoides.....	18
1.6	Dexametasona.....	25
1.6.1	Características generales.....	26
2	JUSTIFICACIÓN.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo general.....	29
3.2	Objetivos particulares.....	29
4	HIPÓTESIS.....	30
5	PLAN DE TRABAJO.....	30
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1	Estudios de preformulación y selección de polímeros para la formación de la matriz	32
6.2	Composición de los insertos oculares y estandarización del método de preparación	33

6.3	Diseño experimental de insertos oftálmicos .....	34
6.4	Caracterización de las películas oftálmicas .....	34
6.4.1	Variación de Masa (VM) y Espesor (VE) .....	34
6.4.2	pH .....	34
6.4.3	Tensión a la ruptura (TR) .....	34
6.4.4	% Humedad (HU).....	35
6.4.5	Fuerza de mucoadhesión y tiempo de mucoadhesión <i>ex vivo</i> (FM Y TM)....	36
6.4.6	Hinchamiento (Hi).....	37
6.4.7	Contenido Químico (CQ) .....	38
6.4.8	Liberación <i>in vitro</i> .....	38
6.5	Análisis estadístico y optimización de la formulación .....	38
6.6	Optimización de la formulación.....	39
6.7	Estudios de permeación <i>ex vivo</i> .....	39
6.8	Pruebas de esterilidad .....	40
6.9	Pruebas <i>in vivo</i> .....	40
6.9.1	Determinación de la inflamación producida por instilación de Ácido Araquidónico (AA) y por la colocación del inserto (IO) .....	41
6.9.2	Comparación del efecto antiinflamatorio de DXM en gotas (GO) e Insertos (IO) 42	
7	RESULTADOS.....	44
7.1	Selección de polímeros .....	44
7.2	Composición del inserto oftálmico y estandarización del método de preparación	47
7.3	Caracterización Físicoquímica y evaluación <i>in vitro-ex vivo</i> .....	49
7.3.1	Variación de Masa (VM).....	52
7.3.2	Variación de Espesor (VE).....	52
7.3.3	pH de la formulación .....	53
7.3.4	Tensión a la ruptura (TR) .....	54
7.3.5	% Humedad .....	55
7.3.6	Fuerza de Mucoadhesión (FM) <i>ex vivo</i> .....	56
7.3.7	Tiempo de mucoadhesión (TM) <i>ex vivo</i> .....	57
7.3.8	Contenido Químico.....	59
7.3.9	% Liberación <i>in vitro</i> (PL).....	59
7.3.10	Hinchamiento (HI).....	60

7.4	Optimización de la Formulación.....	64
7.5	Permeaciones <i>ex vivo</i> .....	66
7.6	Esterilidad .....	69
7.7	Pruebas <i>in vivo</i> .....	71
7.7.1	Determinación de la concentración de AA, duración del modelo inflamatorio e inflamación provocada por el IO .....	72
7.7.2	7.8.2. Comparación de Gotas Oftálmicas (GO) e Insertos Oftálmicos (IO) en el modelo de inflamación .....	75
8	DISCUSIÓN.....	78
9	CONCLUSIONES .....	87
10	PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	88
11	REFERENCIAS .....	88
12	ANEXOS .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## ii. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
AST	Agar Soya Trypticaseína
CQ	Contenido Químico
CT	Caldo Tioglicolato
DCC	Diseño Compuesto Central
DXM	Fosfato Sódico de Dexametasona
ERS100	Eudragit® RS100
F1-F11	Formulación 1-11
FL	Fluido Lagrimal
FLS	Fluido Lagrimal Simulado
FM	Fuerza de Mucoadhesión <i>ex vivo</i>
FO	Formulación Óptima
GCs	Glucocorticoides
GR	Receptor para Glucocorticoides
GO	Gotas Oftálmicas
HI	Hinchamiento
HU	Humedad
IO	Insertos Oculares
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
PA	Principio Activo
PF127	Pluronic® F-127
pH	Potencial de Hidrógeno
PL	Liberación
PLP	Película lagrimal precorneana
PMN	Células Polimorfonucleares
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVP K30	Polivinilpirrolidona K-30
SSF	Solución Salina Fisiológica 0.9%
SST	Test de Schirmer
TM	Tiempo de mucoadhesión
TR	Tensión a la rotura
VE	Variación espesor
VM	Variación de masa

### iii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vista frontal del ojo canino (Slatter, 2004).....	1
Figura 2 Estructuras internas del ojo canino (Slatter, 2004). ....	2
Figura 3 Sistema Nasolagrimal (Aroch, Holmberg, Sutton, & Wilcock, 2008).....	3
Figura 4 Blefaritis inmunomediada en un Pastor Alemán adulto (Stades & Gelatt, 2007)....	5
Figura 5 Conjuntivitis alérgica en un Jack Rusell Terrier de 4 años de edad (S. M. Turner, 2010).....	6
Figura 6 Golden Retriever de 5 años de edad con secreción mucopurulenta en el canto medial (S. M. Turner, 2010).....	7
Figura 7 A) Corte transversal de la córnea normal (S. M. Turner, 2010) B) Córnea normal canina. No queratinizada, no pigmentada. D, Membrana de Descemet; E, Epitelio corneal; EN, endotelio corneal; S, estroma corneal (Maggs, Miller, & Ofri, 2013). ....	8
Figura 8 Queratitis pigmentaria bilateral en un Pug joven (S. M. Turner, 2010).....	9
Figura 9 A) Pastor Alemán con queratitis superficial crónica bilateral. B) Ojo derecho de Pastor Alemán con queratitis superficial crónica (Gliger, 2007). ....	10
Figura 10 Se observa líquido acuoso en la cámara anterior en un Schnauzer Miniatura (Matsumoto et al., 2012).....	11
Figura 11 Administración de algunas formas farmacéuticas para uso oftálmico: A) Gotas, B) Ungüento (S. Turner, 2005).....	17
Figura 12 Dispositivos sólidos oftálmicos utilizados en la actualidad para administración en humanos (Herring, 2007).....	18
Figura 13 Estructuras de glucocorticoides y mineralocorticoides sintéticos (Flórez, 2008)	20
Figura 14 Mecanismo de acción general de Glucocorticoides (Lorenzo et al., 2014). ....	26
Figura 15 Estructura química de Fosfato Sódico de Dexametasona .....	27
Figura 16 A) Equipo Texture Analyzer CT3 Brookfield® B) Colocación de la muestra para medir tensión a la rotura (TR) utilizando el accesorio TA-DGF.....	35
Figura 17 A) Cortes de saco conjuntival (1cm de diámetro) colocados con cinta doble cara sobre la pared de un vaso de precipitado. B) Prueba de Tiempo de Mucoadhesión. La formulación se encuentra adherida a la mucosa y la prueba se realizó a 50 rpm/37°C.....	37
Figura 18 A) Celda tipo Franz utilizada para el estudio de permeación ex vivo, en la parte superior se encuentra el compartimento donador y en la inferior el receptor. B) Vista superior de celda tipo Franz donde se observa la formulación colocada sobre la estructura biológica .....	40
Figura 19 A) Diagrama de Pareto para variación de Masa. El diagrama muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud indicando que para la VM el % de PVP K30 y ERS100 son estadísticamente significativos de manera positiva con un nivel de confianza del 95%. B) Fotografía del Inserto Ocular cargado con Dexametasona.....	52
Figura 20 Resultados Variación de Espesor. En el diagrama se observa que todos los valores se encuentran por debajo de la línea vertical por lo cual no son estadísticamente significativos con un 95.0% de nivel de confianza. ....	53
Figura 21 Figura 21. A) Resultados pH. El diagrama indica que dentro de los factores experimentales ERS100® tiene diferencia estadísticamente significativa de manera	



negativa. B) Las mediciones de pH se realizaron a la formulación antes de ser vertida a los moldes.....	54
Figura 22 A) Elongación del inserto durante la prueba. B) Gráfico que representa la tensión a la rotura de los insertos oftálmicos, la máxima tensión es el pico de carga más alto. C) Diagrama de Pareto que muestra el efecto de cada factor sobre la propiedad medida, así como las interacciones de las mismas. En este caso Ningún factor tiene efecto estadísticamente significativo.....	55
Figura 23 Diagrama de Pareto para los resultados de humedad. No hay diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, la interacción principal se da entre la concentración de PVP K30 y ERS® 100. ....	56
Figura 24 A) Fotografía del equipo TextureAnalyzer con la sonda TA-10 midiendo la fuerza de mucoadhesión de los Insertos Oculares (IO) al saco conjuntival. B) Gráfico que representa la adhesión de los insertos oftálmicos al saco conjuntival, el valle representa la fuerza (gF) con que se adhiere el inserto. C)Diagrama de Pareto con los efectos estandarizados, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los niveles y las interacciones. ....	58
Figura 25 A) Resultados tiempo de mucoadhesión, no se observa la desviación estándar debido a que en las repeticiones no hubo desprendimiento del inserto durante el tiempo de observación. B) Fotografía para la determinación del tiempo de mucoadhesión del inserto al saco conjuntival en fluido lagrimal simulado (50 rpm-37°C) .....	59
Figura 26 Resultados Contenido Químico A) Gráfica que muestra los % CQ en un rango ente 95.71-98.77%. B) Diagrama de Pareto que muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa. ....	60
Figura 27 A) Porcentaje de fármaco liberado, en promedio 12.5 % a 50 rpm/37°C. B) En el diagrama se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los factores analizados, sin embargo, la barra de mayor magnitud corresponde a la interacción interacción entre los polímeros que forman la forma farmacéutica. C) Resultados de la liberación del principio activo del Inserto Ocular; la línea punteada representa la dosis terapéutica teórica (DTt) considerando la administración oftálmica cada 2 horas.....	61
Figura 28 A) Resultados de variación de hinchamiento con un promedio de retención de SLF de 0.02 g. B) Diagrama de Pareto en el que ninguna interacción es estadísticamente significativa, sin embargo, las barras indican que el PVPK30 tiene el mayor efecto sobre la propiedad de manera negativa. ....	62
Figura 29 Gráficas de Superficie Respuesta correspondientes a las Variables de estudio del Diseño Experimental. ....	63
Figura 30 Gráfica 3D representando la optimización de la formulación. ....	65
Figura 31 A) % cuantificado de DXM en el compartimento receptor de las celdas tipo Franz. B) % de DXM acumulada durante las permeaciones ex vivo. Se observa que la cantidad que se cuantificó no es un valor cercano al 70%. ....	68
Figura 32 Pruebas de esterilidad. A) CT al inicio de la prueba. B) Las películas fueron raspadas con un hisopo para ser sembradas en AST C) Observación de CT después de 14 días de incubación a temperatura 30-35°C D) Fotografía en donde se observa el desarrollo de microorganismos en tiempos menores a los 20 min de radiación UV.....	71

Figura 33 A) Las columnas representan los distintos controles con su tratamiento. Los \* indican aquellos grupos en los que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). B) Las columnas indican el conteo de PMN para cada control y tratamiento, observando que se cuantifica un mayor número de células a las 6h. Ctrl: Control; Tx: Tratamiento; AA: Ácido Araquidónico; n=4 ..... 73

Figura 34 Determinación del modelo inflamatorio. A) Administración de AA al 0.05%. B) AA 0.1% C) AA 0.25% D) Placebo del IO. AA: Ácido Araquidónico; IO: Inserto Ocular; n=4..... 74

Figura 35 Resultados comparativos ente ambas formas farmacéuticas (GO-IO). Se observa que tanto las GO como los IO disminuyen la inflamación, sin embargo, al realizar la prueba de t pareada ( $p < 0.05$ ) existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que tienen \*; n=16 ..... 76

Figura 36 Fotografías comparativas de la inflamación a las 6 h de muestreo. A) Control (sln AA 0.25%), B) Tratamiento con GO, C) Tratamiento con IO, la flecha señala el IO colocado en el saco conjuntival del conejo; n=16 ..... 77

#### iv. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de las queratopatías. ....	8
Tabla 2 Resumen de las principales patologías oftálmicas inflamatorias en perros. ....	11
Tabla 3 Sitios que requieren medicación (S. M. Turner, 2010). ....	14
Tabla 4 Ventajas e inconvenientes de la vía oftálmica. ....	15
Tabla 5 Glucocorticoides naturales y sintéticos. ....	20
Tabla 6 Perfil farmacológico de los principales esteroides corticales. ....	23
Tabla 7 Genes sensibles a los glucocorticoides. ....	25
Tabla 8 Polímeros propuestos para la formulación de los insertos oculares (IO). ....	32
Tabla 9 Mezclas propuestas para la formación de películas. ....	44
Tabla 10 Características organolépticas de las mezclas. ....	45
Tabla 11 Componentes de la Formulación. ....	47
Tabla 12 Atributos del Diseño Compuesto Central (DCC). ....	49
Tabla 13 DCC para la formulación de insertos oftálmicos. ....	49
Tabla 14 Caracterización fisicoquímica de los insertos oftálmicos. ....	50
Tabla 15 Evaluación in vitro-ex vivo de los insertos oftálmicos. ....	51
Tabla 16 Valores Fuerza de Mucoadhesión ex vivo. ....	57
Tabla 17 Optimización de la formulación. ....	65
Tabla 18 Resultados de la optimización de la formulación. ....	66
Tabla 19 Cantidad acumulada (%) y porcentaje de DXM acumulada en saco conjuntival y globo ocular durante 48 h utilizando celdas tipo Franz. ....	67
Tabla 20 Resultados de la prueba de esterilidad para determinar el tiempo de radiación UV. ....	69
Tabla 21 Medición de la inflamación inducida por Ácido Araquidónico 0.05%, 0.1%, 0.25% y Placebo IO. ....	72
Tabla 22 Resultados comparativos de ambas formas farmacéuticas (Gotas Oftálmicas e Insertos Oculares) con su respectivo control. ....	75

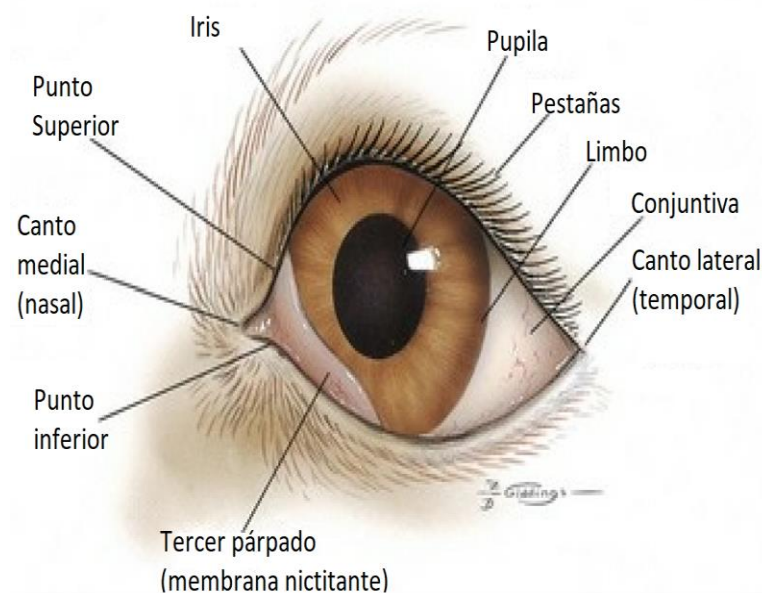
## **v. ÍNDICE DE DIAGRAMAS**

Diagrama 1 Plan general experimental.....	30
Diagrama 2 Primera Etapa: Diseño experimental Central Compuesto (DCC).....	31
Diagrama 3 Segunda etapa: Optimización de la formulación y Pruebas in vivo .....	31
Diagrama 4 Estandarización de la preparación de los Insertos Oftálmicos (IO).....	48

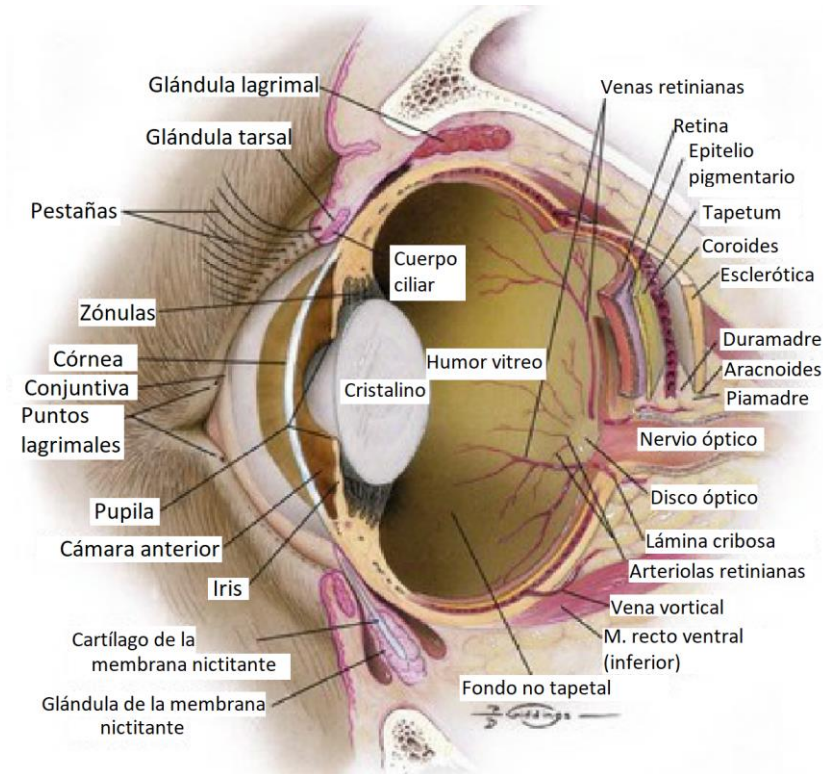
## 1. GENERALIDADES

### 1.1. Anatomía y fisiología ocular del perro

El ojo es la estructura encargada de concentrar la luz y enfocarla sobre los fotorreceptores, que la convierten en impulsos eléctricos hacia la corteza visual en donde tiene lugar la sensación de la visión (Figura 1 y 2). La sensación de visión se puede dividir en la capacidad para detectar la luz y movimiento, perspectiva visual, campo visual, profundidad de percepción, agudeza visual y percepción de color y forma (Slatter, 2004). La estructura de los ojos en los vertebrados varía debido a cambios ecológicos principalmente, influyen la ausencia, presencia o variación de factores como la intensidad de la luz, lo que permite clasificarlos en diurnos, nocturnos y arrítmicos o en presas y depredadores (K. Gelatt, 2007).



*Figura 1 Vista frontal del ojo canino (Slatter, 2004).*



*Figura 2 Estructuras internas del ojo canino (Slatter, 2004).*

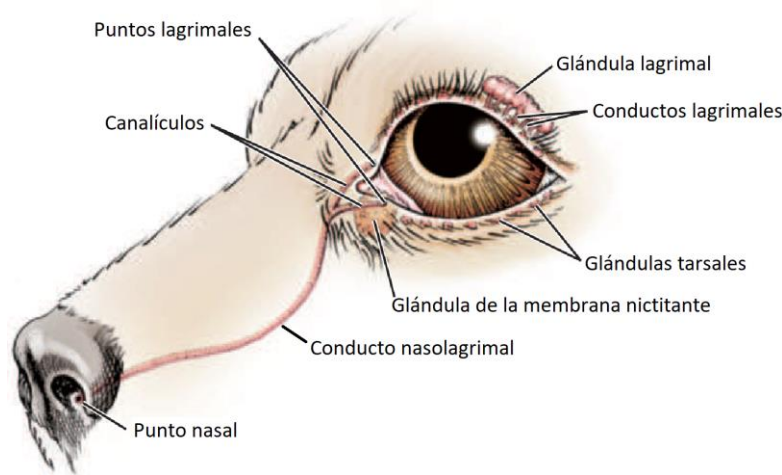
### **1.1.1 Sistema Nasolagrimal**

El sistema nasolagrimal (Figura 3) está integrado por un componente secretor (Película Lagrimal Precorneana PLP) y un componente excretor (Sistema de drenaje nasolagrimal) (S. M. Turner, 2010). La PLP se conforma de la siguiente manera (K. Gelatt, 2007; Giuliano & Moore, 2007):

- 1) La capa más externa, delgada y oleosa es proporcionada por las glándulas sebáceas de Zies y las glándulas de Meibomio o tarsales.
- 2) La segunda capa es una capa de fluido acuoso de lágrimas que es secretado por las glándulas lagrimales (61%), las glándulas accesorias de Kraus y Wolfring (3%) y las glándulas presentes en los párpados (35%).

- 3) La tercera capa es la de mucina producida por las células caliciformes, además contiene inmunoglobulinas, urea, sales, glucosa, leucocitos, enzimas y desechos celulares.

El sistema de drenaje se compone de los puntos nasolagrimal, los canalículos y el conducto nasolagrimal (S. M. Turner, 2010).



*Figura 3 Sistema Nasolagrimal (Aroch, Holmberg, Sutton, & Wilcock, 2008).*

### **1.1.2 Inmunidad Ocular**

El sistema inmune mucosal defiende la superficie ocular del ataque antigénico. Esta función inmunológica está mediada principalmente a través de los anticuerpos de la IgA secretora (S-IgA), que se sabe, inhiben la adhesión e internalización viral y previenen la adherencia, colonización y actividad bacteriana; además interfieren en la infestación parasitaria y reducen el daño relacionado con los antígenos en los sitios mucosales. Por lo tanto, el sistema inmune de la mucosa ocular existe para proteger al ojo de enfermedades alérgicas, inflamatorias e infecciosas, promoviendo así la integridad de la conjuntiva y la córnea con la finalidad de preservar la agudeza visual (O'Sullivan, Montgomery, & Sullivan, 2005). La inmunidad

ocular es altamente especializada por lo que existe una respuesta inmune regional que obedece a mecanismos del ojo para mantener la homeostasis y minimizar el potencial daño por la inflamación inmunogénica. Se ha considerado como una región inmunoprivilegiada ya que es definida por K. Gelatt (2007):

- a) Inmunomodulación activa y pasiva en el microambiente.
- b) Habilidad de alterar la función de las células del sistema inmunológico.
- c) Tolerancia inmunológica ante trasplantes de tejido.

## **1.2 Inflamación Ocular**

La inflamación ocular es el resultado de diversas agresiones incluyendo traumas accidentales o quirúrgicos, la exposición a sustancias tóxicas, agentes infecciosos, estimulación inmunológica no-infecciosa y diversos agentes físicos, además de la neoplasia (Grahn, Peiffer, Cullen, & Haines, 2006). En cualquier tejido, la muerte celular dispara una reacción inflamatoria orientada a la remoción del tejido muerto. Existen diversos mecanismos mediante los cuales el daño celular promueve la inflamación: liberación de sustancias químicas (principalmente prostaglandinas) que operan como mediadores inflamatorios directos, liberación de mediadores inflamatorios (células cebadas) y activación de mediadores lentos dentro del plasma. La reacción inflamatoria es un mecanismo fisiológico beneficioso limitado únicamente al área inmediata de la lesión, por tal motivo, la inflamación debería exhibir un destacado grado de moderación y especificidad de manera que no exista daño en los tejidos aledaños ni afectación global a la salud del animal (Slatter, 2004).



### **1.2.1 Blefaritis**

La blefaritis, o inflamación palpebral, se observa con relativa frecuencia en la práctica general (S. M. Turner, 2010). Esta inflamación puede restringirse a un ojo o a ambos y puede afectar cierta superficie del párpado o todo. En la blefaritis, la inflamación puede ser focal o difusa y en caso de ser crónica puede conducir a la distorsión de los párpados resultando en entropión o ectropión como consecuencia de la formación de cicatrices y de enfermedades secundarias de la córnea y conjuntiva (Stades & Gelatt, 2007).

#### **1.2.1.1 Blefaritis inmunomediada**

Distintos procesos autoinmunes e inmunomediados pueden afectar los párpados caninos, un ejemplo de ello es el pénfigo, cuyas lesiones observadas son el resultado de la producción de autoanticuerpos contra la matriz intracelular de la epidermis, estos autoanticuerpos causan la separación de las capas de células epiteliales cornificadas. El tratamiento para esta enfermedad requiere una terapia sistémica y tópica a largo plazo con corticoesteroides tópicos e inmunosupresión adicional con el uso de fármacos como ciclofosfamida o azatioprina. Las razas más afectadas frecuentemente incluyen: Pastor Alemán (Figura 4), Dachshund de pelo largo y Poodle toy y miniatura (Stades & Gelatt, 2007).



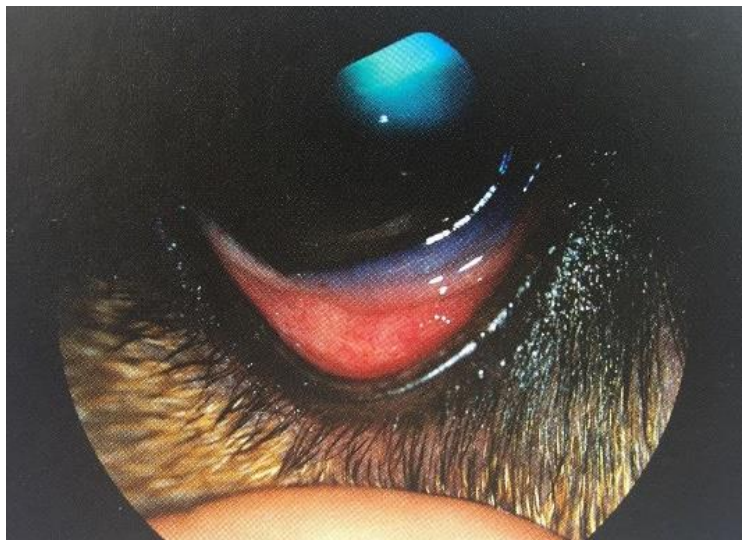
*Figura 4 Blefaritis inmunomediada en un Pastor Alemán adulto (Stades & Gelatt, 2007).*

## 1.2.2 Conjuntivitis

La conjuntivitis o inflamación de la conjuntiva, es la enfermedad ocular diagnosticada con mayor frecuencia en la práctica general. Las tres reacciones conjuntivales más frecuentes son la hiperemia, la quemosis y la secreción ocular (S. M. Turner, 2010).

### 1.2.2.1 Conjuntivitis Aguda Canina

La conjuntivitis aguda es muy frecuente en los perros y normalmente se presenta como un ojo rojo inflamado repentinamente, con secreción leve, dicha secreción inicialmente es serosa, pero puede volverse mucopurulenta en 1-2 días (S. M. Turner, 2010). La conjuntivitis alérgica se observa con frecuencia en perros y es a menudo un componente de la dermatitis atópica (Figura 5). La atopia es clasificada como una reacción de hipersensibilidad tipo I, los alérgenos más comunes son polen, polvo y toxinas bacterianas. La conjuntiva usualmente se observa hiperémica y quimiótica, y el perro manifiesta episodios pruriginosos y puede frotarse los ojos (Hendrix, 2007). El Golden Retriever y el Labrador Retriever son especialmente propensos a sufrir cuadros de atopia (S. M. Turner, 2010).



*Figura 5 Conjuntivitis alérgica en un Jack Rusell Terrier de 4 años de edad (S. M. Turner, 2010).*

### **1.2.2.2 Conjuntivitis Purulenta Crónica**

También llamada dacriocistitis, la conjuntivitis purulenta crónica consiste en la inflamación del saco lagrimal y del conducto nasolagrimal. Los animales afectados presentan secreción ocular de tipo mucopurulenta (Figura 6). En otras ocasiones el signo de presentación inicial es el enrojecimiento ocular unilateral debido a una conjuntivitis con hiperemia conjuntival y secreción en grado variable (S. M. Turner, 2010).



*Figura 6 Golden Retriever de 5 años de edad con secreción mucopurulenta en el canto medial (S. M. Turner, 2010)*

### **1.2.3 Queratitis**

La queratitis es la inflamación de la córnea y el término puede aplicarse a la inflamación en todas las capas o de un estrato específico (Figura 7) (Slatter, 2004). Las enfermedades de la córnea son frecuentes en la práctica general, pueden dividirse de manera general en aquellas que cursan con ulceración corneal y en queratopatías no ulcerativas (Tabla1) (S. M. Turner, 2010).

Tabla 1 Clasificación de las queratopatías.

Ulcerativas	No ulcerativas
Úlcera corneal superficial	Queratitis superficial crónica ( <i>pannus</i> )
Erosión epitelial recidivante	Queratitis intersticial
Úlcera estromal intermedia	Queratitis pigmentaria
Úlcera corneal profunda	Queratoconjuntivitis proliferativa (eosinófila)
Descemetocele	Queratoconjuntivitis seca
Úlcera corneal necrosante	Distrofia/Degeneración endotelial corneal
Úlcera corneal perforada	Dermoide
Cuerpo extraño corneal	Lipidosis corneal
Secuestro corneal	Queratopatía lipídica
	Neoplasia corneal

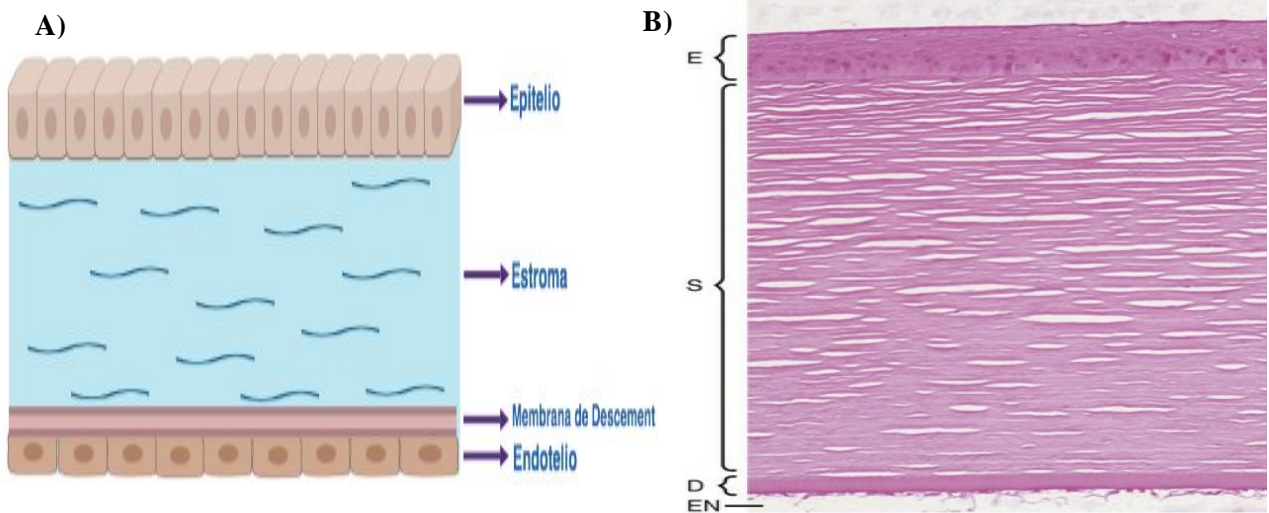


Figura 7 A) Corte transversal de la córnea normal (S. M. Turner, 2010) B) Córnea normal canina. No queratinizada, no pigmentada. D, Membrana de Descement; E, Epitelio corneal; EN, endotelio corneal; S, estroma corneal (Maggs, Miller, & Ofri, 2013).

### 1.2.3.1 Queratitis pigmentaria superficial

La queratitis pigmentaria suele desarrollarse como una enfermedad secundaria a la irritación corneal crónica en el perro (Figura 8) (Gilger, 2007). La producción de pigmento ocurre en el epitelio y subepitelio corneal, la pigmentación es frecuentemente asociada con queratitis crónica y, en algunos casos, con la vascularización de la córnea (K. Gelatt, 2007), dicha pigmentación suele avanzar hasta ocluir la córnea central e interferir con la visión (Slatter, 2004). Las causas más comunes incluyen la irritación crónica por distiquiasis, distriquiiasis y triquiiasis, y entre otras causas se incluyen anomalías en los párpados (Gligler, 2007).

Dentro de la predisposición racial se encuentran las razas braquicefálicas como: Lhasa Apso, Pekinés, Pug y Boston Terrier (Slatter, 2004; S. M. Turner, 2010).



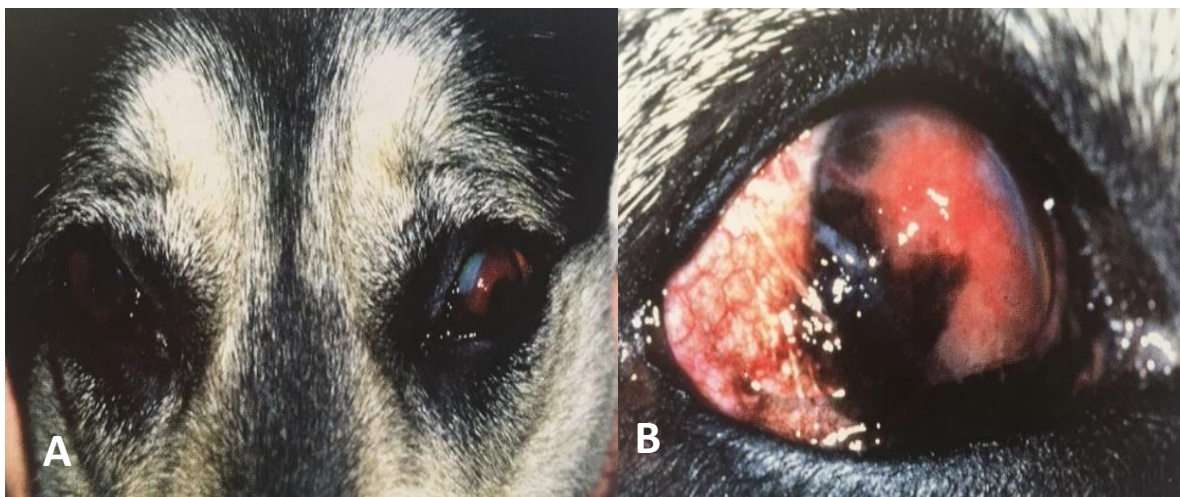
*Figura 8 Queratitis pigmentaria bilateral en un Pug joven (S. M. Turner, 2010).*

### 1.2.3.2 Queratitis superficial crónica (*Pannus*)

La queratitis superficial crónica es una enfermedad progresiva, bilateral, inflamatoria y potencialmente cegadora en la córnea canina. Clínicamente, el *pannus* se manifiesta inicialmente en el limbo temporal o inferior como una lesión roja vascularizada. Al inicio de la enfermedad, la vascularización y la pigmentación se producen en la córnea temporal y



progresa centralmente; a medida que la enfermedad progresa, se extiende como una lesión carnosa y vascularizada hacia la córnea central (Figura 9) (K. Gelatt, 2007); afecta sobre todo al Pastor Alemán, Greyhaound y Husky siberiano (Slatter, 2004).



*Figura 9 A) Pastor Alemán con queratitis superficial crónica bilateral. B) Ojo derecho de Pastor Alemán con queratitis superficial crónica (Gligler, 2007).*

#### **1.2.4 Uveítis**

La uveítis ocurre comúnmente en conjunto con un gran número de enfermedades intraoculares y sistémicas. La uveítis hace referencia a la inflamación del tejido uveal, que está compuesto por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. La inflamación de la úvea consiste en tres eventos básicos: aumento del suministro sanguíneo, incremento de la permeabilidad capilar y migración de glóbulos blancos al sitio de lesión (Figura 10) (Matsumoto et al., 2012).



*Figura 10 Se observa líquido acuoso en la cámara anterior en un Schnauzer Miniatura (Matsumoto et al., 2012).*

Tabla 2 Resumen de las principales patologías oftálmicas inflamatorias en perros.

<b>Enfermedad</b>	<b>Características generales</b>	<b>Predisposición racial</b>	<b>Tratamiento</b>
Blefaritis	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Inflamación palpebral</li> <li>-Separación de las células epiteliales cornificadas</li> <li>-Puede conducir a la distorsión de los párpados</li> </ul>	Pastor alemán, Dachshund de pelo largo, Poodle Toy y miniatura.	Terapia sistémica y tópica a largo plazo con corticoesteroides
Conjuntivitis	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Inflamación de la conjuntiva</li> <li>-Hiperemia, quemosis y secreción ocular.</li> <li>-Enrojecimiento ocular.</li> <li>-Inflamación del saco y conducto lagrimal</li> </ul>	Golden Retriever, Labrador Retriever	Terapia local con glucocorticoides.

<b>Continuación Tabla 2.</b>			
Queratitis	<p>-Inflamación de la córnea en todas las capas o un estrato específico.</p> <p>-Pueden ser ulcerativas o no ulcerativas.</p> <p>-Irritación crónica</p> <p>-Puede ser cegadora</p> <p>-Vascularización y pigmentación corneal.</p>	<p>Razas braquicefálicas como: Lasha Apso, Pekinés, Pug, Boston Terrier.</p> <p>El <i>pannus</i> afecta principalmente al Pastor Alemán.</p>	<p>Cuando la enfermedad cursa sin ulceración la terapia recomendada es el uso de glucocorticoides.</p>
Uveítis	<p>-Inflamación del tejido uveal.</p> <p>-Aumento del suministro sanguíneo.</p> <p>-Incremento de la permeabilidad capilar.</p> <p>Migración de glóbulos blancos al sitio de lesión.</p>	<p>Schnauzer miniatura, Lasha Apso, Pekinés.</p>	<p>Glucocorticoides</p>

### 1.3 Examinación oftálmica y diagnóstico

La examinación oftálmica y el diagnóstico deben ser realizados por un médico veterinario de acuerdo con el protocolo establecido (Slatter, 2004):

#### a) Historia Clínica

- Características (incluyendo la predisposición racial).



- Datos proporcionados por los propietarios: descarga ocular, cambios de color, dolor, opacidad, cambios pupilares, decrecimiento de la visión, alargamiento de los ojos, uso de fármacos.

b) Examen General

- Luz focal brillante.
- Tiras para la prueba de Schirmer (SST).
- Tinciones especiales.
- Variedad de manchas oculares.
- Anestesia local.
- Agentes midriáticos.
- Cultivos estériles.

#### **1.4 Farmacología clínica y terapéutica**

En la terapia ocular se deben buscar fármacos, no sólo basados en su farmacodinamia o propiedades farmacocinéticas, sino con la mejor vía de administración, que cumpla con el régimen de dosificación para maximizar el efecto deseado (Schoenwald, 1990). Dentro de la estructura oftálmica existen distintas áreas que requieren medicación (Tabla 2 y 3) (S. M. Turner, 2010). En ocasiones se dificulta la liberación de fármacos debido a que el ojo posee severos mecanismos de protección estructurales como el parpadeo, la permanente secreción lagrimal y drenaje, que son necesarios para preservar la visión pero que remueven rápidamente los fármacos que son administrados. Los factores que deben considerarse cuando se pretende la administración oftálmica incluyen (Bartlett, 1984):

- A) Cómo cruzar las capas externas del globo ocular y las barreras sanguíneas para llegar al interior.
- B) Cómo localizar la acción de los fármacos en el tejido ocular minimizando los efectos sistémicos.
- C) Cómo prolongar la duración del efecto del fármaco de manera que la frecuencia de administración sea minimizada.

Tabla 3 Sitios que requieren medicación (S. M. Turner, 2010).

<b>Sitio</b>	<b>Tejidos involucrados</b>	<b>Ejemplo de fármaco</b>
Estructuras superficiales	Párpados Conjuntiva Córnea	Antimicrobianos Antiinflamatorios
Iris	Músculos para constricción o dilatación	Midriáticos Mióticos
Cuerpo ciliar	Epitelio acuoso	Agentes hipotensores
Segmento posterior	Vítreo Retina	Agentes inmunosupresores
Tejido retrobulbar	Músculos, nervios y tejido conectivo	Agentes anestésicos

### 1.4.1 Administración oftálmica

El objetivo de la administración oftálmica es alcanzar concentraciones suficientemente altas en el tejido diana sin superar las concentraciones tóxicas en otros tejidos oculares o cualquier parte del cuerpo (S. Turner, 2005). La administración tópica es la ruta más común por la simplicidad de la aplicación. El perfil farmacocinético de fármacos por vía oftálmica es influenciado por factores precorneales (producción de lágrima y drenaje nasolagrimal) y las

características especiales de formulación que determinan la penetración en el ojo (Regnier, 2007). El grado de penetración ocular depende principalmente de los siguientes factores (S. M. Turner, 2005):

- A) Concentración del fármaco
- B) Farmacocinética en el área conjuntival
- C) Permeabilidad de la córnea
- D) Eliminación del saco conjuntival

La administración tópica es la vía de administración más común para los medicamentos oftálmicos, en la Tabla 4 se enuncian algunas de las principales ventajas e inconvenientes de dicha vía de administración (K. N. Gelatt, Gilger, & Kern, 2013).

Tabla 4 Ventajas e inconvenientes de la vía oftálmica.

<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
Simplicidad y comodidad de aplicación	Lagrimo
Capacidad para llegar a blancos extra e intraoculares	Drenaje nasolagrimal
Se puede obtener un efecto local	Evaporación de las soluciones oftálmicas
	Baja penetración precorneal
	Frecuencia del parpadeo
	Tamaño de la gota administrada (retención de volumen instilado)
	Poco tiempo de retención de las gotas oftálmicas
	Dinámica del fluido lagrimal

## **1.4.2 Formas farmacéuticas de uso oftálmico**

### **1.4.2.1 Gotas y suspensiones**

Las gotas representan la forma farmacéutica más utilizada en oftalmología y consiste en soluciones y suspensiones (Figura 11 A). Las formulaciones de soluciones oftálmicas son aquellas en las que el fármaco se encuentra disuelto en su totalidad en el solvente, generalmente son de baja viscosidad y en un medio acuoso que permite que se mezclen con la película lagrimal acuosa; sin embargo, cuando el fármaco es de baja solubilidad acuosa, generalmente se formula en suspensión, como es el caso de los corticoesteroides. Las suspensiones consisten en partículas del principio activo dispersas en un vehículo que será instilado en el ojo, pero comparada con las soluciones presentan algunas desventajas asociadas a la formulación y aplicación siendo una de las principales la generación de irritación debido a las partículas suspendidas. Para proporcionar estabilidad y esterilidad, las formulaciones oftálmicas contienen buffers, acarreadores orgánicos/inorgánicos, emulsificantes, etc (Regnier, 2007).

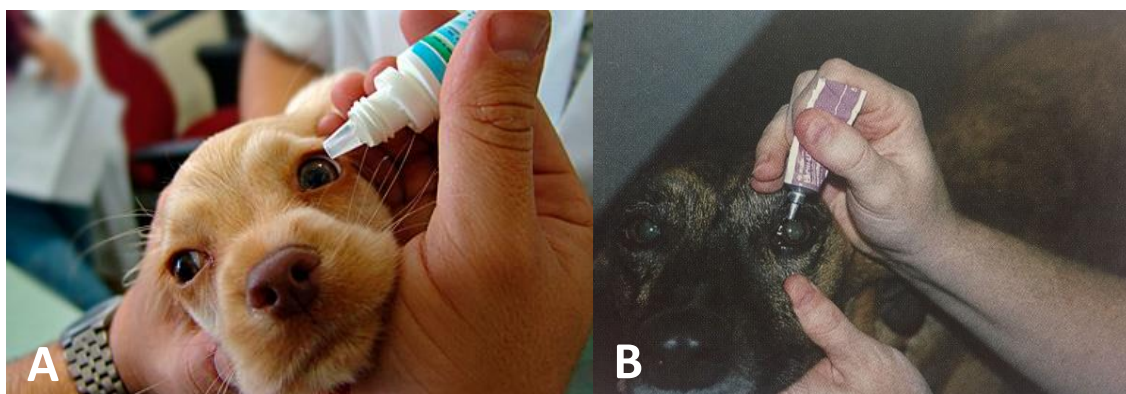
### **1.4.2.2 Inconvenientes de las gotas**

Dentro de las principales desventajas del uso de gotas se destaca la rapidez con la cual son eliminadas del ojo después de la dilución con las lágrimas y puede ser necesario un aumento en la frecuencia de aplicación o concentración de la medicación (Slatter, 2004). El tiempo de residencia tan corto de las gotas oftálmicas es asociado a la baja absorción corneal de fármacos. Por lo tanto, frecuentemente se requiere la instilación de soluciones altamente concentradas para alcanzar el efecto terapéutico, esto resulta en cortos períodos de alta concentración de fármaco en la superficie lagrimal, seguido por largos períodos de dosis

menores a la requerida. Además, el uso de altas concentraciones de fármaco en las gotas oftálmicas causa efectos locales y sistémicos (Lee & Robinson, 2009); como consecuencia, el desarrollo de insertos oculares prolonga y controla la liberación oftálmica de los fármacos (Saettone & Salminen, 1995).

### 1.4.2.3 Ungüentos

Los ungüentos tienen como principal característica incrementar la viscosidad y con ello el tiempo de contacto del fármaco con la superficie ocular, lo que conlleva a la generación de concentraciones hísticas marginalmente superiores (Figura 11 B). Por lo general son más estables que las soluciones, pero pueden interferir con la cicatrización corneana en mayor medida que las anteriores, por lo que se contraindican en lesiones penetrantes (Slatter, 2004).



*Figura 11 Administración de algunas formas farmacéuticas para uso oftálmico: A) Gotas, B) Ungüento (S. Turner, 2005).*

### 1.4.2.4 Dispositivos sólidos para liberación de fármacos

Los lentes de contacto blandos se usan en el tratamiento de distintas enfermedades corneales ya que funcionan como soporte y pueden servir como vehículos erosionables para la liberación controlada de fármacos. Por otra parte, los insertos oftálmicos pueden ser sólidos

o semisólidos, el tamaño y la forma está diseñada para la aplicación en el fórnix inferior. Su objetivo es la liberación sostenida de fármacos en la superficie ocular y pueden ser clasificados en insertos erosionables (solubles) y no erosionables (insolubles) (Figura 12) (Regnier, 2007).



*Figura 12 Dispositivos sólidos oftálmicos utilizados en la actualidad para administración en humanos (Herring, 2007).*

## **1.5 Antiinflamatorios**

Los fármacos antiinflamatorios son indicados en enfermedades oculares severas en las que se presentan procesos inmunomediados, incluyendo queratitis superficial crónica, algunos tipos de queratoconjuntivitis seca, conjuntivitis alérgica y uveítis. Para las enfermedades del segmento anterior y posterior del ojo, suelen utilizarse corticosteroides tópicos y antiinflamatorios no esteroideos (S. M. Turner, 2005).

### **1.5.1 Glucocorticoides**

La corteza suprarrenal sintetiza toda clase de hormonas esteroideas: los glucocorticoides cortisol y corticosterona en la zona fasciculada, los mineralocorticosteroides aldosterona y

desoxicorticosterona en la zona glomerulosa y las hormonas gonadales deshidroepiandrosterona, androstenodiona y testosterona en la zona reticular. A partir del esteroide cortisol se han obtenido numerosos derivados sintéticos que mantienen algunas de sus propiedades y mejoran las de otros (Figura 13) (Flórez, 2008; Vandewalle, Luypaert, De Bosscher, & Libert, 2018). Según las modificaciones estructurales introducidas sobre la molécula de cortisol, se puede hablar de (Botana López, Landoni, & Martín-Jimenez, 2002):

-Corticoides de 1° generación: Presentan una baja actividad mineralocorticoide y más actividad glucocorticoide. Se incluye aquí la prednisona y la prednisolona.

-Corticoides de 2° generación: son derivados halogenados en los que se introduce un átomo de flúor. Esto ocasiona un incremento en su actividad glucocorticoide y mineralocorticoide. La actividad antiinflamatoria puede incrementarse al introducir un grupo acetónido.

-Corticosteroides de 3° generación: se ha introducido un anillo de condensación, con lo que tienen menor potencia antiinflamatoria que la prednisona, carecen de actividad mineralocorticoide y tienen menos actividad glucocorticoide (sobre el metabolismo de los glúcidos y del calcio).

El número de derivados es muy amplio, así como las vías de administración por las que se pueden utilizar (Tabla 5 ) (Flórez, 2008).

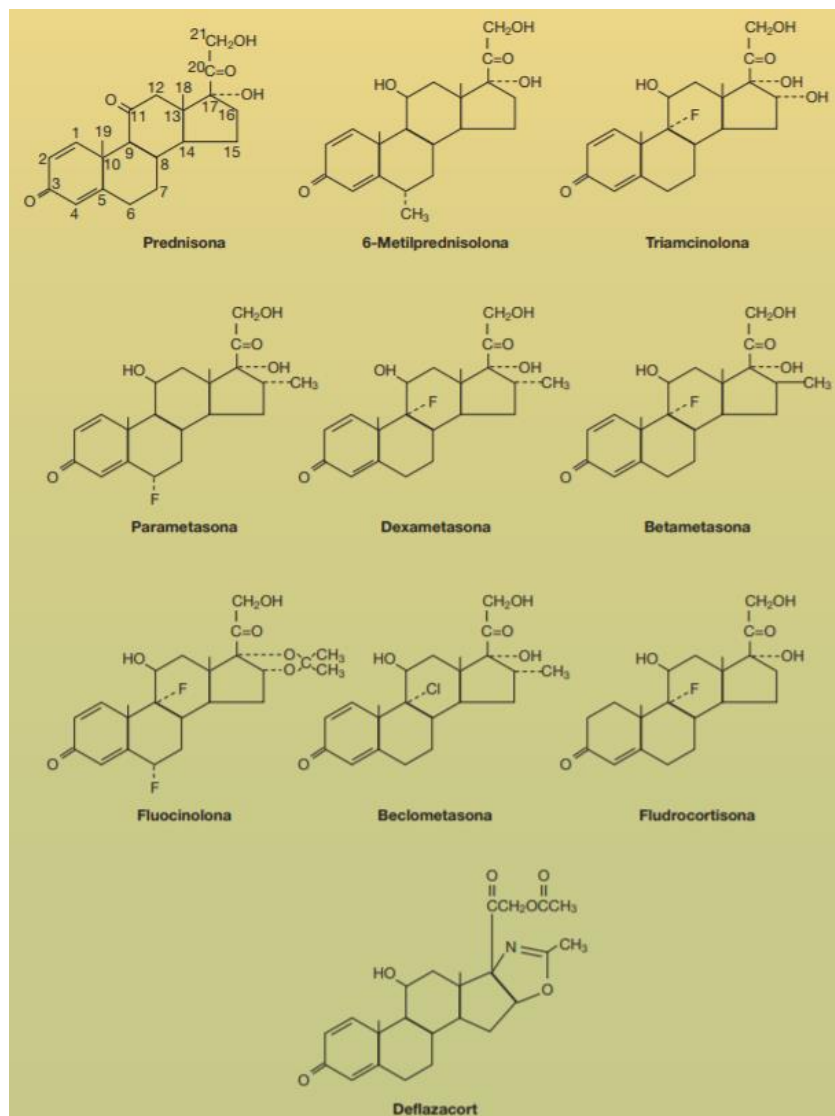


Figura 13 Estructuras de glucocorticoides y mineralocorticoides sintéticos (Flórez, 2008)

Tabla 5 Glucocorticoides naturales y sintéticos.

Corticoide	Éster	Vía de aplicación
<b>A. Vías múltiples</b>		
Betametasona	-	Oral
	Benzoato	Tópico
	Dipropionato	Tópico



**Continuación Tabla 5.**

	Fosfato y acetato sódicos	Inyectable, oral
	Valerato	Tópico
Cortisol	-	Inyectable, tópico, oral
	Acetato	Inyectable, tópico, supositorio, espuma rectal
	Cipionato	Oral
	Fosfato sódico	Inyectable
	Succinato sódico	Polvo inyectable
Cortisona	Acetato	Oral
Cortivazol	-	Inyectable
Deflazacort	Acetato	Oral
Dexametasona	-	Oral, tópico
	Acetato	Inyectable
	Fosfato sódico	Inyectable, tópico, inhalado
Fluprednisolona	Hemisuccinato	Inyectable
	Acetato	Inyectable
Metilprednisolona	-	Oral
	Acetato	Inyectable, tópico, enema
	Succinato sódico	Polvo inyectable
Parametasona	Acetato, fosfato	Oral, inyectable
Prednilideno	Diaminoacetato	Inyectable
Prednisolona	-	Oral
	Succinato	Inyectable, tópico
	Fosfato sódico	Inyectable, tópico
	Tebutato	Inyectable

<b>Continuación Tabla 5.</b>		
Prednisona	-	Oral
Triamcinolona	-	Oral
	Acetónido	Inyectable, tópico, inhalado
	Diacetato	Oral, inyectable
	Hexacetónido	Inyectable
<b>B. Uso tópico o inhalatorio exclusivamente</b>		
Alclometasona		Fluocinolona
Beclometasona, dipropionato		Fluocinónido
Budesónido		Fluocortina
Clobetasol		Fluocortolona
Clobetasona		Fluorometolona
Desoximetasona		Flupamesona
Diclorisona		Fluticasona
Diflorasona		Halcinónido
Diflucortolona		Halometasona
Fluclorolona		Mometasona
Flumetasona		Prednicarbato
Flumisolida		Tixocortol

El conjunto de acciones fisiológicas y farmacológicas de los corticoides suele clasificarse en dos tipos: los glucocorticoides, representadas por la capacidad de almacenar glucógeno hepático y por la actividad antiinflamatoria, y los mineralocorticoides, representadas por la capacidad de retener sodio y agua. Muchos análogos sintéticos del cortisol muestran

potencias crecientes de acción glucocorticoide y decrecientes de acción mineralocorticoidea, lo que permite una gran manejabilidad y mayor seguridad en el uso (Tabla 6) (Flórez, 2008)

Tabla 6 Perfil farmacológico de los principales esteroides corticales.

<b>Corticoide</b>	<b>Potencial antiinflamatorio</b>	<b>Equivalencia en mg (oral)</b>	<b>Retención de Na<sup>+</sup></b>
Cortisol	1	20	1
Cortisona	0.8	25	0.8
Prednilideno	3	7	0.5
Prednisona	4	5	0.8
Prednisolona	4	5	0.8
Metilprednisolona	5	4	0.5
Triamcinolona	5	4	0
Parametasona	10	2	0
Fluprednisolona	15	1.5	0
Betametasona	25-40	0.6	0
Dexametasona	30	0.5	0
Cortivazol	30	0.75	20
Aldosterona	0	-	300
Desoxicorticosterona	0	-	0
Fludrocortisona	10	2	250

Los glucocorticoides ejercen una poderosa acción antiinflamatoria, sea cual sea la causa de la inflamación (infecciosa, química, física o inmunológica), pudiendo inhibir tanto las manifestaciones inmediatas de la inflamación (rubor, dolor, etc.) como tardías, entendiéndose por tales ciertos procesos de cicatrización y proliferación celular. Inhiben la dilatación

vascular, reducen la transducción líquida y la formación de edema, disminuyendo el exudado celular y reducen el depósito de fibrina alrededor del área inflamada (Flórez, 2008).

Los corticosteroides para uso oftálmico son aquellos que poseen mayor actividad glucocorticoide (S. M. Turner, 2005). Ha sido ampliamente aceptado que los efectos fisiológicos y terapéuticos de los glucocorticoides están mediados a través del complejo receptor citosólico de glucocorticoides que consiste en un receptor proteico (receptor glucocorticoide GR); estos receptores están presentes en casi todas las células del cuerpo incluyendo las involucradas en la respuesta inflamatoria que se encuentran en la esclera, conjuntiva, iris, coroides y retina. Cuando se unen los glucocorticoides, el complejo se disocia; el GR y su ligando forman un dímero que se trasloca en el núcleo, donde se une a elementos específicos de respuesta hormonal (HREs) en el DNA genómico para actuar posteriormente como transcriptor de genes activados o desactivados (Tabla 7) (Flórez, 2008; K. Gelatt, 2007). Una modulación positiva de la transcripción génica conduce a la expresión de proteínas reguladoras que reducen las propiedades terapéuticas de los glucocorticoides. En consecuencia, una gran parte de la acción antiinflamatoria se ha atribuido a la liberación de una proteína llamada lipocortina (lipomodulina, macrocortina), que inhibe la fosfolipasa A<sub>2</sub> y previene la liberación de ácido araquidónico; esto da como resultado la supresión de la biosíntesis de eicosanoides producidos por las vías ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (K. Gelatt, 2007).

Tabla 7 Genes sensibles a los glucocorticoides.

<b>Reducción de la transcripción</b>
Quimiocinas: IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-3, MCP-4, eotaxina
Citocinas: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-11; IL-12, IL.13, IL-16, IL-17, IL-18, TNF- $\alpha$ , factor estimulante de colonias de granulocito-macrófagos, factor de células madre.
Enzimas inducibles: óxido nítrico sintasa, ciclooxigenasa 2, fosfolipasa A <sub>2</sub>
Receptores de endotelina 1: receptores NK <sub>1</sub> , NK <sub>2</sub>
Moléculas de adhesión: ICAM-1, selectina E
<b>Aumento en la transcripción</b>
Lipocortina 1/anexina 1 (inhibidor de la fosfolipasa A <sub>2</sub> )
CC10 (inhibidor de fosfolipasa A <sub>2</sub> )
Adrenoceptor $\beta_2$
Antagonista receptor IL-1
IL-1R2
I $\kappa$ B $\alpha$ (inhibidor de NF- $\kappa$ B)
CD163
MAP cinasa fosfatasa 1 (MKP-1)

## 1.6 Dexametasona

La dexametasona (9-fluoro-11 $\beta$ , 17,21-trihidroxi-16 $\alpha$ -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona), es un derivado sintético de los glucocorticoides y se caracteriza por su elevada potencia, demostrando tener efecto antiinflamatorio en concentraciones de 100 ng/mL (Rodríguez-Villanueva, Rodríguez-Villanueva, & Guzmán Navarro, 2017). Dentro de los corticosteroides utilizados en la terapia oftálmica, el fosfato sódico de dexametasona (DXM) ha destacado por su elevada potencia y efectividad (Kalam, 2016). La acción de la

dexametasona es mediada por la unión de las moléculas del fármaco a los receptores de glucocorticoides presentes en diversas células como se explica en la sección 1.4.4. y cuyo mecanismo de acción se ilustra en la Figura 14 (Lorenzo et al., 2014) .

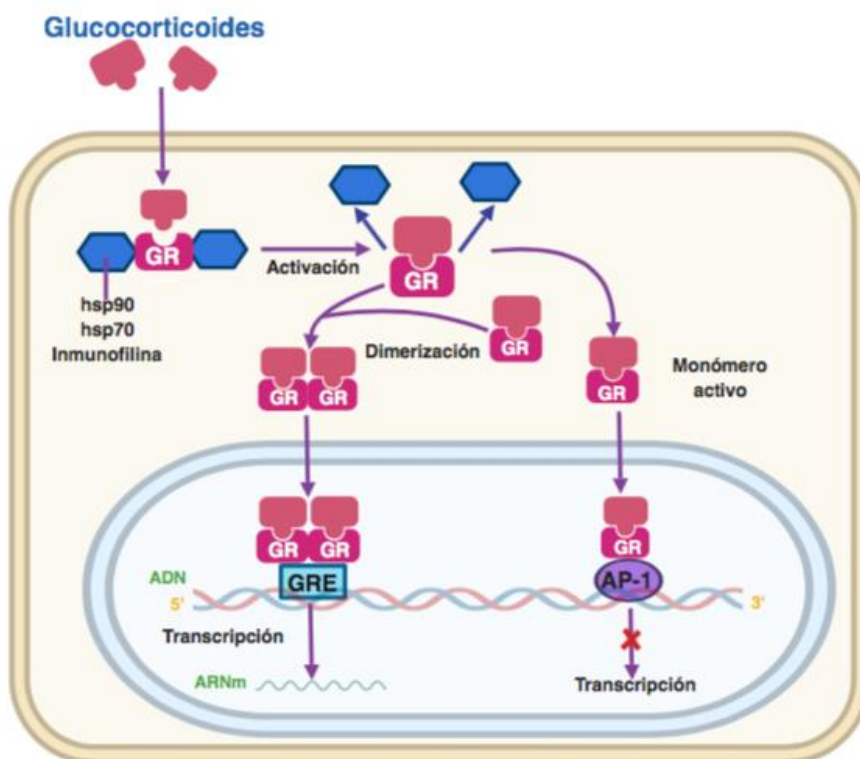


Figura 14 Mecanismo de acción general de Glucocorticoides (Lorenzo et al., 2014).

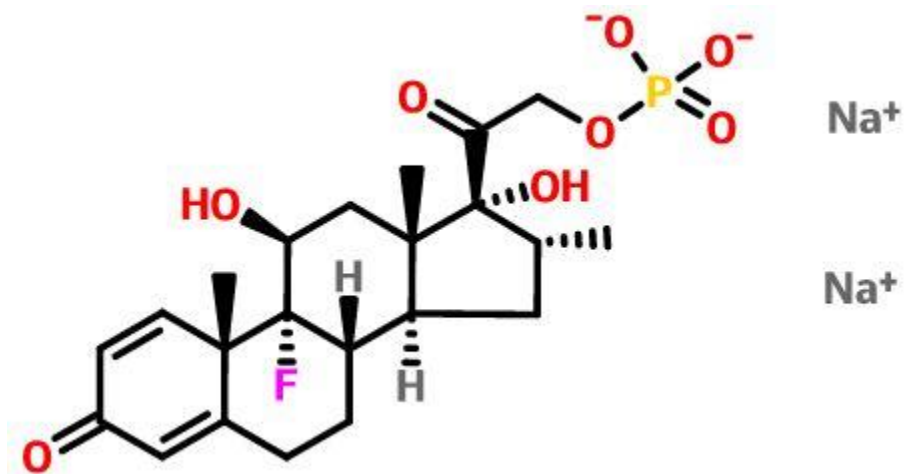
### 1.6.1 Características generales

**Fórmula molecular:**  $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$  (Figura 15)

**Peso molecular:** 516.4 g/mol

**Características físicas:** Es un polvo blanco, cristalino, indoloro, estable en el aire. Excesivamente higroscópico.

**Solubilidad:** Fácilmente soluble en agua, ligeramente soluble en cloruro de metileno y escasamente soluble en etanol (Drugbank, 2018).



*Figura 15 Estructura química de Fosfato Sódico de Dexametasona*

Es un derivado sintético del glucocorticoide hidrocortisona, el cual tiene una larga historia en su uso en los seres humanos. Se encuentra en la industria farmacéutica en forma de tabletas, aerosol, cremas y suspensiones oftálmicas.

## 2 JUSTIFICACIÓN

La visión provee aproximadamente el 90% de la información sobre el ambiente que nos rodea junto con las distintas consideraciones fisiológicas que incluyen la diferenciación entre luz, sombras y color, la orientación espacial, el equilibrio y el tono cortical (Boateng & Popescu, 2016), sin embargo, a pesar de ser considerada una de las zonas inmunoprivilegiadas del cuerpo existen diversas patologías capaces de afectar este órgano de los sentidos. La instilación de fármacos en forma de gotas de manera continua sigue siendo el método más utilizado para la aplicación de éstos por vía oftálmica, sin embargo, el corto tiempo de residencia precorneal de las gotas es asociado a su baja absorción, por lo tanto, la frecuente instilación de soluciones altamente concentradas es necesaria para tener un efecto terapéutico lo que resulta en periodos cortos de altas concentraciones de fármaco en la película lagrimal seguido de largos periodos de dosis menores a la requerida. Sin embargo, el uso de soluciones

oftálmicas altamente concentradas puede causar efectos locales y sistémicos, por ello en diversas ocasiones, intentando disminuir los efectos sistémicos derivados de la frecuente administración, se ha propuesto la instilación de volúmenes menores lo que podría verse reflejado en un efecto local, reduciendo así la pérdida de fármaco y el efecto sistémico.

Lo anterior, provee las bases para el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas que prolonguen la retención en el sitio de aplicación disminuyendo la pérdida por drenaje nasolagrimal, lo cual podría mejorar significativamente la biodisponibilidad por vía oftálmica (Nanda et al., 2018). Sin embargo, el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos por esta vía presenta diversos desafíos pues el ojo posee diversas estructuras y mecanismos de protección.

La dexametasona (9-fluoro-11 $\beta$ , 17,21-trihidroxi-16 $\alpha$ -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona) es un derivado sintético de los glucocorticoides caracterizado por su elevada potencia. Entre los corticoesteroides utilizados para la terapia oftálmica, el Fosfato Sódico de Dexametasona (DXM) ha sido utilizado por su alta potencia y efectividad en el tratamiento de procesos inflamatorios causados por infecciones, lesiones, cirugías y otras condiciones en el ojo, sin embargo DXM puede causar serios efectos sistémicos por lo que es necesario controlar la liberación de manera continua y local (Kalam, 2016).

En consecuencia, es necesario el desarrollo de insertos oculares con la finalidad de prolongar y controlar la liberación oftálmica de fármacos, lo que se verá reflejado en el cumplimiento de los requerimientos del paciente y la reducción de los efectos sistémicos (Hermans et al., 2014). En la actualidad, se han llevado a cabo distintos estudios sobre el desarrollo de sistemas de liberación modificada de distintos fármacos para uso humano (Gupta & Aqil,



2012), sin embargo no existen estudios acerca del uso de estas formas farmacéuticas no convencionales para uso veterinario.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Desarrollar y caracterizar insertos oculares cargados con Dexametasona utilizando pruebas fisicoquímicas y biofarmacéuticas para su evaluación en un modelo animal como nueva alternativa al tratamiento convencional de afecciones oftálmicas en perros.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- Diseñar la formulación de insertos oculares cargados con Dexametasona.
- Caracterizar los insertos oculares mediante pruebas fisicoquímicas y biofarmacéuticas.
- Realizar estudios de liberación *in vitro* y permeación *ex vivo* de la formulación óptima de los insertos oculares.
- Establecer las condiciones para garantizar la esterilidad de los insertos oculares mediante pruebas microbiológicas.
- Administrar los insertos oculares a los sujetos de prueba (conejos) que cumplan con los criterios de inclusión.
- Realizar el análisis comparativo de los insertos oculares y las gotas de Dexametasona mediante el conteo de células PMN para determinar la disminución de la inflamación.

#### 4 HIPÓTESIS

El desarrollo y caracterización de insertos oculares de Dexametasona para el tratamiento de diversas afecciones oculares inflamatorias en un modelo animal permitirá su uso posterior como nueva alternativa a las gotas, garantizando una forma farmacéutica más eficiente con un efecto farmacológico local para su posterior evaluación y uso en perros.

#### 5 PLAN DE TRABAJO

A continuación, en el diagrama 1 se muestra la estrategia experimental general planteada para el desarrollo de y caracterización de los insertos oculares.

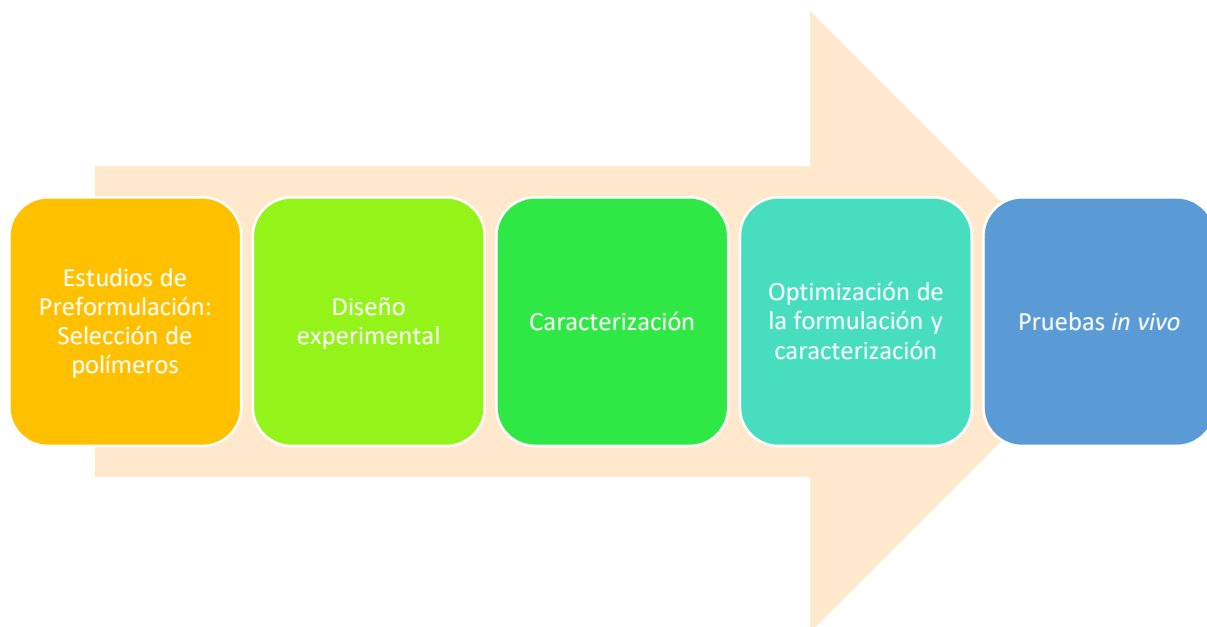


Diagrama 1 Plan general experimental.

A su vez, el plan general de trabajo se dividió en dos etapas: la primera de ellas (Diagrama 2) que consistió en el diseño experimental de la formulación y la caracterización de las formulaciones utilizando pruebas mecánicas y fisicoquímicas. Una vez obtenida la optimización de la formulación, se continuó con la segunda etapa experimental (Diagrama

3) para continuar con las pruebas *in vivo*. La descripción detallada de las pruebas se encuentra en la sección 6.

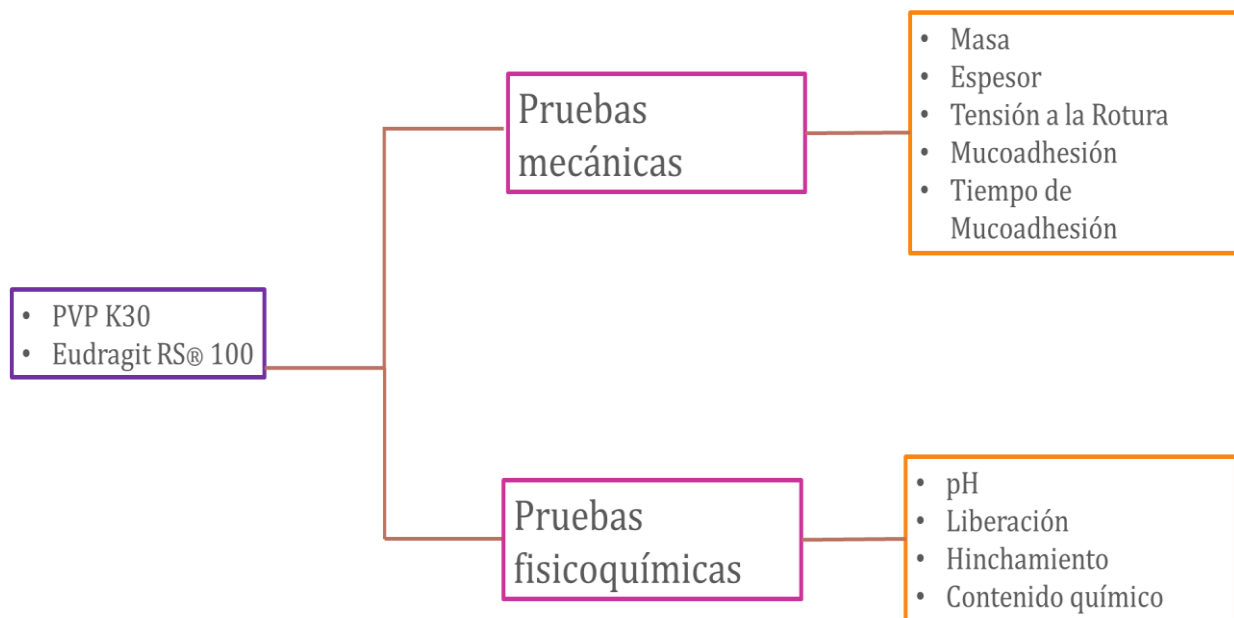


Diagrama 2 Primera Etapa: Diseño experimental Central Compuesto (DCC).

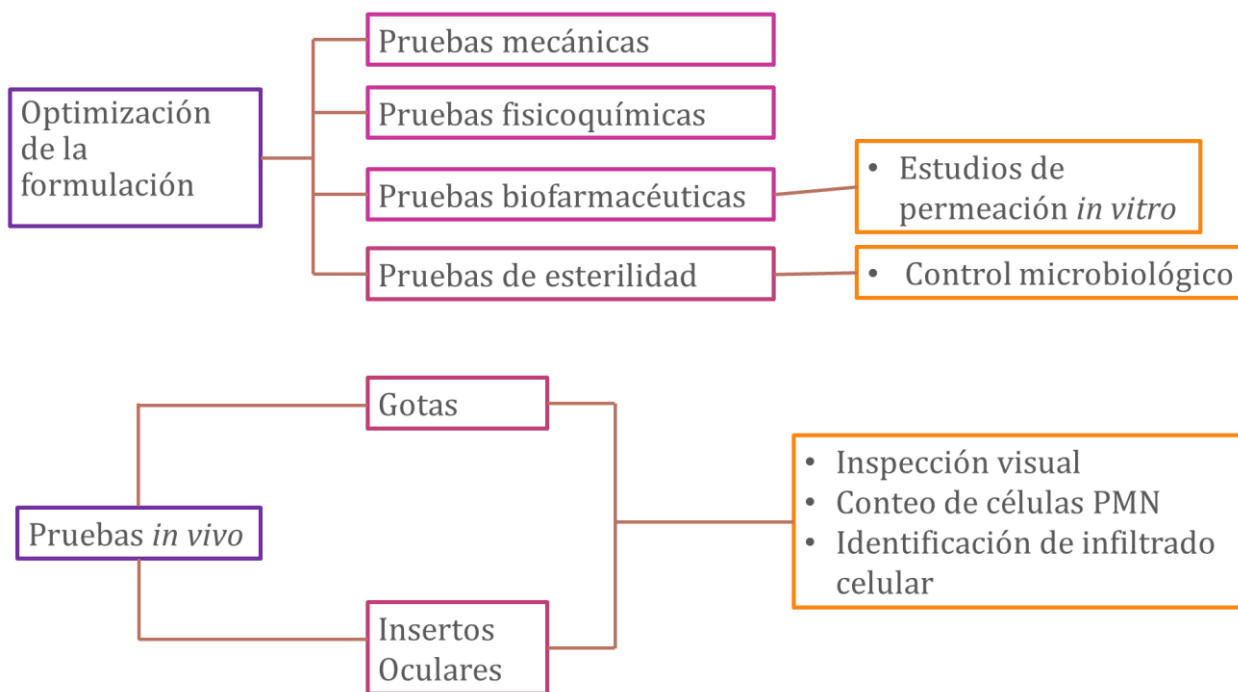


Diagrama 3 Segunda etapa: Optimización de la formulación y Pruebas *in vivo*

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Estudios de preformulación y selección de polímeros para la formación de la matriz

La selección de los excipientes para la formación de la matriz polimérica obedece a las características del fármaco y la compatibilidad entre los mismos basados en sus características fisicoquímicas que permiten el control de la liberación del principio activo. Los polímeros que fueron utilizados en las distintas mezclas se encuentran en la Tabla 8 y fueron elegidos a partir de estudios previos que confirman su uso por vía oftálmica (Castelli, Messina, Sarpietro, Pignatello, & Puglisi, 2003; De Souza et al., 2016; Ghose et al., 2017; Hornof, Weyenberg, Ludwig, & Bernkop-Schnürch, 2003; Katara & Majumdar, 2013; Patel, Patel, & Patel, 2009; Pignatello, Bucolo, & Puglisi, 2002; Saettone & Salminen, 1995; Urbańska, Karewicz, & Nowakowska, 2014; Wypych, 2013).

Tabla 8 Polímeros propuestos para la formulación de los insertos oculares (IO).

<b>Polímeros</b>	
Polivinilpirrolidona K-30 (PVP K30)	Eudragit RS100 <sup>®</sup> (ERS100)
Hipromelosa	Kollicoat IR <sup>®</sup>
Polivinilalcohol (PVA)	Pluronic F-127 <sup>®</sup> (PF127)
Ácido Hialurónico	Quitósán

La finalidad de la realización de las mezclas fue determinar incompatibilidades físicas entre los excipientes y el PA (DXM).

## **6.2 Composición de los insertos oculares y estandarización del método de preparación**

Una vez seleccionadas las mezclas poliméricas que formaron películas (insertos), se determinó la composición de la formulación y se procedió a establecer las condiciones de trabajo con la finalidad de estandarizar el método de preparación. En un inicio se trabajó en condiciones ambientales dentro del Laboratorio 12 “Sistemas Transdérmicos y Materiales Nanoestructurados” de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM (Altura 2280 msnm y TA de 18-24°C) con el propósito de establecer si existía la necesidad del uso de agentes catalizadores (radiación UV, secado en frío, aumento de temperatura, etc.) para la formación de los insertos oculares (IO). Los insertos fueron elaborados mediante la técnica de evaporación de solvente (De Souza et al., 2016; Shivakumar, Desai, Subhash, Ashok, & Hulakoti, 2007) utilizando distintas superficies de moldeo con la finalidad de evaluar en cuál de ellas la formulación se despegaba de manera fácil para su posterior manipulación y caracterización. Las superficies evaluadas fueron: moldes de acetato, cajas Petri de vidrio y moldes de politetrafluoroetileno (PTFE). Una vez que las formulaciones se secaron, se procedió a retirarlas del molde para la posterior elección de éste. Continuando con la estandarización del método de preparación se determinó el tiempo y velocidad de agitación, así como las condiciones de secado, para ello se realizó una cinética de mezclado variando las condiciones de velocidad (5000, 10000 y 15000 rpm) y tiempo (5,10 y 15 min) tomando muestras de 1 mL a los tiempos mencionados y analizándolas por espectrofotometría UV-Vis (Cary 100 Varian®) a una longitud de onda de 243 nm con la finalidad de obtener una mezcla homogénea. Para establecer las condiciones de secado se evaluaron distintos tiempos a temperatura constante de 26°C hasta la sequedad de las formulaciones.

### **6.3 Diseño experimental de insertos oftálmicos**

Se elaboró un diseño de superficie-respuesta, específicamente, el Diseño Central Compuesto (DCC) para la elaboración de películas oftálmicas cargadas con DXM por el método de evaporación de solvente teniendo como niveles del experimento diversas concentraciones de los polímeros previamente seleccionados (PVP K-30 y Eudragit RS100<sup>®</sup>) con la finalidad de brindar diversas características al producto. Las formulaciones se caracterizaron utilizando pruebas mecánicas, fisicoquímicas y biofarmacéuticas.

### **6.4 Caracterización de las películas oftálmicas**

#### **6.4.1 Variación de Masa (VM) y Espesor (VE)**

Para la determinación de la variación de masa y espesor se seleccionaron al azar 10 películas circulares con un diámetro de 1cm las cuales se pesaron de manera individual en una balanza analítica AS220.R2 RADWAG<sup>®</sup> y se calculó la masa promedio y la desviación estándar. El espesor de las películas se obtuvo con un Calibrador Digital midiendo en distintas partes (tres) de la forma farmacéutica para determinar el espesor promedio y su desviación estándar.

#### **6.4.2 pH**

La medición del pH se realizó con un potenciómetro HANNA<sup>®</sup> HI2210 una vez que los componentes de la mezcla se encontraban totalmente disueltos (10 min) en 3 puntos distintos del recipiente de mezclado (superficie, punto medio y fondo).

#### **6.4.3 Tensión a la ruptura (TR)**

Las propiedades de tensión fueron medidas con el equipo Texture Analyzer CT3 Brookfield<sup>®</sup> utilizando como parámetros generales de la prueba una carga de activación de 6.8 g a una

velocidad de 0.5 mm/s. Cada formulación fue evaluada por triplicado, las muestras fueron cortadas con las siguientes medidas: 10 mm de largo x 5 mm de ancho. Las muestras fueron sujetadas por el accesorio TA-DGF posicionada de acuerdo a los requerimientos del equipo (Figura16).

A)



B)



*Figura 16 A) Equipo Texture Analyzer CT3 Brookfield® B) Colocación de la muestra para medir tensión a la rotura (TR) utilizando el accesorio TA-DGF.*

#### **6.4.4 % Humedad (HU)**

Se pesaron en una termobalanza PMC50 RADWAG® tres insertos oftálmicos de cada formulación (F1-F11) de 1 cm de diámetro para que el equipo determinara el % de humedad contenida.

## **6.4.5 Fuerza de mucoadhesión y tiempo de mucoadhesión *ex vivo* (FM Y TM)**

### **6.4.5.1 Preparación de la muestra *ex vivo***

Se utilizaron ojos de perro obtenidos del Laboratorio de Necropsias de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Una vez extraídos fueron colocados en Solución Salina Fisiológica 0.9% (SSF) para su transporte y almacenamiento. Las pruebas fueron realizadas en las primeras 24 h a partir de la extracción con la finalidad de preservar la estructura anatómica. Las pruebas fueron realizadas en 2 estructuras anatómicas: globo ocular y saco conjuntival.

#### **a) Fuerza de mucoadhesión (FM) *ex vivo***

Las muestras fueron colocadas en cajas Petri de vidrio y se adicionó a cada muestra 50  $\mu$ L de Fluido Lagrimal Simulado (FLS) (Ceulemans & Ludwig, 2002; Rupenthal, Green, & Alany, 2011) (Ver preparación Anexo 1) con la finalidad de simular las condiciones reales de la estructura anatómica.

Una vez colocada la muestra, se procedió a la medición de la Fuerza de mucoadhesión (FM) utilizando el Texture Analyzer CT3 Brookfield® bajo las siguientes condiciones de prueba: valor meta 50 g, carga de activación 0 g y velocidad de la prueba 1 mm/s.

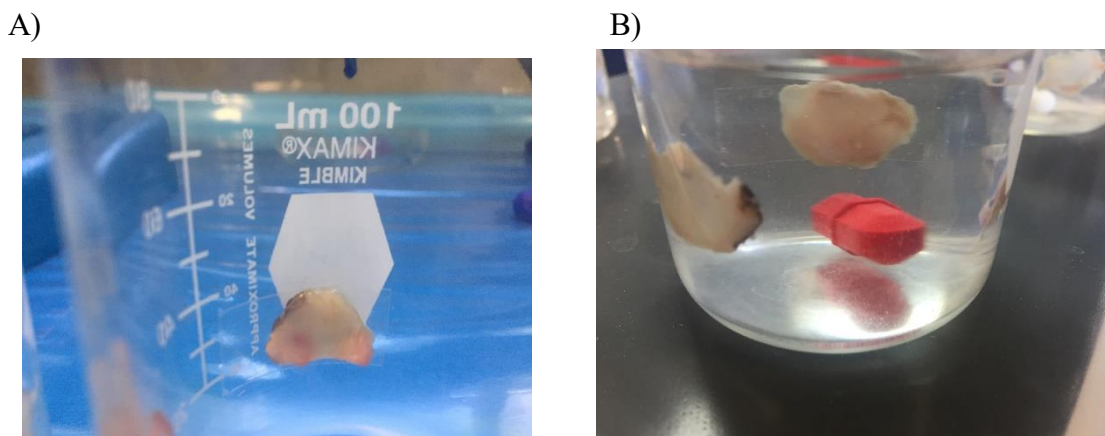
Cada formulación fue evaluada por triplicado colocándola en la base del cilindro haciendo contacto con la estructura, posteriormente se obtuvo el resultado.

#### **b) Tiempo de mucoadhesión (TM) *ex vivo***

Para la determinación del tiempo de mucoadhesión *ex vivo*, se colocaron porciones del saco conjuntival (1 cm de diámetro aproximadamente) en las paredes de un vaso de precipitados



de 100 mL con cinta doble cara; sobre el área del saco se colocaron las diversas formulaciones y posteriormente el vaso fue llenado con 50 mL de FLS (Figura 17) (Escalona-Rayo, 2017) y la prueba se llevó a cabo a 50 rpm y a 37°C con la finalidad de determinar cuánto tiempo la formulación permanecía adherida a la mucosa.



*Figura 17 A) Cortes de saco conjuntival (1cm de diámetro) colocados con cinta doble cara sobre la pared de un vaso de precipitado. B) Prueba de Tiempo de Mucoadhesión. La formulación se encuentra adherida a la mucosa y la prueba se realizó a 50 rpm/37°C.*

#### **6.4.6 Hinchamiento (Hi)**

Para la realización de la prueba de hinchamiento se cortaron tres muestras de cada formulación con un diámetro de 1 cm las cuales fueron pesadas en una balanza analítica ( $W_1$ ), posteriormente fueron sumergidas en 5 mL de FLS pH  $7.4 \pm 0.1$  y colocadas a 37°C, cada muestra fue pesada cada 10 min de la siguiente manera: la muestra se retiraba del SLF eliminando el exceso del mismo con papel Whatman para ser pesada posteriormente ( $W_2$ ) (Jain, Carvalho, & Banerjee, 2010; Reichl, Borrelli, & Geerling, 2011). Este procedimiento

se llevó a cabo hasta que la muestra ya no registró variación de peso para poder determinar el % de retención de agua de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Hi = \left( \frac{W_2 - W_1}{W_1} \right)$$

#### **6.4.7 Contenido Químico (CQ)**

Para determinar el contenido químico de las formulaciones se cortaron muestras de 1 cm de diámetro y fueron disueltas en 1 mL de etanol, posteriormente fueron transferidas a un matraz volumétrico de 25 mL, la solución fue leída por espectrofotometría UV-Vis (Cary 100 Varian<sup>®</sup>) a una longitud de onda de 243 nm (Velázquez-Tapia, 2018) (Anexo 2).

#### **6.4.8 Liberación *in vitro***

Se cortaron muestras de 1 cm de diámetro y se colocaron en vasos de precipitados de 50 mL con 20 mL de SLF pH 7.4±0.1. Se mantuvieron condiciones de 50 rpm a 37°C constantes durante 5 días de muestreo. Se tomaron muestras de 1.5 mL durante los tiempos establecidos. Las muestras fueron leídas a 243 nm en espectrofotómetro Cary 100 Varian<sup>®</sup> para obtener los perfiles de liberación del PA.

#### **6.5 Análisis estadístico y optimización de la formulación**

Los datos obtenidos a partir de las pruebas mecánicas y fisicoquímicas fueron analizados mediante el programa estadístico StatGraphics Centurion XV<sup>®</sup> para obtener la optimización de la formulación.

## **6.6 Optimización de la formulación**

Una vez obtenida la optimización de la formulación, esta se caracterizó de acuerdo a las pruebas mencionadas en la sección 6.4.

## **6.7 Estudios de permeación *ex vivo***

A la formulación óptima se le realizaron estudios de permeación utilizando celdas tipo Franz. Para los estudios se utilizaron, como material biológico, ojos de perro obtenidos del Laboratorio de Necropsias-MVZ de la FES-Cuautitlán, UNAM con el tratamiento mencionado en la sección 6.4.5 para conocer parámetros biofarmacéuticos: flujo, constante de permeabilidad ( $k_p$ ) y tiempo de latencia ( $t_L$ ).

En el compartimento receptor se adicionaron 7 mL de FLS pH  $7.4 \pm 0.1$  y se introdujo una barra magnética. La formulación óptima se colocó sobre el saco conjuntival y se sellaron ambos compartimentos manteniendo agitación constante a una velocidad de 50 rpm a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h (Figura 18). La toma de muestra se realizó tomando alícuotas de 1.5 mL del compartimento receptor y reponiendo el mismo volumen a la misma temperatura. Las muestras fueron analizadas espectrofotométricamente a 243 nm.

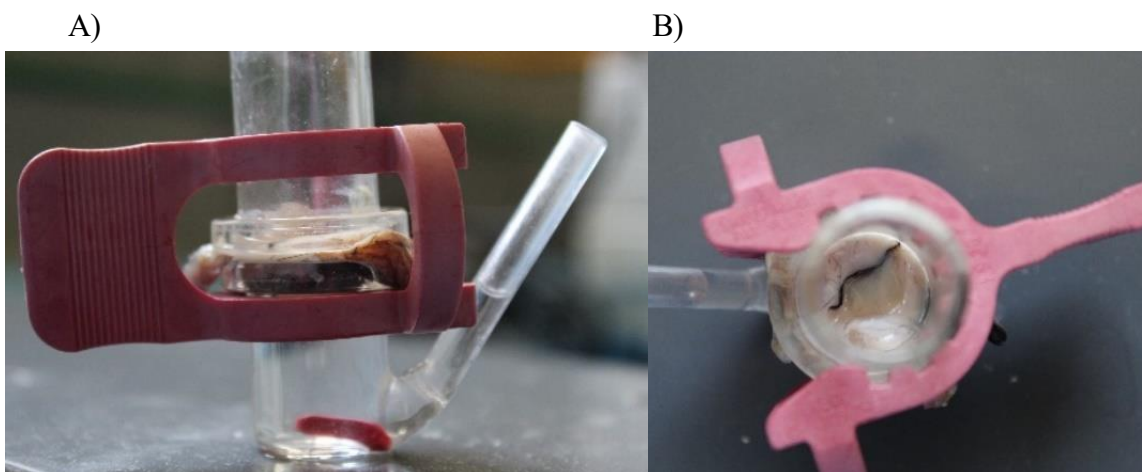


Figura 18 A) Celda tipo Franz utilizada para el estudio de permeación *ex vivo*, en la parte superior se encuentra el compartimento donador y en la inferior el receptor. B) Vista superior de celda tipo Franz donde se observa la formulación colocada sobre la estructura biológica

### 6.8 Pruebas de esterilidad

Como medios de cultivo se utilizaron Agar Soya Trypticaseína (AST) y Caldo Tioglicolato (CT) de acuerdo a la FEUM. Para el sembrado en AST se realizó un raspado con un hisopo estéril a ambas caras y bordes del IO, y para el CT se colocó un IO de 1cm de diámetro en el medio líquido. La cinética de esterilidad se llevó a cabo sometiendo las películas a distintos tiempos de radiación emitida por una lámpara UV (0, 10, 20, 30 y 60 min) y posteriormente las formulaciones fueron colocadas en ambos medios de cultivo para ser incubadas a 30-35°C. Fueron observadas durante 14 días para determinar el crecimiento microbiano.

### 6.9 Pruebas *in vivo*

Para las pruebas *in vivo* el protocolo de investigación fue sometido a su revisión y aprobación por parte del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (CICUAE-FESC) perteneciente a la UNAM, con clave de registro CICUAE-FESC C 19\_01 (Anexo 3).

Para esta última etapa, se emplearon 20 conejos albinos Nueva Zelanda de sexo indistinto con un peso aproximado de 1.5-2 kg, los cuáles fueron inspeccionados clínicamente por la M.en C. Eliza Gutiérrez Hernández, responsable del módulo de Cunicultura del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la FES- Cuautitlán, UNAM, quién realizó un examen general de visión con la finalidad de descartar la presencia de úlceras, daño corneal, alteración de la película lagrimal o indicativo de desarrollo de un proceso inflamatorio. Los 20 animales fueron transportados del Módulo de Cunicultura (FES-Cuautitlán) al Bioterio de la UIM-FESC y se les dio un período de adaptación de 2 semanas.

#### **6.9.1 Determinación de la inflamación producida por instilación de Ácido Araquidónico (AA) y por la colocación del inserto (IO)**

La primera parte experimental consistió en la elección aleatoria de 4 conejos para la realización de un estudio piloto que permitió determinar la duración del "Modelo de inflamación en conejos mediante inducción de Ácido Araquidónico" (Buturus et al., 2009; Katara & Majumdar, 2013). Al inicio de la prueba se tomó una muestra de fluido lagrimal (FL) para conocer los niveles basales de los animales, para ello se instilaron 100  $\mu$ L de SSF en el saco inferior del ojo del conejo y fueron mezclados suavemente para después recuperar la mayor cantidad posible. Posteriormente se instilaron 50  $\mu$ L de Ácido Araquidónico (AA) preparado en SSF en concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.25% en el ojo derecho y el ojo izquierdo fue utilizado como control instilando 50  $\mu$ L de SSF. Una vez transcurridos 10 minutos, se tomó la primera muestra cómo se describió previamente y los siguientes tiempos de muestreo fueron después de 1,2,4,6,10,12. 15 y 17 h.

Para determinar la irritación provocada por el IO igualmente se colocó en el ojo derecho el placebo de la FO y el ojo izquierdo fue asignado como control. La metodología utilizada fue la misma que para determinar la concentración de AA.

Para cada muestra recolectada se realizó la evaluación de la migración de las células polimorfonucleares (PMN) diluyendo 10  $\mu$ L de FL con 10  $\mu$ L líquido de Turkes para contar el número de PMN en cámara de Neubauer. Cuando el número de PMN regresó al nivel basal se dejaron de tomar muestras de fluido ya que fue posible determinar el tiempo de duración de inflamación inducido por AA y la inflamación provocada por el placebo.

### **6.9.2 Comparación del efecto antiinflamatorio de DXM en gotas (GO) e Insertos (IO)**

El resto de los animales fueron divididos de manera aleatoria en 2 grupos (N=8) con acceso libre a agua y comida:

- Grupo (1): Tratamiento convencional instilando gotas de DXM (GO).
- Grupo (2): Tratamiento alternativo administrando insertos oftálmicos de DXM (IO).

En ambos grupos se tomó primero una muestra para conocer los niveles basales de células PMN de cada sujeto y se seleccionó el ojo izquierdo como control instilando 50  $\mu$ L de SSF y en el ojo derecho se probaron las distintas formas farmacéuticas:

- Grupo (1): Se instilaron 50  $\mu$ L de solución de DXM en gotas (1 gota).
- Grupo (2): Se colocó el inserto ocular en el saco inferior del ojo del conejo.

Una vez transcurridos 10 min de la administración del tratamiento se instilaron 50  $\mu$ L de AA al 0.25%. La evaluación del modelo se llevó a cabo a partir de las siguientes pruebas:

1. Evaluación clínica: inspección en búsqueda de daño, signos de irritación, cambios en la respuesta pupilar, etc.
2. Migración de PMN: Se evaluó de la misma manera que en el grupo piloto.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Selección de polímeros

Se realizaron mezclas de polímeros de uso oftálmico en distintos porcentajes (Tabla 9) para determinar la capacidad de formar películas con las características organolépticas (Tabla 10) deseables para esta forma farmacéutica.

Tabla 9 Mezclas propuestas para la formación de películas.

Mezcla 1					Mezcla 2		
Excipiente	% (p/v) 1	% (p/v) 2	% (p/v) 3	% (p/v) 4	Excipiente	% (p/v) 1	% (p/v) 2
HPMC	0.45	1	0.45	1	PVA	0.25	3
Pluronic F-127®	5	5	10	10	HPMC	0.45	1
Benzoato de Sodio	0.5	0.5	0.5	0.5	Benzoato de Sodio	0.5	0.5
DXM	1.5	1.5	1.5	1.5	Pluronic F-127®	5	5
Agua c.b.p.	100	100	100	100	DXM	1.5	1.5
					Agua c.b.p.	100	100
Mezcla 3				Mezcla 4			
Excipiente	% (p/v) 1	% (p/v) 2		Excipiente	% (p/v) 1	% (p/v) 2	
Pluronic F-127®	5	5		PVA	2	2	
HPMC	1	1		HPMC	1	1	
PVA	1.5	2		PVP	1	5	
Ác. Hialurónico	0.3	0.3		PEG	1.6	1.6	
Benzoato de Sodio	0.5	0.5		Benzoato de Sodio	0.5	0.5	
DXM	1.5	1.5		DXM	1.5	1.5	
Agua c.b.p.	100	100		Agua c.b.p.	100	100	

HPMC: Hidroxipropilmetil celulosa; PVA: Polivinil alcohol; DXM: Fosfato sódico de Dexametasona; PVP: Polivinilpirrolidona K30; PEG: Polietilenglicol



**Continuación Tabla 9.**

Mezcla 5			Mezcla 6		
Excipiente	% (p/v) 1	% (p/v) 2	Excipiente	% (p/v) 1	% (p/v) 2
Quitosán	3	3	Quitosán	3	3
Ác. Láctico	1	2	Ác. Acético	1	2
DXM	1.5	1.5	DXM	1.5	1.5
Mezcla 7			Mezcla 8		
Excipiente	% (p/v)		Excipiente	% (p/v)	
Eudragit® RS100	5		Eudragit RS® 100	5	
PVP K-30	10		Kollocoat® IR	10	
Trietilcitrate	15*		Trietilcitrate	15*	
DXM	1.5		DXM	1.5	
*Respecto al polímero					

HPMC: Hidroxipropilmetil celulosa; PVA: Polivinil alcohol; DXM: Fosfato sódico de Dexametasona; PVP: Polivinilpirrolidona K30; PEG: Polietilenglicol

Tabla 10 Características organolépticas de las mezclas.

Mezcla 1					Mezcla 2		
Característica	1	2	3	4	Característica	1	2
Formación de película	Sí	Sí	Sí	Sí	Formación de película	Sí	Sí
Facilidad para despegar (Adhesión)	-	-	-	-	Facilidad para despegar (Adhesión)	-	-
Flexibilidad	±	±	-	+	Flexibilidad	±	+
Opacidad	±	±	+	+	Opacidad	±	±

**Continuación Tabla 10.**

Mezcla 3			Mezcla 4		
Característica	1	2	Característica	1	2
Formación de película	Sí	Sí	Formación de película	Sí	Sí
Facilidad para despegar (Adhesión)	+	+	Facilidad para despegar (Adhesión)	+	+
Flexibilidad	±	+	Flexibilidad	±	+
Opacidad	±	±	Opacidad	±	±
Mezcla 5			Mezcla 6		
Característica	1	2	Característica	1	2
Formación de película	Sí*	Sí*	Formación de película	Sí*	Sí*
Facilidad para despegar (Adhesión)	±	±	Facilidad para despegar (Adhesión)	±	±
Opacidad	-	-	Opacidad	+	+
Mezcla 7			Mezcla 8		
Característica	1		Característica	1	
Formación de película	Sí		Formación de película	Sí	
Facilidad para despegar (Adhesión)	++		Facilidad para despegar (Adhesión)	±	
Flexibilidad	++		Flexibilidad	++	
Opacidad	--		Opacidad	--	

-: No forma película; ±: no se forma por completo; +: formación de película; ++: películas formadas y de fácil manipulación

\*Al adicionar la DXM se forma un precipitado que se disuelve al incrementar la temperatura con lo que ya es posible la formación de la película.

## 7.2 Composición del inserto oftálmico y estandarización del método de preparación

A partir de los resultados obtenidos en los estudios de preformulación, se eligieron los polímeros y el resto de los excipientes (Tabla 11) necesarios para la preparación de los insertos.

Tabla 11 Componentes de la Formulación

<b>Componente</b>	<b>% (p/v)</b>	<b>Función</b>
Fosfato Sódico de Dexametasona	1.5	Principio Activo
Eudragit RS <sup>®</sup> 100	1-5	Agente filmógeno
PVP K-30	3.5-10	Agente filmógeno
Propilenglicol	20	Cosolvente/Conservador
Trietilcitrate	15*	Plastificante
Ácido Bórico	1.404	Agente Isotonizante/Conservador
Agua-Etanol	7.5 mL	Medio de disolución

\*Respecto al polímero

A su vez, cuando se establecieron los excipientes de la formulación final, se estandarizó el método de preparación de los IO como se muestra en el diagrama 4.



Diagrama 4 Estandarización de la preparación de los Insertos Oftálmicos (IO).

De acuerdo a los resultados en la sección 7.2 se planteó un diseño experimental de superficie respuesta teniendo como características del diseño base los mencionados en la Tabla 12 y en la Tabla 13, en estas se encuentran los niveles de las variables de estudio y las variables de respuesta elegidas para el diseño.

Tabla 12 Atributos del Diseño Compuesto Central (DCC).

Número de factores experimentales	2
Número de bloques	3
Número de respuestas	10
Número de corridas	11, incluyendo 3 puntos centrales por bloque
Grados de libertad para el error	5

Tabla 13 DCC para la formulación de insertos oftálmicos.

Factores	Variables de estudio		Variables de Respuesta
Eudragit <sup>®</sup> RS100	Bajo	1%	1. Masa (mg) 2. Espesor (mm) 3. pH 4. Tensión a la ruptura (g) 5. Humedad (%) 6. Fuerza de Mucoadhesión <i>ex vivo</i> (g) 7. Tiempo de mucoadhesión <i>ex vivo</i> (h) 8. Contenido Químico (%) 9. Liberación <i>in vitro</i> (%) 10. Hinchamiento (%)
	Alto	5%	
PVP-K30	Bajo	3.5%	
	Alto	10%	

### 7.3 Caracterización Físicoquímica y evaluación *in vitro-ex vivo*

Los resultados de la caracterización físicoquímica y evaluación *in vitro-ex vivo* de las once formulaciones del DCC se resumen en la Tabla 14 y 15.

Tabla 14 Caracterización fisicoquímica de los insertos oftálmicos.

<b>Formulación</b>	<b>VM (mg)</b>	<b>VE (mm)</b>	<b>pH</b>	<b>TR (gF)</b>	<b>HU (%)</b>
<b>F1</b>	0.45±0.08	0.44±0.08	6.96±0.04	11.25±17.94	16.67±11.07
<b>F2</b>	0.35±0.08	0.28±0.08	7.04±0.04	18.25±17.94	21.46±11.07
<b>F3</b>	0.33±0.08	0.43±0.08	7.03±0.04	15.50±17.94	25.32±11.07
<b>F4</b>	0.20±0.08	0.24±0.08	7.00±0.04	71.16±17.94	42.28±11.07
<b>F5</b>	0.27±0.08	0.27±0.08	7.11±0.04	20.50±17.94	37.80±11.07
<b>F6</b>	0.29±0.08	0.40±0.08	6.96±0.04	32.83±17.94	24.73±11.07
<b>F7</b>	0.38±0.08	0.25±0.08	6.99±0.04	24.50±17.94	17.57±11.07
<b>F8</b>	0.37±0.08	0.29±0.08	7.01±0.04	12.50±17.94	16.30±11.07
<b>F9</b>	0.21±0.08	0.20±0.08	7.01±0.04	7.50±17.94	37.77±11.07
<b>F10</b>	0.42±0.08	0.33±0.08	6.99±0.04	36.00±17.94	43.33±11.07
<b>F11</b>	0.36±0.08	0.24±0.08	7.01±0.04	14.66±17.94	14.99±11.07

VM: Variación de masa; VE: variación de espesor; TR: Tensión a la rotura; HU: Porcentaje de humedad

Tabla 15 Evaluación *in vitro-ex vivo* de los insertos oftálmicos

<b>Formulación</b>	<b>FM (gF)</b>	<b>TM * (h)</b>	<b>CQ (%)</b>	<b>PL (%)</b>	<b>HI (g)</b>
<b>F1</b>	9±3.82	120	95.71±1.10	11.55±1.42	0.07±0.03
<b>F2</b>	16±3.82	120	98.00±1.10	14.20±1.42	0.08±0.03
<b>F3</b>	6.5±3.82	120	97.24±1.10	9.80±1.42	0.05±0.03
<b>F4</b>	8±3.82	120	98.77±1.10	13.11±1.42	0.14±0.03
<b>F5</b>	17.5±3.82	120	98.58±1.10	11.77±1.42	0.05±0.03
<b>F6</b>	12.5±3.82	120	95.71±1.10	11.66±1.42	0.06±0.03
<b>F7</b>	10.5±3.82	120	98.39±1.10	13.95±1.42	0.09±0.03
<b>F8</b>	8.5±3.82	120	98.39±1.10	14.50±1.42	0.1±0.03
<b>F9</b>	6.5±3.82	120	97.24±1.10	11.83±1.42	0.06±0.03
<b>F10</b>	13.5±3.82	120	96.86±1.10	11.95±1.42	0.03±0.03
<b>F11</b>	7.5±3.82	120	98.20±1.10	13.24±1.42	0.07±0.03

FM: Fuerza de mucoadhesión; TM: tiempo de mucoadhesión; CQ: Contenido químico; PL: Porcentaje de fármaco liberado; HI: Hinchamiento

\*La prueba se realizó durante 120 h sin observar ningún desprendimiento de la mucosa por lo que no se reportó valor en la desviación estándar.

### 7.3.1 Variación de Masa (VM)

Los insertos fueron cortados con diámetro de 1 cm y de cada formulación 10 fueron elegidos al azar para determinar su peso promedio (Figura 19).

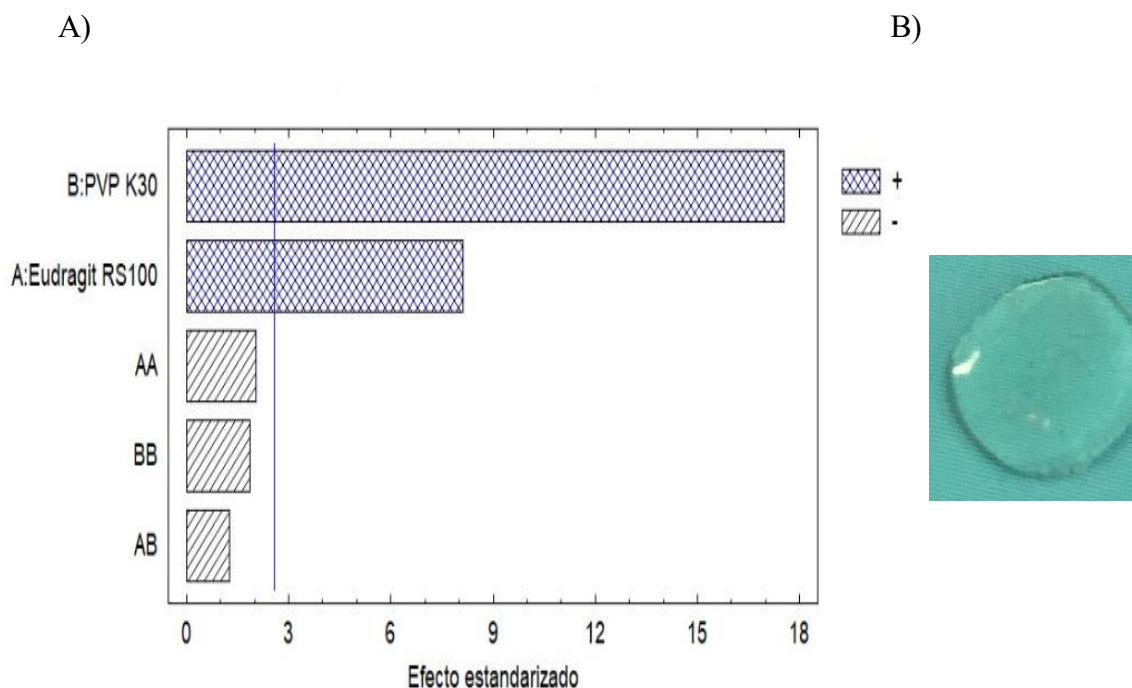
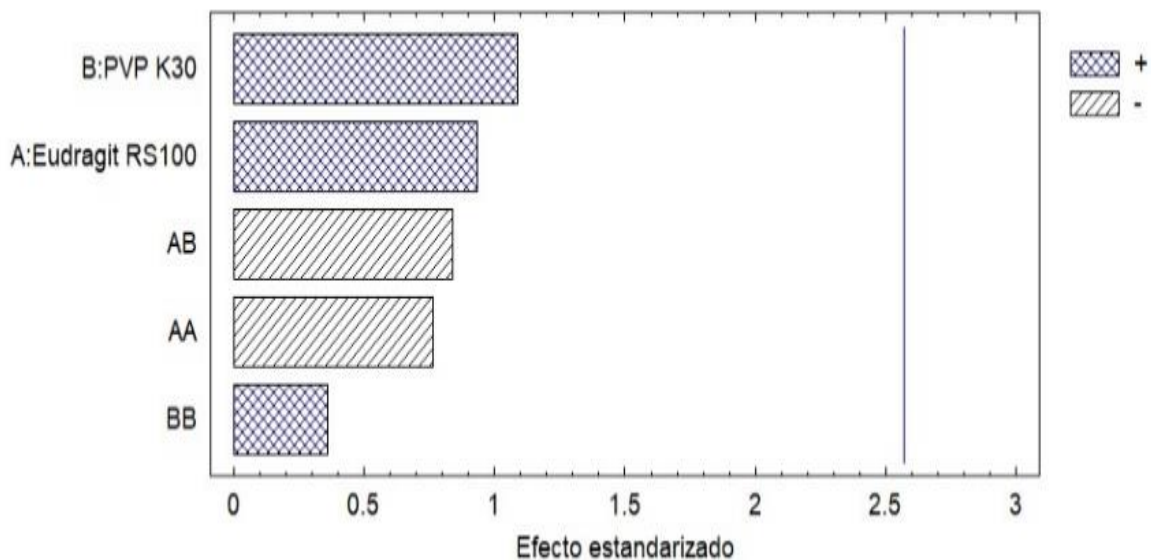


Figura 19 A) Diagrama de Pareto para variación de Masa. El diagrama muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de magnitud indicando que para la VM el % de PVP K30 y ERS100 son estadísticamente significativos de manera positiva con un nivel de confianza del 95%. B) Fotografía del Inserto Ocular cargado con Dexametasona

### 7.3.2 Variación de Espesor (VE)

Para determinar la VE se midieron 10 muestras de cada formulación en distintos puntos obteniendo los resultados de la figura 20.



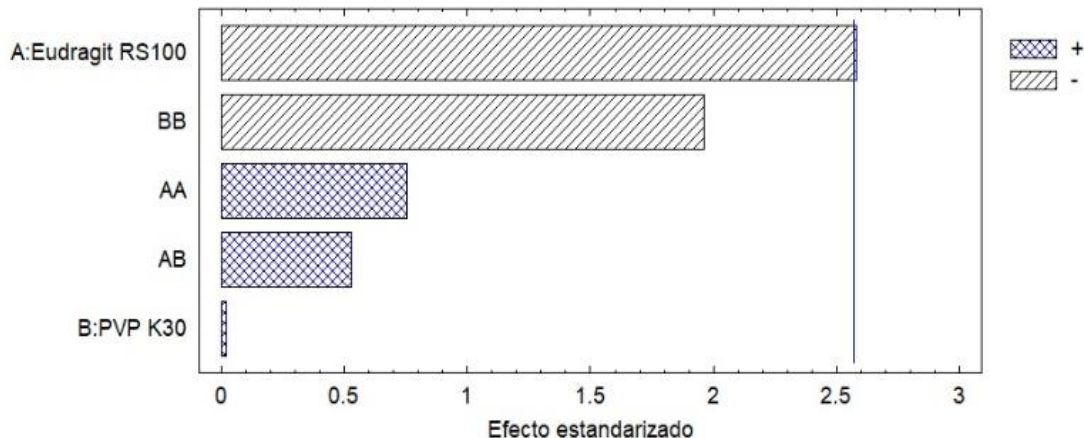


*Figura 20 Resultados Variación de Espesor. En el diagrama se observa que todos los valores se encuentran por debajo de la línea vertical por lo cual no son estadísticamente significativos con un 95.0% de nivel de confianza.*

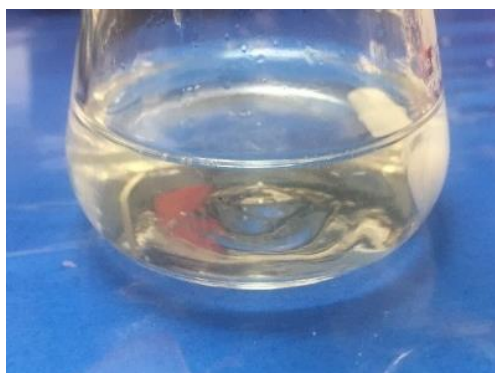
### 7.3.3 pH de la formulación

Las mediciones de pH se realizaron utilizando un potenciómetro con la finalidad de establecer que dicha característica se encuentra dentro del valor reportado(6..8-8) (Baeyens et al., 2000) para ser utilizada por vía oftálmica.

A)



B)



*Figura 21. A) Resultados pH. El diagrama indica que dentro de los factores experimentales ERS100® tiene diferencia estadísticamente significativa de manera negativa. B) Las mediciones de pH se realizaron a la formulación antes de ser vertida a los moldes*

#### 7.3.4 Tensión a la ruptura (TR)

La determinación de la tensión a la ruptura se llevó a cabo eligiendo 3 muestras al azar correspondientes a F1-F11, obteniendo gráficos como los reportados en la figura 22 B, en los cuales se observa la máxima tensión que es ejercida sobre la formulación que ha sido colocada entre las pinzas del equipo (Figura 22 A).

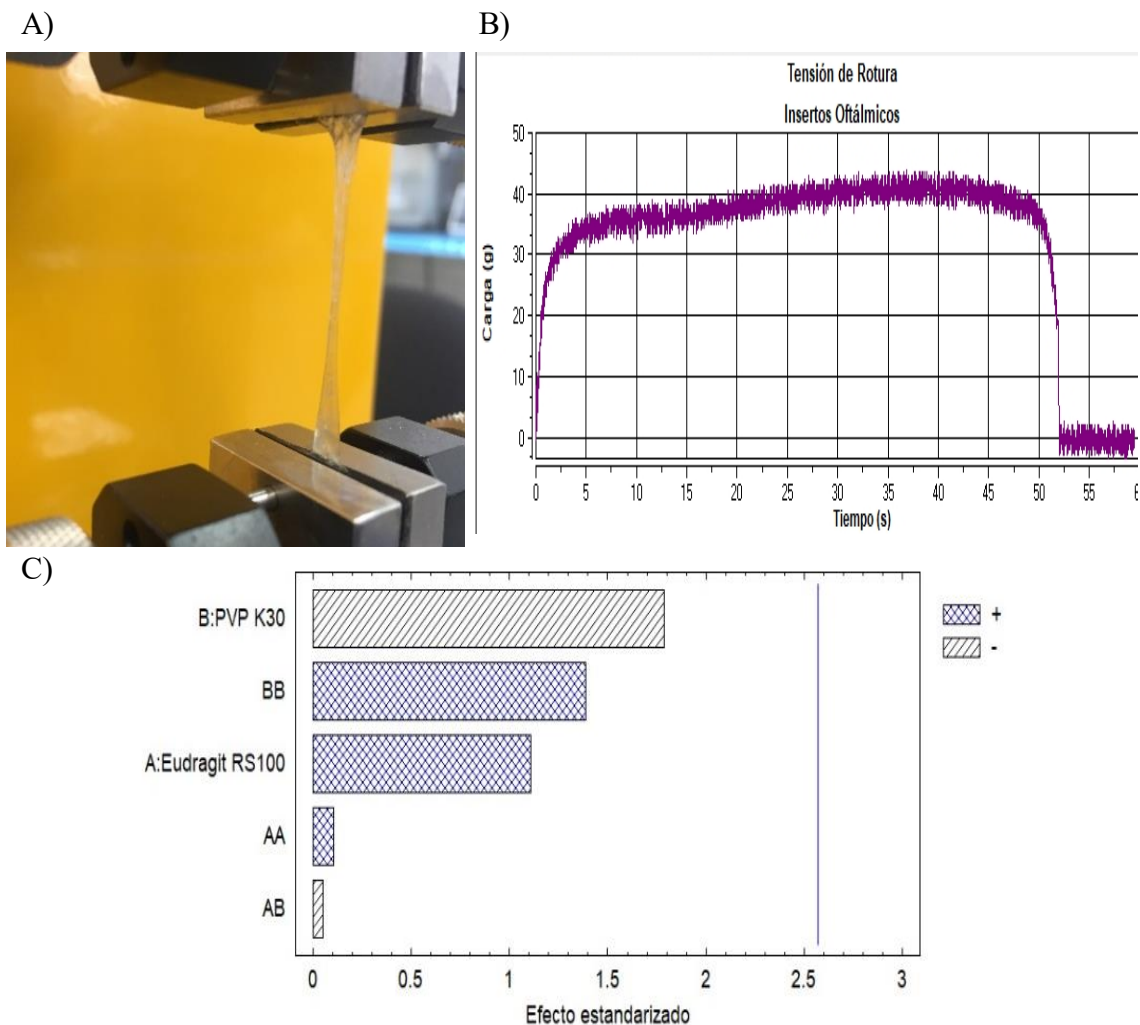
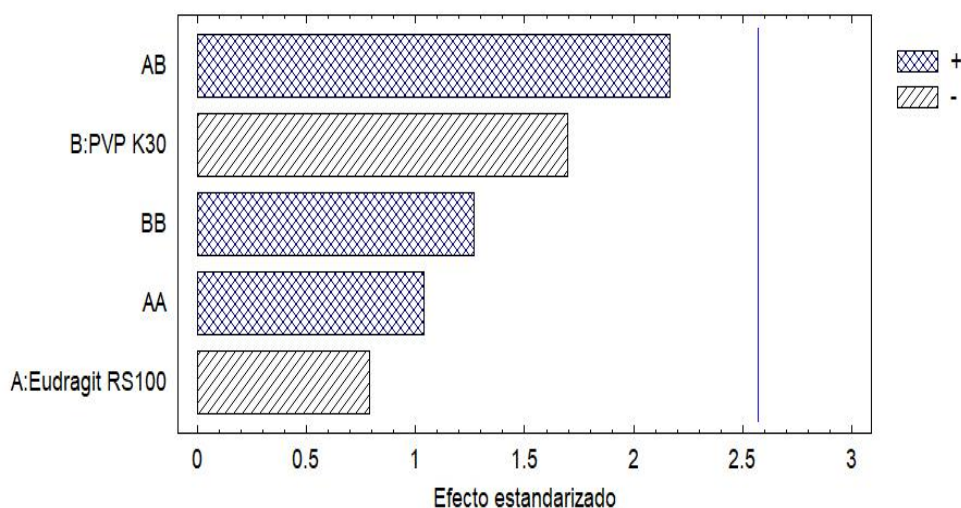


Figura 22 A) Elongación del inserto durante la prueba. B) Gráfico que representa la tensión a la rotura de los insertos oftálmicos, la máxima tensión es el pico de carga más alto. C) Diagrama de Pareto que muestra el efecto de cada factor sobre la propiedad medida, así como las interacciones de las mismas. En este caso Ningún factor tiene efecto estadísticamente significativo.

### 7.3.5 % Humedad

La humedad de los insertos oftálmicos se determinó en termobalanza obteniendo como resultado promedio 27.1% de Humedad para las formulaciones. En la figura 23 al observar el diagrama de efectos principales ninguno es estadísticamente significativo, sin embargo, la

interacción que influye es la relación existente entre la concentración de polímeros utilizados, teniendo un efecto sinérgico sobre la propiedad evaluada.



*Figura 23 Diagrama de Pareto para los resultados de humedad. No hay diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, la interacción principal se da entre la concentración de PVP K30 y ERS® 100.*

### 7.3.6 Fuerza de Mucoadhesión (FM) *ex vivo*

La FM *ex vivo* se realizó utilizando globos oculares y sacos conjuntivales de perros (Tabla 16) obtenidos del Laboratorio de Necropsias de FES-Cuautitlán UNAM, en la figura 24A se ilustra la ejecución de la prueba; cada formulación se colocó en la base de la sonda cilíndrica la cual descendió y ejerció fuerza sobre la estructura anatómica para después ser retirada y obtener gráficos como el que se encuentra en la figura 24B en donde se observó el pico más alto que indicó la máxima fuerza que ejerció el pistón sobre la estructura y que al ser retirado (decrecimiento) permitió determinar la fuerza necesaria para retirar la formulación (valle de la gráfica) que indica el valor de la mucoadhesión. En el diagrama de Pareto (Figura 24C) se

observó que no hay diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, la mayor interacción se encuentra relacionada con la concentración de Eudragit RS®100.

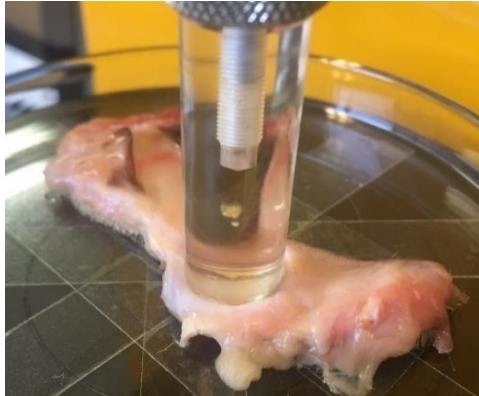
Tabla 16 Valores Fuerza de Mucoadhesión *ex vivo*

<b>Formulación</b>	<b>Saco conjuntival (SC) (gF)</b>	<b>Globo ocular (GOC) (gF)</b>
<b>F1</b>	9	4
<b>F2</b>	16	4.5
<b>F3</b>	6.5	6
<b>F4</b>	8	5
<b>F5</b>	17.5	8.5
<b>F6</b>	12.5	5
<b>F7</b>	10.5	4.5
<b>F8</b>	8.5	5.5
<b>F9</b>	6.5	6
<b>F10</b>	13.5	8.5
<b>F11</b>	7.5	4

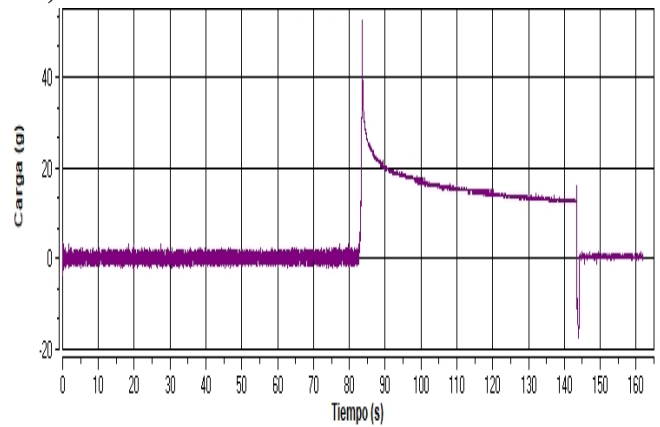
### 7.3.7 Tiempo de mucoadhesión (TM) *ex vivo*

Al igual que la FM, la prueba fue realizada sobre porciones de aproximadamente 1 cm de diámetro de saco conjuntival utilizando FLS a 50rpm/37°C (Figura 25A) y fueron evaluadas por 120 h para conocer si la formulación se desprendía de la zona de colocación demostrando que durante ese tiempo las formulaciones permanecen en el área que pretende utilizarse como zona de administración de la forma farmacéutica (Figura 25B).

A)



B)



C)

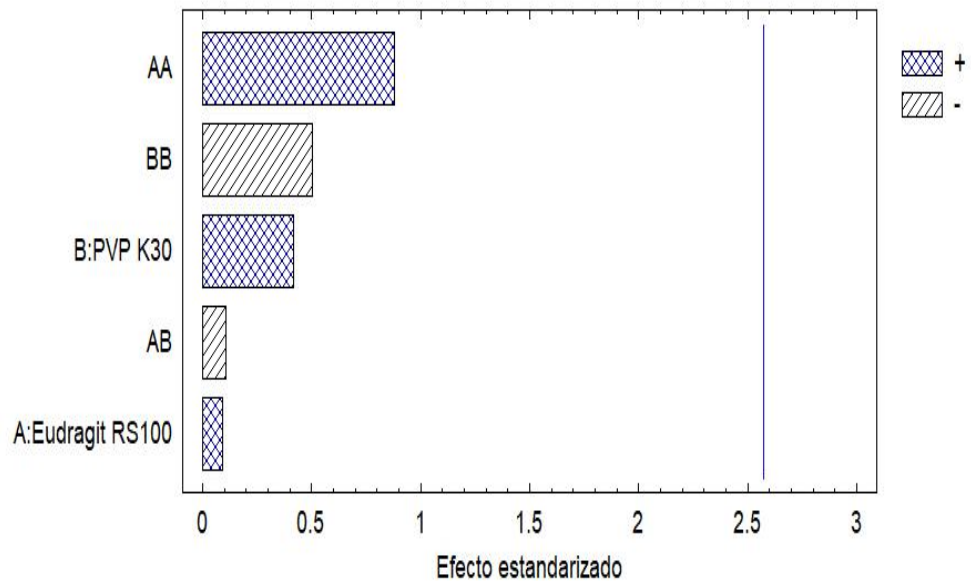


Figura 24 A) Fotografía del equipo TextureAnalyzer con la sonda TA-10 midiendo la fuerza de mucoadhesión de los Insertos Oculares (IO) al saco conjuntival. B) Gráfico que representa la adhesión de los insertos oftálmicos al saco conjuntival, el valle representa la fuerza (gF) con que se adhiere el inserto. C) Diagrama de Pareto con los efectos estandarizados, no hay diferencia estadísticamente significativa entre los niveles y las interacciones.

### 7.3.8 Contenido Químico

Las pruebas de contenido químico se realizaron de acuerdo a la normatividad regulatoria mexicana vigente (FEUM, 2016), en este caso se comparó el contenido de PA de cada formulación por espectrofotometría UV-Vis con la finalidad de conocer si estaban dentro de los límites establecidos (90-110%). Las formulaciones evaluadas (F1-F11) tienen un contenido químico en un rango entre 95.71-98.77% y las diferencias entre el contenido de cada formulación no son estadísticamente significativas (Figura 26).

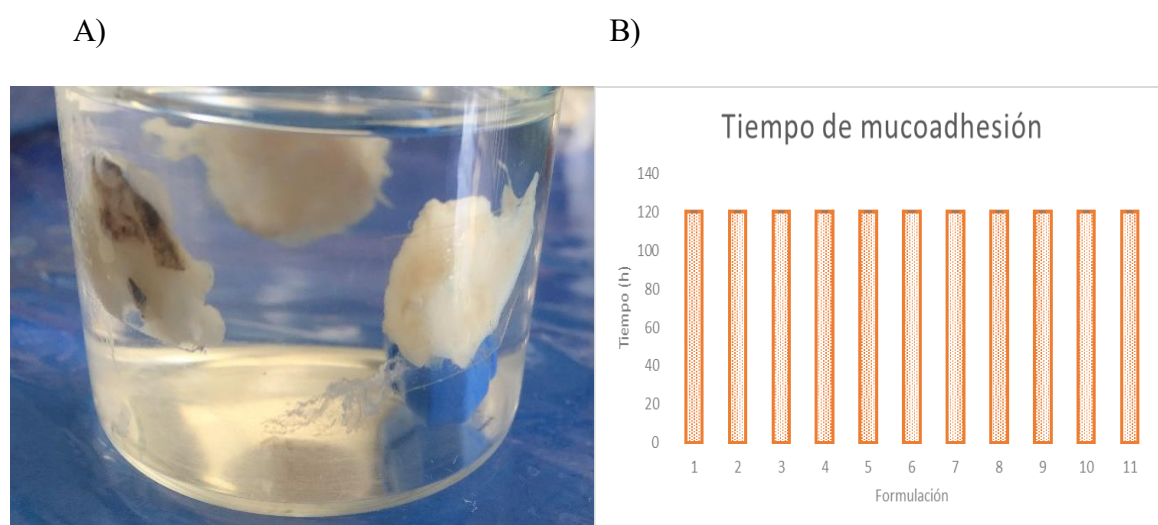


Figura 25 A) Resultados tiempo de mucoadhesión, no se observa la desviación estándar debido a que en las repeticiones no hubo desprendimiento del inserto durante el tiempo de observación. B) Fotografía para la determinación del tiempo de mucoadhesión del inserto al saco conjuntival en fluido lagrimal simulado (50 rpm-37°C)

### 7.3.9 % Liberación *in vitro* (PL)

La prueba de liberación se realizó colocando la formulación en FLS para proceder a la cuantificación del % de fármaco liberado de las matrices poliméricas por espectrofotometría UV-Vis obteniendo liberaciones en un promedio del 12.5% respecto a la cantidad de fármaco con que fueron cargadas (Figura 27). Los resultados que se observaron en la figura 27B del

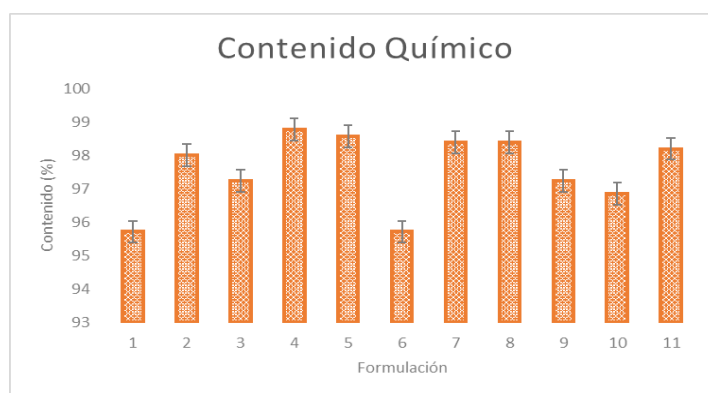


diagrama de Pareto indican que la interacción de mayor magnitud que tuvo mayor efecto sobre la liberación del PA fue entre los polímeros PVP K.30 y ERS100.

### 7.3.10 Hinchamiento (HI)

El hinchamiento es una prueba que indica el movimiento de cadenas poliméricas que permiten la incorporación de moléculas del medio circundante, en este caso SLF a 37°C; para realizar la prueba se tomaron muestras durante intervalos de 10 min hasta obtener un peso constante. Los resultados de hinchamiento demostraron que el peso incrementó en las distintas formulaciones en un rango comprendido entre 0.02-0.13 g (Figura 28).

A)



B)

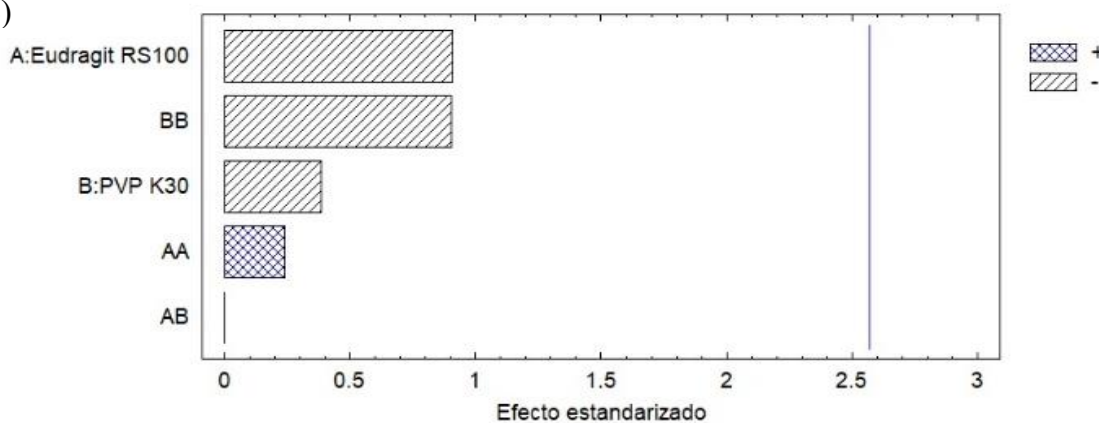


Figura 26 Resultados Contenido Químico A) Gráfica que muestra los % CQ en un rango ente 95.71-98.77%. B) Diagrama de Pareto que muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa.



A)

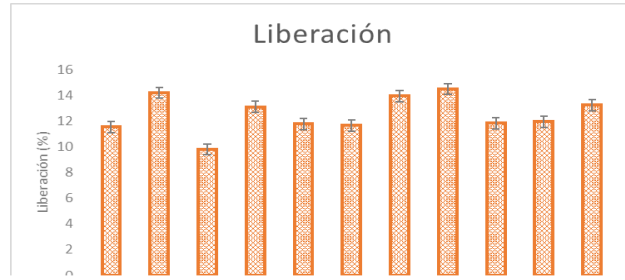
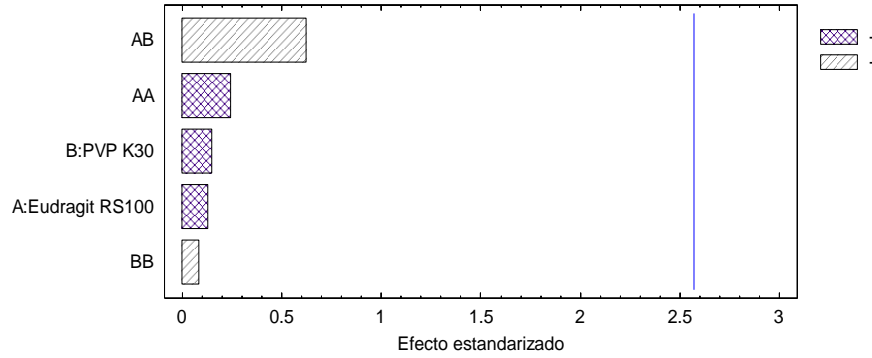


Diagrama de Pareto Estandarizada para Liberación

B)



C)

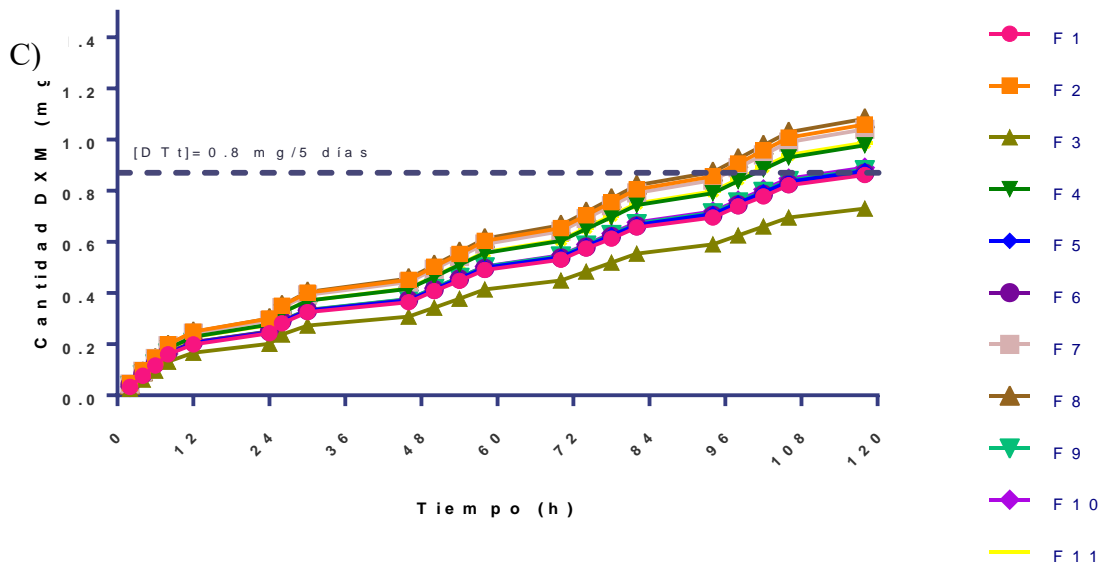
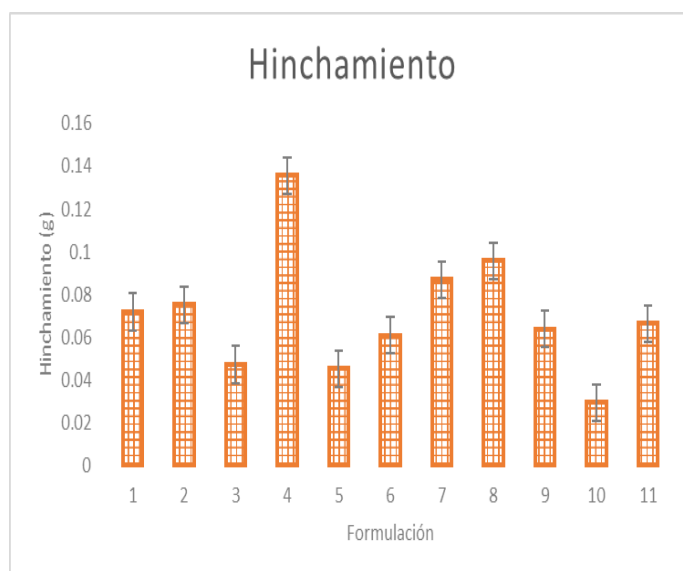


Figura 27 A) Porcentaje de fármaco liberado, en promedio 12.5 % a 50 rpm/37°C. B) En el diagrama se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los factores analizados, sin embargo, la barra de mayor magnitud corresponde a la interacción entre los polímeros que forman la forma farmacéutica. C) Resultados de la liberación del principio activo del Inserto Ocular; la línea punteada representa la dosis terapéutica teórica (DTt) considerando la administración oftálmica cada 2 horas.

A)



B)

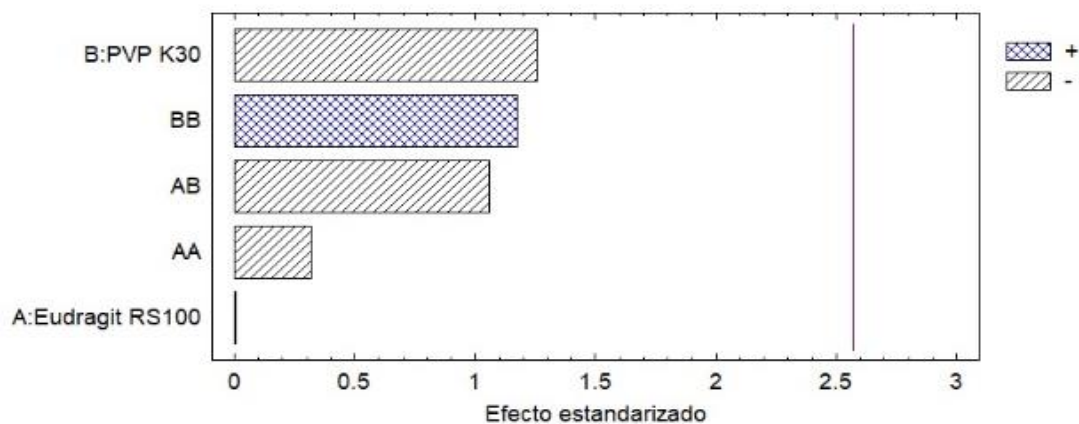
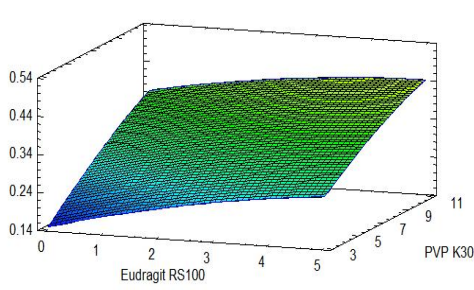


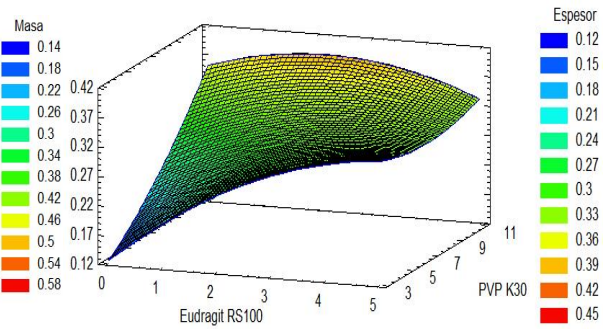
Figura 28 A) Resultados de variación de hinchamiento con un promedio de retención de SLF de 0.02 g. B) Diagrama de Pareto en el que ninguna interacción es estadísticamente significativa, sin embargo, las barras indican que el PVPK30 tiene el mayor efecto sobre la propiedad de manera negativa.

A continuación, se muestran las Gráficas de Superficie Respuesta en 3D (Figura 29) correspondientes a las 10 variables elegidas en el DCC, con excepción del Tiempo de Mucoadhesión (TM) *ex vivo* debido a que no hay variación en los resultados obtenidos (Figura 25B). En este tipo de diagramas, la gráfica 3D muestra una vista tridimensional de la superficie, lo que es útil para establecer los valores de respuesta.

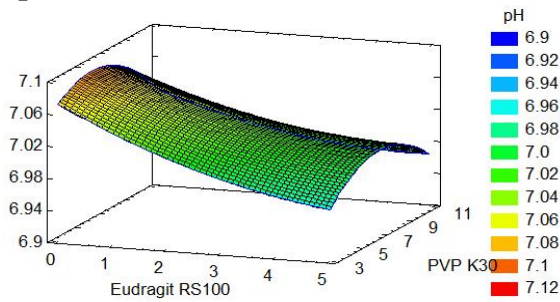
### Variación de Masa (VM)



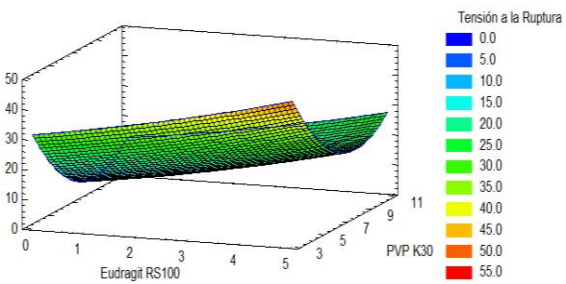
### Variación de Espesor (VE)



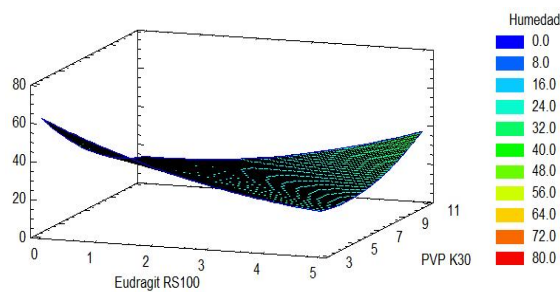
### pH



### Tensión a la Rotura (TR)



### % Humedad (HU)



### Fuerza de Mucoadhesión (FM)

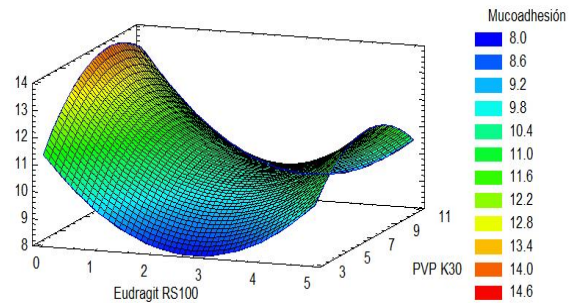
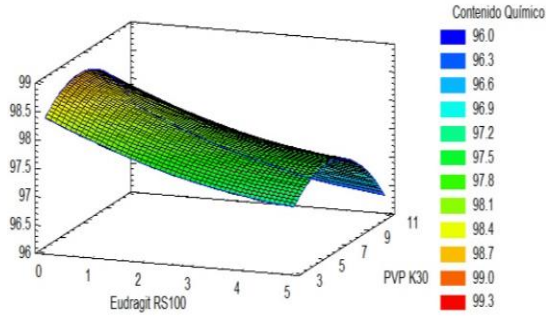
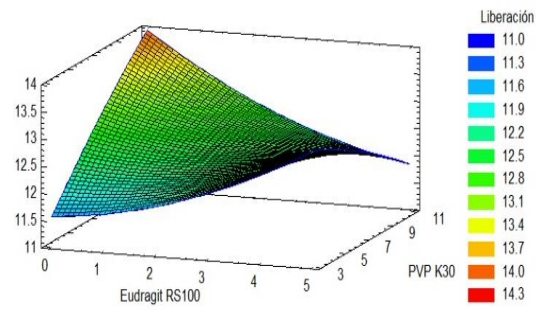


Figura 29 Gráficas de Superficie Respuesta correspondientes a las Variables de estudio del Diseño Experimental.

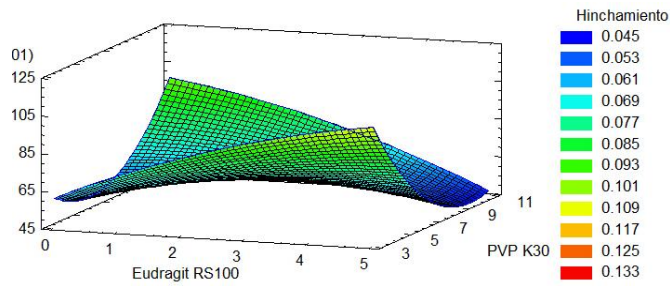
### Contenido Químico (CQ)



### Liberación (PL)



### Hinchamiento (HI)



## 7.4 Optimización de la Formulación

Una vez analizados los datos obtenidos en la caracterización fisicoquímica, se realizó la optimización de la formulación; para ello se eligieron como variables de respuesta VE, FM, PL e HI. De esta manera se obtuvo un valor óptimo de la deseabilidad igual a 0.719274 y las cantidades óptimas de cada polímero para obtener formulaciones con las características deseadas (Tabla 17, Figura 30).

Tabla 17 Optimización de la formulación

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Eudragit® RS100	0.17157	5.82843	0.171517
PVP K30	2.15381	11.3462	6.4554
Respuesta Estimada			
VE	0.214274 mm		
FM	13.2152 gF		
PL	12.6596 %		
HI	0.0558292 g		

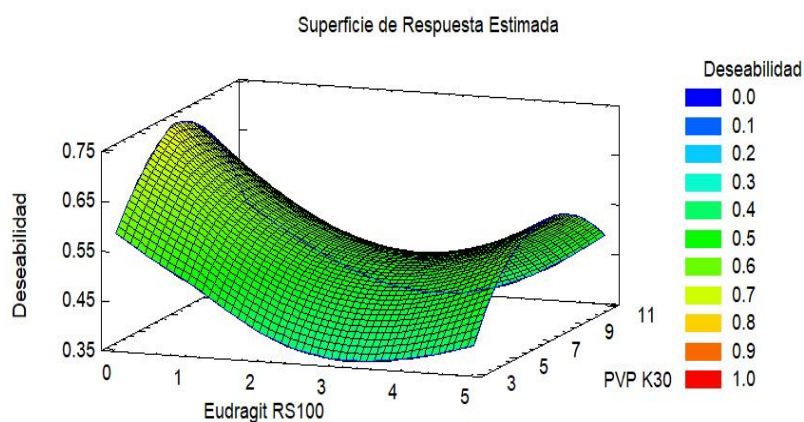


Figura 30 Gráfica 3D representando la optimización de la formulación.

Una vez que se conocieron los valores esperados para la formulación óptima, esta fue preparada con el método estandarizado descrito en la sección (Diagrama 4) y se caracterizó de acuerdo a las pruebas mencionadas en la metodología (Sección 6.4.) obteniendo los resultados que se encuentran en la tabla 18.

Tabla 18 Resultados de la optimización de la formulación

<b>Variable</b>	<b>Resultado</b>
Espesor (mm)	0.265±0.095
pH	7.11±0.04
Resistencia a la ruptura (gF)	15.50±3.94
% Humedad	22.54±1.7
Fuerza de mucoadhesión (gF)	16.89±3.46
Contenido químico (%)	98.19±1.124
Liberación (%)	13.51±0.71
Hinchamiento (g)	0.0403±0.023

### 7.5 Permeaciones *ex vivo*

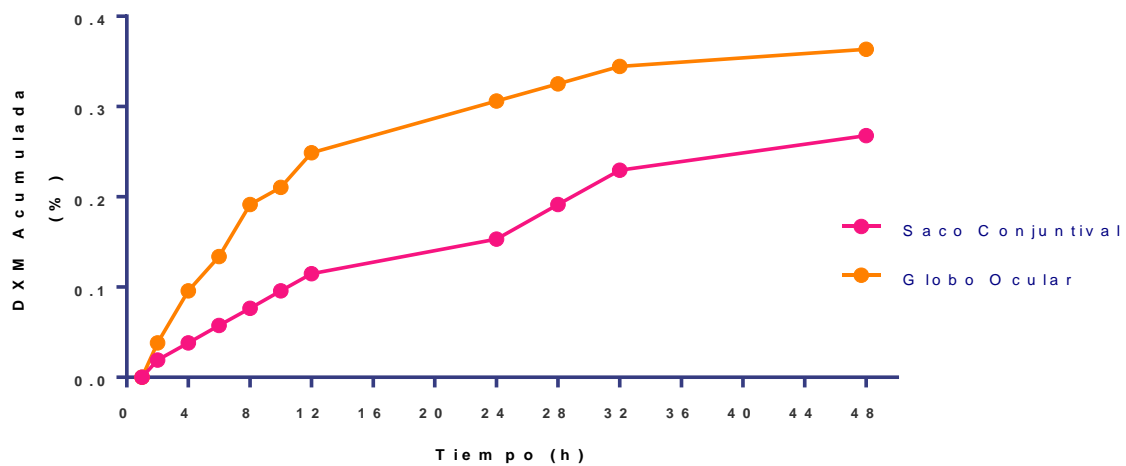
Después de obtener los resultados correspondientes a la caracterización mecánica y fisicoquímica de la formulación óptima, se inició el estudio de permeación *ex vivo* utilizando como estructuras anatómicas el saco conjuntival y el globo ocular, la prueba se realizó con la finalidad de obtener la cantidad de fármaco acumulada (Tabla 19) contenida en el compartimento receptor de las celdas tipo Franz, determinando que durante 48 horas se obtiene un porcentaje acumulado de DXM de 0.26% en el saco conjuntival y 0.36% en el globo ocular respecto al 100% con el que el inserto ocular fue cargado (7.46 mg). Igualmente, la finalidad de esta prueba fue la evaluación cinética de la captación del fármaco y su difusión

a través de las estructuras biológicas (Figura 31A), sin embargo, debido a la baja cantidad de fármaco liberado (menor al 70%) (Figura 31B) no fue posible obtener los parámetros cinéticos correspondientes al tiempo de latencia (h), el flujo( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) y la  $K_p(\text{cm}^2/\text{h})$ .

Tabla 19 Cantidad acumulada (%) y porcentaje de DXM acumulada en saco conjuntival y globo ocular durante 48 h utilizando celdas tipo Franz.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Saco Conjuntival</b>	<b>Globo Ocular</b>	<b>Saco Conjuntival</b>	<b>Globo Ocular</b>
	<b>Cantidad acumulada (mg)</b>	<b>Cantidad acumulada (mg)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>1</b>	0	0	0	0
<b>2</b>	0.00142	0.00285	0.01913	0.03826
<b>4</b>	0.00285	0.00713	0.03826	0.09567
<b>6</b>	0.00428	0.00999	0.05740	0.13394
<b>8</b>	0.00570	0.01427	0.07653	0.19134
<b>10</b>	0.00713	0.01570	0.09567	0.21047
<b>12</b>	0.00856	0.01855	0.11480	0.24874
<b>24</b>	0.01141	0.02283	0.15307	0.30615
<b>28</b>	0.01427	0.02426	0.19134	0.32528
<b>32</b>	0.01712	0.02569	0.22961	0.34441
<b>48</b>	0.01998	0.02712	0.26788	0.36355

A)



B)

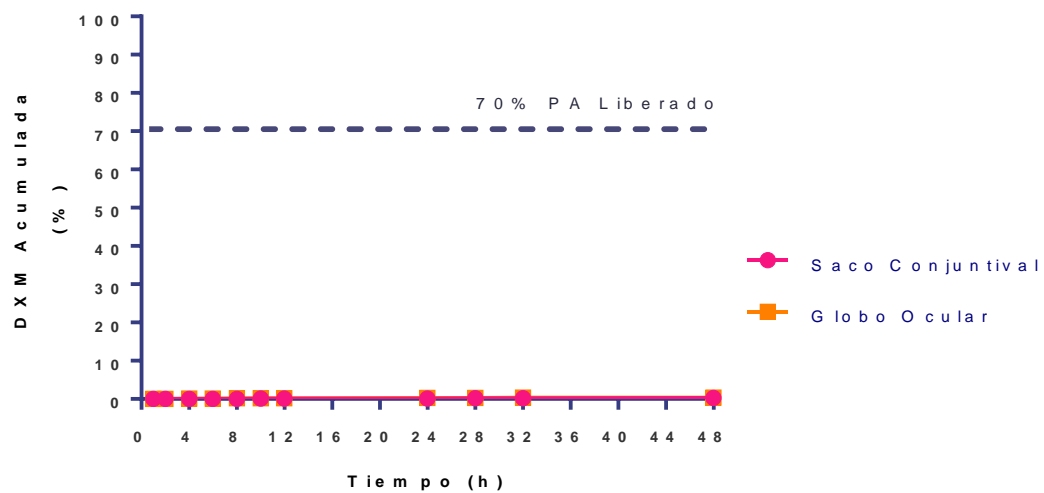


Figura 31 A) % cuantificado de DXM en el compartimento receptor de las celdas tipo Franz. B) % de DXM acumulada durante las permeaciones ex vivo. Se observa que la cantidad que se cuantificó no es un valor cercano al 70%.



## 7.6 Esterilidad

Dentro de los parámetros críticos de calidad de las formas farmacéuticas que se administran por vía oftálmica se encuentra garantizar la esterilidad de éstas, por lo que muestras de 1 cm de diámetro de la formulación óptima (FO) se sometieron a distintos tiempos de radiación UV y fueron sembradas en AST y CT a 30-35°C durante 14 días. La prueba se realizó por triplicado para cada tiempo de radiación y se realizó la observación de los medios de cultivo para realizar el reporte de crecimiento microbiológico, los resultados se resumen en la Tabla 20.

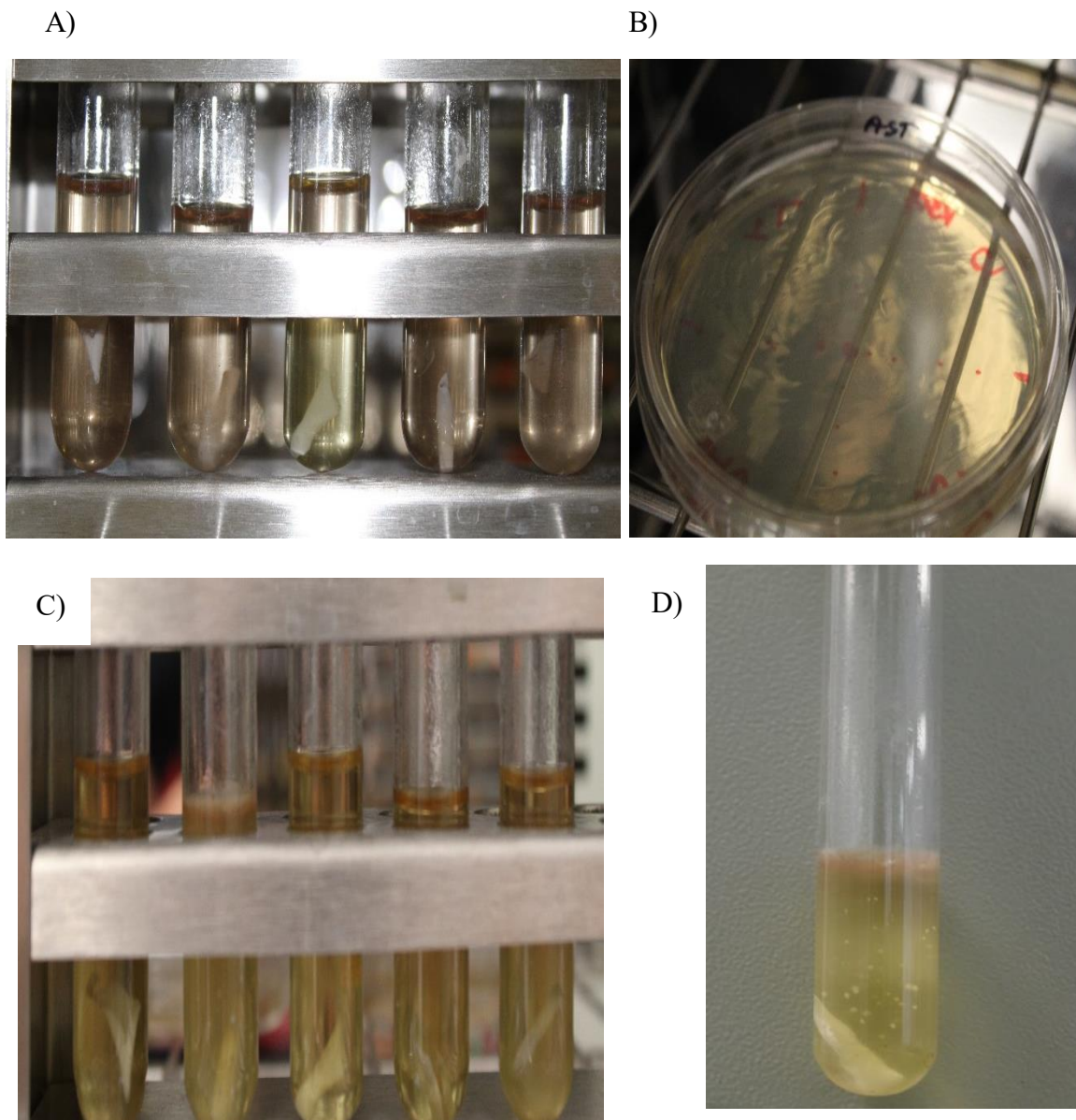
Tabla 20 Resultados de la prueba de esterilidad para determinar el tiempo de radiación UV.

Tiempo de incubación	Tiempo de radiación (min)	Crecimiento Microbiano CT	Crecimiento Microbiano AST
<b>Día 1</b>	0	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	10	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	20	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	30	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	60	Sin desarrollo	Sin desarrollo
<b>Día 2</b>	0	<b>En desarrollo</b>	Sin desarrollo
	10	<b>En desarrollo</b>	Sin desarrollo
	20	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	30	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	60	Sin desarrollo	Sin desarrollo
<b>Día 3</b>	0	<b>En desarrollo</b>	Sin desarrollo
	10	<b>En desarrollo</b>	Sin desarrollo
	20	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	30	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	60	Sin desarrollo	Sin desarrollo
<b>Día 4</b>	0	<b>En desarrollo</b>	<b>En desarrollo</b>
	10	<b>En desarrollo</b>	<b>En desarrollo</b>
	20	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	30	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	60	Sin desarrollo	Sin desarrollo

**Continuación Tabla 20.**

<b>Día 5</b>	<b>0</b>	<b>En desarrollo</b>	<b>En desarrollo</b>
	10	<b>En desarrollo</b>	<b>En desarrollo</b>
	20	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	30	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	60	Sin desarrollo	Sin desarrollo
<b>Día 10</b>	<b>0</b>	<b>En desarrollo</b>	<b>En desarrollo</b>
	10	<b>En desarrollo</b>	<b>En desarrollo</b>
	20	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	30	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	60	Sin desarrollo	Sin desarrollo
<b>Día 14</b>	<b>0</b>	<b>En desarrollo</b>	<b>En desarrollo</b>
	10	<b>En desarrollo</b>	<b>En desarrollo</b>
	20	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	30	Sin desarrollo	Sin desarrollo
	60	Sin desarrollo	Sin desarrollo

Como se observa en la tabla 20, en rojo se destacan los tiempos a los cuales hubo crecimiento microbiológico (Figura 32) por lo que se puede establecer que a tiempos superiores a 20 min de radiación UV se inhibe el crecimiento de microorganismos.



*Figura 32 Pruebas de esterilidad. A) CT al inicio de la prueba. B) Las películas fueron raspadas con un hisopo para ser sembradas en AST C) Observación de CT después de 14 días de incubación a temperatura 30-35°C D) Fotografía en donde se observa el desarrollo de microorganismos en tiempos menores a los 20 min de radiación UV.*

### **7.7 Pruebas *in vivo***

La evaluación de la efectividad de la forma farmacéutica en un modelo animal (conejos albinos Nueva Zelanda) se realizó utilizando 20 sujetos. Se determinó que durante todas las

pruebas el ojo izquierdo sería utilizado como control y el derecho para los distintos tratamientos.

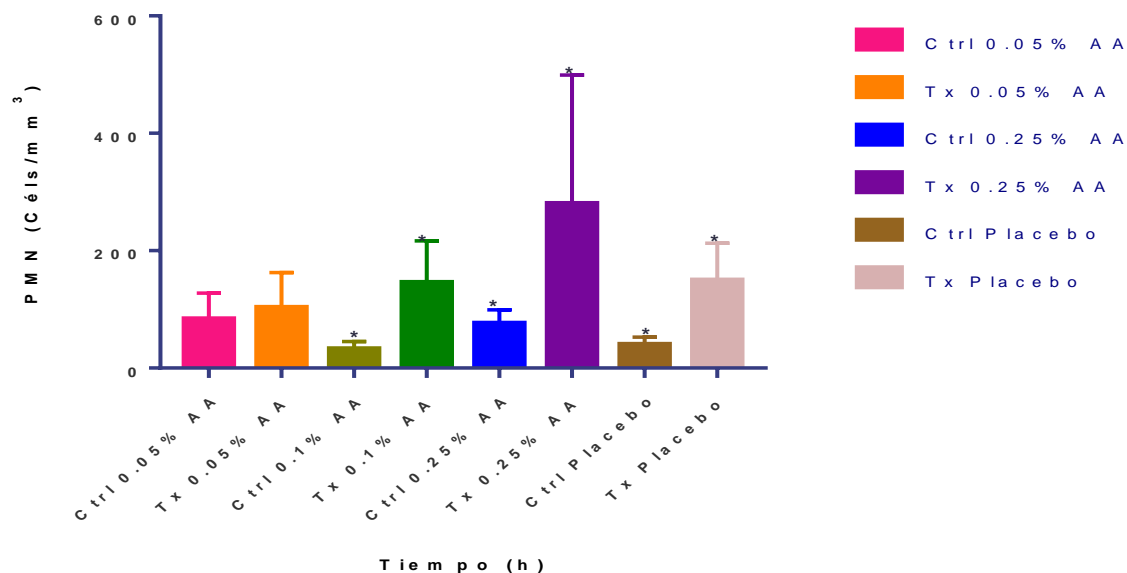
### 7.7.1 Determinación de la concentración de AA, duración del modelo inflamatorio e inflamación provocada por el IO

La primera parte del experimento consistió en la selección de 4 animales para la determinación de duración del modelo inflamatorio y la medición del grado de inflamación producida por el IO a partir del conteo de PMN. Los resultados promedio se encuentran en la Tabla 21 y en la Figura 33A donde se observa el número de PMN (cél/mm<sup>3</sup>) existiendo diferencia estadísticamente significativa entre el AA al 0.25% y el Placebo, por lo que se eligió esta concentración para trabajar el resto del experimento. Los resultados graficados en la Figura 33B se utilizaron para determinar los tiempos de muestreo basados en la duración del modelo inflamatorio pues se observó que a las 6h se cuantificó la mayor cantidad de PMN observando cómo comienza a disminuir el número de estas.

Tabla 21 Medición de la inflamación inducida por AA 0.05%, 0.1%, 0.25% y Placebo IO.

Tiempo (h)	0.05% Ac.Aq.		0.1% AA		0.25% Ac. Aq		Placebo	
	PMN (cél/mm <sup>3</sup> )		PMN (cél/mm <sup>3</sup> )		PMN (cél/mm <sup>3</sup> )		PMN (cél/mm <sup>3</sup> )	
	Ctrl	Tx	Ctrl	Tx	Ctrl	Tx	Ctrl	Tx
<b>0</b>	21.25	12.5	18.5	22.1	25	43.75	30	40
<b>0.16</b>	155	142.5	20.3	154.3	58.75	133.75	26.25	252.5
<b>1</b>	107.5	158.75	19.7	160.89	96.25	213.75	30	198.75
<b>2</b>	76.25	155	26.4	180.16	80	267.5	27.5	160
<b>4</b>	103.75	100	34.63	212.2	105	441.25	52.5	162.5
<b>6</b>	121.25	165	45.17	256	98.75	711.25	45	180
<b>10</b>	108.75	143.75	53.2	189.4	72.5	555	57.5	81.25
<b>12</b>	77.5	88.75	48.5	132.56	86.25	203.25	55	195
<b>15</b>	45.83	56.93	32.7	80.23	67.4	150.65	48.6	120.3
<b>17</b>	20.23	11.4	28.73	67.9	70.32	80.54	32.4	108.3

A)



B)

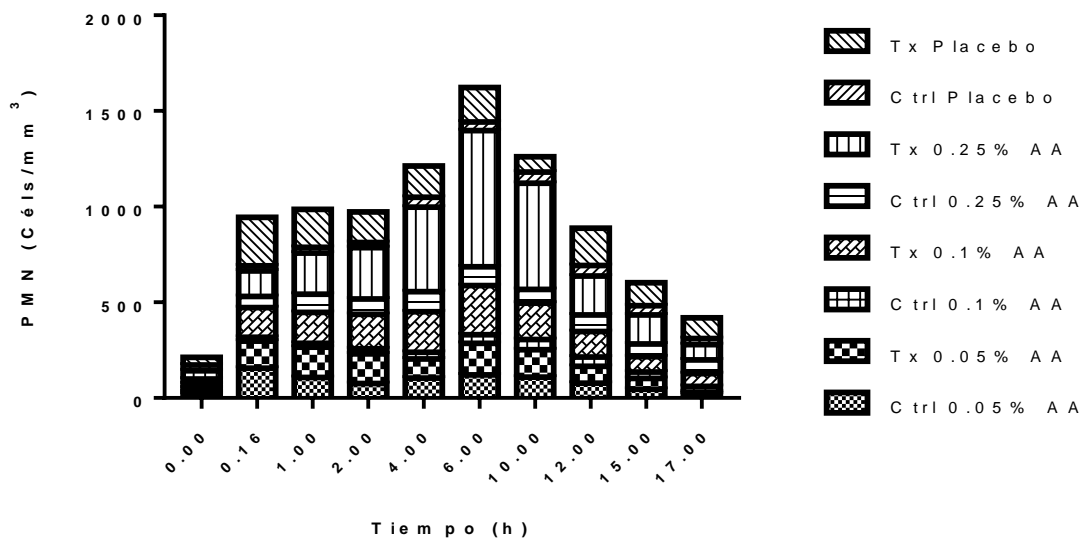
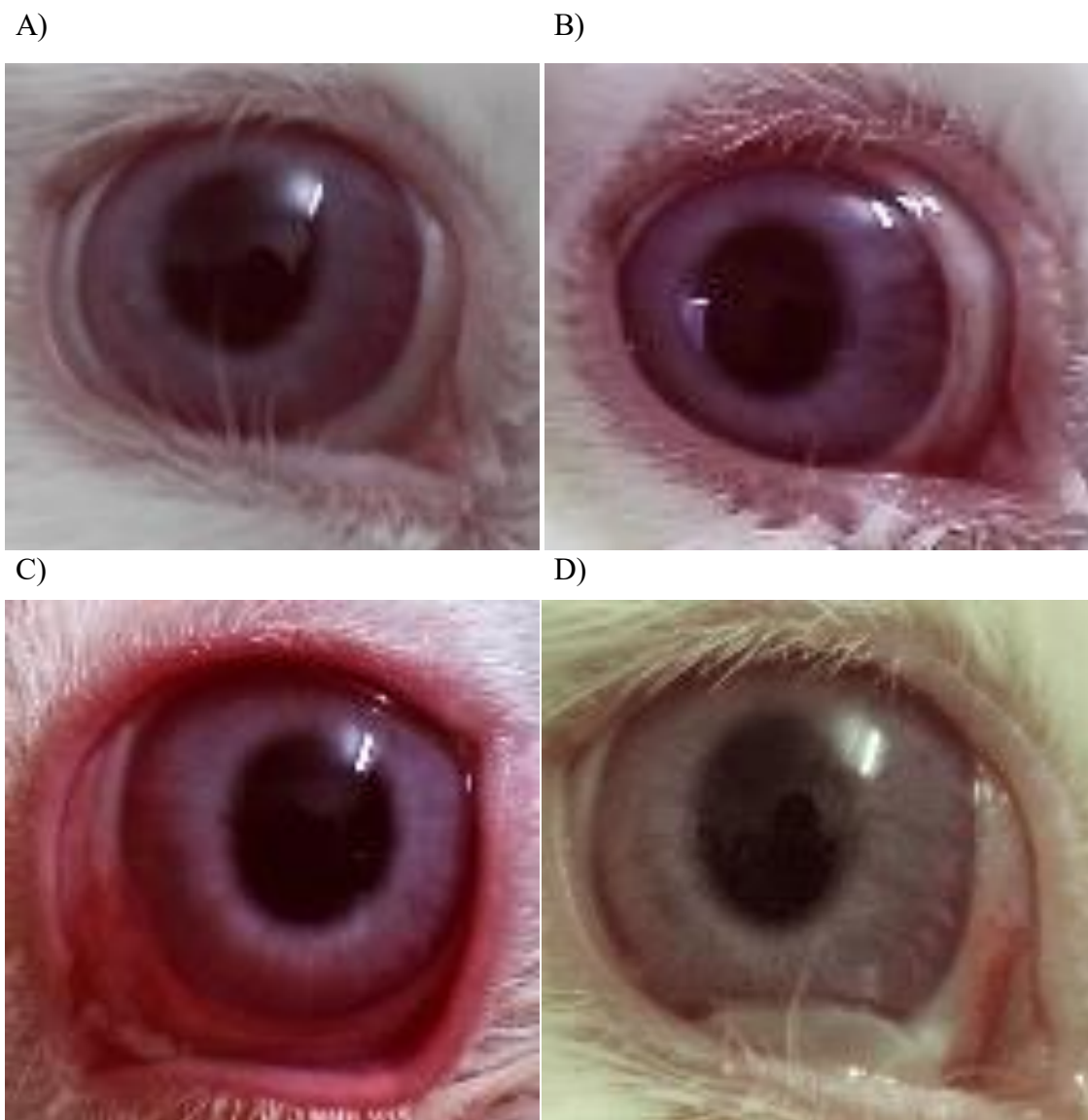


Figura 33 A) Las columnas representan los distintos controles con su tratamiento. Los \* indican aquellos grupos en los que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). B) Las columnas indican el conteo de PMN para cada control y tratamiento, observando que se cuantifica un mayor número de células a las 6h. Ctrl: Control; Tx: Tratamiento; AA: Ácido Araquidónico;  $n=4$



*Figura 34 Determinación del modelo inflamatorio. A) Administración de AA al 0.05%. B) AA 0.1% C) AA 0.25% D) Placebo del IO. AA: Ácido Araquidónico; IO: Inserto Ocular; n=4.*

En la figura 34 se observa la irritación causada por distintas concentraciones de AA, siendo la dosis más alta (Figura 34C) en la que se observa mayor cantidad de cambios visibles en el ojo de los conejos, pues se observa que se encuentra en mayor grado de enrojecimiento comparado con el resto de las fotografías. En la figura 34D se observó el

placebo 24 horas después de ser colocado, los animales no estuvieron en contención durante las pruebas (Anexo 4).

### 7.7.2 7.8.2. Comparación de Gotas Oftálmicas (GO) e Insertos Oftálmicos (IO) en el modelo de inflamación

Posterior al establecimiento de la concentración de AA a utilizar (0.25%) y la inflamación causada por colocar el inserto, además de determinar los tiempos de muestreo, se ejecutó el resto del experimento dividiendo el resto de los animales fueron aleatorizados en 2 grupos (8 por cada grupo): en un grupo se instilaron gotas de DXM (GO) y en el otro se administró el inserto oftálmico (IO). Los resultados de la Tabla 22 son el promedio de las PMN que se contaron en las distintas muestras obtenidas.

Tabla 22 Resultados comparativos de ambas formas farmacéuticas (GO, IO) con su respectivo control.

Tiempo (h)	Gotas Oftálmicas		Insertos Oftálmicos	
	PMN (cél/mm <sup>3</sup> )		PMN (cél/mm <sup>3</sup> )	
	Ctrl	Tx	Ctrl	Tx
<b>0</b>	13.75	5.625	6.25	7.5
<b>0.16</b>	376.23	280	385	209.375
<b>3</b>	530	490.125	556.875	539.375
<b>6</b>	895.625	757.5	874.375	326.875
<b>10</b>	719.375	695.625	593.75	159.375
<b>12</b>	351.875	424.375	288.125	41.875
<b>15</b>	180	282.5	205.625	6.25
<b>24</b>	34.375	11.125	21.25	3.75

Después de realizar el conteo de PMN en la cámara de Neubauer se realizó en análisis estadístico de los datos para determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre las distintas formas farmacéuticas. Los resultados fueron analizados con una prueba de *t* pareada ( $p < 0.05$ ), en la Figura 35 se señalan con \* los resultados que tienen diferencia estadísticamente significativa, es decir, existe diferencia al comparar Ctrl IO vs Tx IO y TxGO y TxIO, es decir, entre los grupos controles no existe diferencia ni entre el Ctrl y Tx con GO. En la Figura 36 se observa la inflamación causada por el AA y el efecto de ambas formas farmacéuticas.

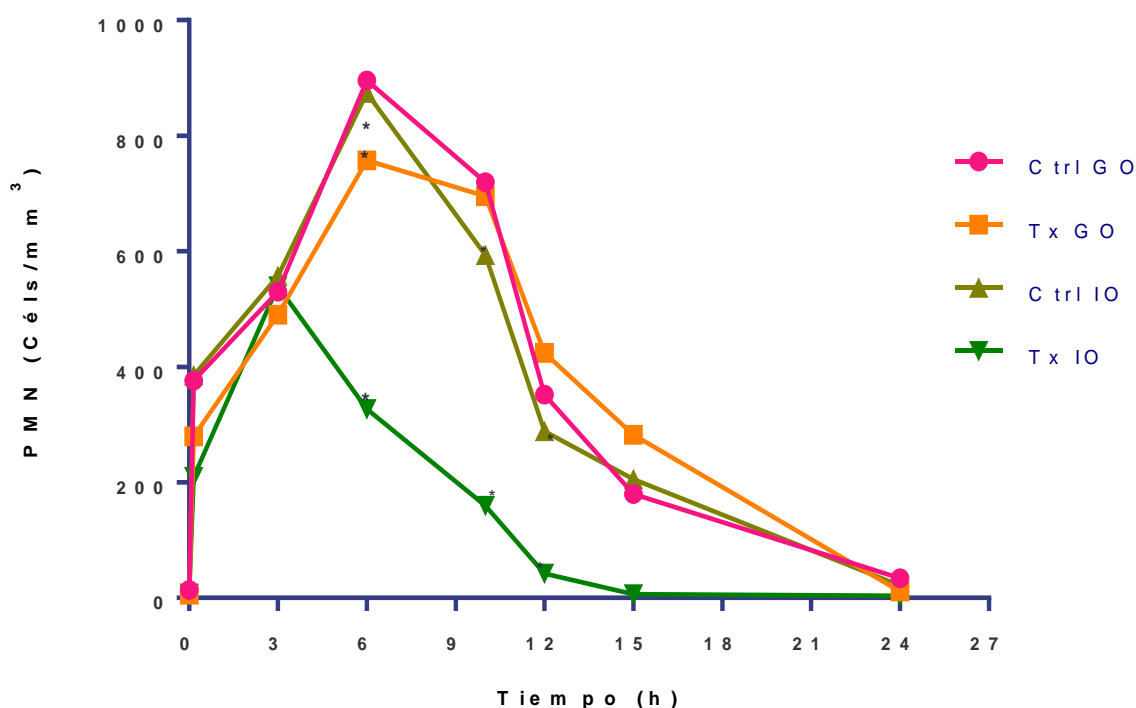
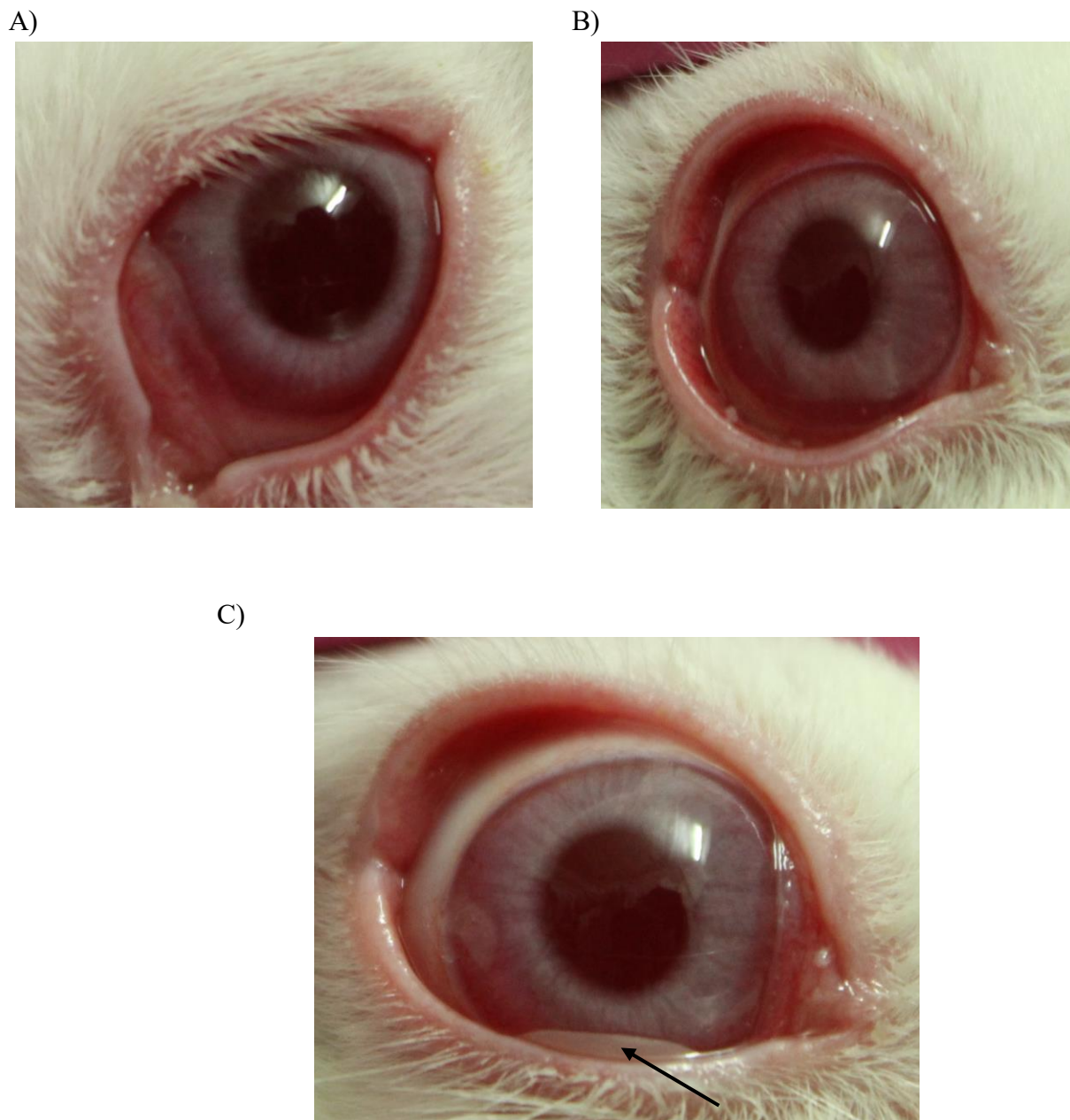


Figura 35 Resultados comparativos entre ambas formas farmacéuticas (GO-IO). Se observa que tanto las GO como los IO disminuyen la inflamación, sin embargo, al realizar la prueba de *t* pareada ( $p < 0.05$ ) existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que tienen \*;  $n = 16$





*Figura 36 Fotografías comparativas de la inflamación a las 6 h de muestreo. A) Control (sln AA 0.25%), B) Tratamiento con GO, C) Tratamiento con IO, la flecha señala el IO colocado en el saco conjuntival del conejo; n=16*

## 8 DISCUSIÓN

La administración tradicional por vía oftálmica en gotas acuosas es caracterizada por su baja biodisponibilidad además de la rápida eliminación precorneal. Para obtener concentraciones terapéuticas se requiere de la instilación frecuente del fármaco, lo que conduce al bajo cumplimiento de la terapia por vía oftálmica (Hornof et al., 2003) y esto es motivo recurrente de los magros resultados terapéuticos en las patologías oculares (Slatter, 2004). Como consecuencia, la innovación en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos por vía oftálmica se ha llevado a cabo con la finalidad de incrementar la biodisponibilidad de los principios activos, lo cual se refleja en la mejoría de los pacientes.

Para el desarrollo del inserto oftálmico cargado con Fosfato Sódico de Dexametasona, se realizaron distintas mezclas de polímeros (Tabla 9) con la finalidad de determinar si las anteriores formaban una película en condiciones de presión y temperatura ambiental, lo anterior con el propósito de establecer si existía la necesidad del uso de un agente catalizador (radiación UV, secado en frío, aumento de temperatura, etc). De acuerdo a los resultados de la Tabla 10, se puede establecer que las películas se formaron a condiciones de temperatura controlada  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , pues dicha temperatura fue suficiente para evaporar el solvente en 48 h aproximadamente (De Souza et al., 2016; Shivakumar et al., 2007). Con base en las características organolépticas se eligió la mezcla 7, pues presentó propiedades táctiles y visuales adecuadas para su manipulación durante la realización de las pruebas mecánicas. Las formulaciones fueron vertidas en distintas superficies de moldeo con la finalidad de determinar en cuál de ellas se podían despegar de manera fácil para su posterior manipulación y caracterización. Las superficies evaluadas fueron: moldes de acetato, cajas Petri de vidrio y moldes de politetrafluoroetileno (PTFE). Una vez que las formulaciones secaron, se

procedió a retirarlas del molde, sin embargo, en los primeros dos moldes la formulación se despegaba con dificultad, provocando que se elongara o rompiera, por lo que se eligieron los moldes de PTFE pues en ellos la formulación era muy fácil de despegar sin modificar ninguna de sus propiedades mecánicas; con la finalidad de estandarizar la metodología se realizó una cinética de mezclado para conocer la velocidad de agitación de 1500 rpm por 10 min, ya que a una velocidad mayor se incorpora una gran cantidad de aire a la formulación lo cual no es recomendable pues son difíciles de eliminar. Por otra parte, el tiempo necesario para la evaporación del solvente del inserto fue de 48 h a una temperatura de 26°C (Diagrama 4).

Una vez que se estandarizó el proceso de fabricación de los insertos oftálmicos (IO), se llevó a cabo el diseño experimental; los diseños experimentales y la optimización son herramientas que se utilizan para examinar de manera sistemática los diferentes tipos de problemas que surgen dentro de, por ejemplo, la investigación, el desarrollo y la producción de medicamentos. Un diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta. La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta. Dentro de los diseños de superficie respuesta, se eligió el Diseño Central Compuesto (DCC) con los atributos de la tabla 12, pues son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Se evaluaron los efectos de las variables independientes o de estudio ( $X_i$ ), sobre las variables dependientes o de

respuesta ( $Y_i$ ) mediante el uso del programa estadístico Statgraphics Centurion XV.II (Tabla 13).

Las 11 formulaciones (F1-F11) arrojadas por el DCC fueron evaluadas de acuerdo a la metodología descrita en la sección 6, obteniendo como resultados promedio los resumidos en la tabla 14 y 15, además de las gráficas 3D de superficie respuesta de la figura 29.

Al analizar los diagramas de Pareto de cada una de las formulaciones, se observa que las variables de respuesta sobre las cuales existe una diferencia estadísticamente significativa son masa (VM) (Figura 20) y pH (Figura 21); en la variación de masa (VM) los factores que influyen son los polímeros PVP K30 y ERS100, siendo el de mayor impacto el PVPK30, en ambos casos al aumentar la concentración de los polímeros la VM incrementa. La razón probable es que el PVP es el excipiente mayoritario en la formulación seguido del ERS100 (Tabla 11), por lo que se espera que al existir un aumento de ambos se incremente la masa. El modelo puede explicar la variabilidad de la respuesta en el 97.39% de los casos por lo que es adecuado para realizar predicciones de esta, lo que quiere decir que existe una relación entre el incremento en los excipientes y la VM.

Respecto al pH, el valor de las lágrimas en condiciones normales oscila en un rango entre 6.8- 8 en perros (Baeyens et al., 2000) en las formulaciones F1-F11 se obtuvieron valores de  $6.96-7.11 \pm 0.04$ , los cuales son valores que se encuentran dentro del rango establecido sin embargo, el factor que tiene un efecto significativo y antagónico es la influencia del ERS100 (Figura 21) lo que quiere decir que un incremento en la cantidad del polímero indica una disminución en el valor del pH, esto es debido a la naturaleza del ERS100 que es un copolímero de etil-acrilato, metil-metacrilato y un bajo contenido de ácido metacrílico con

grupos amonio (Ghose et al., 2017), dichos componentes al ser de naturaleza ácida explican que al incrementar la concentración de ERS100 el pH disminuya, sin embargo la tolerabilidad ocular a Eudragit RS100 y RL100 ha sido probada en estudios *in vitro* e *in vivo* determinando que su uso es seguro y puede ser utilizado como excipiente en sistemas de liberación controlada de fármacos al no mostrar signos de irritabilidad al utilizar el test de Draize y realizando evaluaciones con la lámpara de hendidura, evaluando el grado de congestión, hinchazón y las secreciones conjuntivales (Pignatello et al., 2002; Zhu, Cheng, Huo, & Mao, 2018).

Al evaluar las propiedades de tensión (TR) de las formulaciones (F1-F11) (Figura 22) se obtuvieron los valores entre  $7.5-71.16 \pm 17.9$  gF, estos valores indican que los IO no son ni demasiado quebradizos ni demasiado pegajosos, lo que es importante para evitar que se rompan o que se dificulte su manipulación para su administración (Boateng & Popescu, 2016). Al analizar el diagrama de Pareto se determinó que el PVP K30 es el polímero que tiene mayor impacto en esta propiedad mecánica, pues tiene un efecto antagónico lo que quiere decir que al disminuir su concentración la TR es menor haciendo que los IO sean menos flexibles y con menor capacidad de elongación, sin embargo, al incrementar la concentración de ERS100 se tiene un efecto positivo lo cual es debido al Trietilcitrato (TET), el cual es con frecuencia elegido para su uso con polímeros acrílicos pues confiere propiedades de flexibilidad a las películas (Gruetzmann & Wagner, 2005; Wypych, 2013), lo que dio como resultado una buena elasticidad que se refleja en una menor rigidez y fragilidad lo que lo hace adecuado para la administración ocular, pues al ser flexible permite que exista una menor probabilidad de irritación por contacto (Boateng & Popescu, 2016) pues el inserto se podrá ajustar a la curvatura anatómica natural del ojo. Derivado de lo

anterior, radica la importancia de la evaluación de la FM y TM *ex vivo* durante el desarrollo de nuevos sistemas mucoadhesivos para la liberación de fármacos, en la actualidad existen diversos métodos para determinar las propiedades de mucoadhesión (Mansuri, Kesharwani, Jain, Tekade, & Jain, 2016), sin embargo, la mayoría de los métodos utilizados son para la caracterización de sistemas adhesivos con la finalidad de ser aplicados en humanos utilizando mucosas bovinas o porcinas, por lo cual para la caracterización del IO para uso veterinario, las técnicas fueron modificados para obtener resultados más cercanos a la realidad utilizando ojos de perro (6.4.4). Respecto al TM, la prueba se realizó durante 5 días sin observar el desprendimiento del IO, por lo que los resultados confirman que no se moverá del sitio de aplicación, sin embargo, esto debió comprobarse en las pruebas *in vivo*. La evaluación de la FM *ex vivo* se llevó a cabo en el saco conjuntival y el globo ocular obteniendo los valores de la tabla 16, los cuales indicaron que la mayor fuerza de mucoadhesión se da entre el IO y el Saco conjuntival con un promedio de 10.5 gF lo que indica buenas propiedades de resistencia. Estos valores mecánicos son importantes debido a que la forma farmacéutica debe resistir el proceso de transporte, almacenamiento y administración al paciente (Patil, Bade, & Tagalpallewar, 2018). Una buena FM implica que las películas formuladas no se desplazarán fácilmente al parpadear tomando en cuenta que el perro parpadea en promedio 14 veces/min (Baeyens et al., 2000), además debido a la naturaleza delgada del IO y su capacidad de hinchamiento (HI) promedio de 0.07 g (Figura 27) como capacidad de incorporar moléculas del medio circundante (FLS) se esperaba que, de acuerdo a la “Teoría de Humectación” (Mansuri et al., 2016) se produzca un contacto íntimo entre el sistema mucoadhesivo y la membrana mucosal, seguido de la penetración del fármaco; sin embargo, esto tuvo que comprobarse en las pruebas *in vivo*, pues la mucoadhesión proporciona grandes oportunidades para la entrega de una gran cantidad de fármacos por distintas vías de

administración como la ocular, vaginal y bucal. Además, la mucoadhesión permite obtener un efecto farmacológico prolongado local o sistémico (Mansuri et al., 2016).

Cuando los IO se sumergen en un medio acuoso y se da el hinchamiento, esto causa la “relajación” de las cadenas de polímero con una expansión de volumen. La liberación del fármaco de los sistemas hinchables es compleja, y generalmente depende de uno o más de los siguientes procesos: entrada del medio acuoso (FLS) en la matriz del polímero, disolución del medicamento en el medio, difusión del fármaco a través de la red polimérica y la erosión de la matriz (Hermans et al., 2014); la cantidad liberada del IO de DXM en FLS se observa en la figura 26A, el porcentaje liberado va del 9.8-14.5% respecto a la cantidad con que fue cargado el IO equivale a 0.73-1.08 mg, dichos valores pueden ser establecidos a partir de la prueba de CQ (Figura 26), en la cual el porcentaje de fármaco cuantificado de los insertos fue del 97.5% lo cual entra dentro de las especificaciones farmacopéicas (90-110%) (FEUM, 2008), esta prueba (CQ) permite asegurar que la forma farmacéutica contiene la cantidad de fármaco reportada, lo que se refleja en una correcta dosificación.

Con los resultados obtenidos durante la caracterización fisicoquímica, se realizó la optimización de la formulación (Tabla 17) la cual fue preparada y caracterizada obteniendo los resultados de la Tabla 18. A partir de este momento, el resto de las pruebas se realizaron a la formulación óptima, comenzando con la determinación de la capacidad del fármaco de atravesar las membranas biológicas permitiendo conocer la cinética de liberación tanto para la captación de fármaco y su difusión por la membrana utilizada: saco conjuntival y globo ocular (Permeaciones *ex vivo*, sección 7.6). Las celdas tipo Franz son utilizadas en la investigación de la permeación de la formulación, además que una buena correlación entre la liberación de fármaco *in vitro* y las permeaciones *ex vivo* pueden ser indicativo de una

buena correlación *ex vivo* e *in vivo* (Bao, Newman, Wang, Choi, & Burgess, 2018). Los resultados de la tabla 19 muestran las cantidades y porcentajes acumulados de DXM en cada estructura anatómica (Figura 31A) sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) por lo cual se establece que el fármaco no está atravesando la membrana biológica limitando el efecto al sitio de acción deseado minimizando así los efectos sistémicos. Así mismo, la cantidad liberada por la formulación óptima (13.5% = 1.007 mg DXM) es suficiente para alcanzar la dosis terapéutica para tener un efecto antiinflamatorio (Figura 27C). Para confirmar los resultados que se obtuvieron durante las pruebas *in vitro-ex vivo* se realizaron los estudios *in vivo* con la finalidad de establecer la correlación entre estas pruebas de caracterización con un modelo animal.

Dentro de las características más importantes en el desarrollo de una forma farmacéutica para uso oftálmico destaca el garantizar la esterilidad, para lograrlo existen distintas técnicas de esterilización de polímeros para uso médico y hospitalario ya que son ampliamente utilizados en distintos dispositivos, sin embargo la elección del método de esterilización es importante pues los polímeros pueden ser sensibles a diversas técnicas, siendo el efecto de la esterilización un factor clave en el desarrollo del producto (Rogers, 2012; Tipnis & Burgess, 2018). Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se eligió como método de esterilización el uso de radiación UV pues se ha comprobado que esta técnica no modifica de manera significativa las propiedades de los productos una vez que ya han polimerizado (Kitazaki, Tanaka, & Hayashi, 2014; La Mantia et al., 2017; Munker et al., 2018). En la tabla 20, se observa que al realizar la evaluación del crecimiento microbiano en ambos medios de cultivo AST y CT, en el primero en el tiempo 0 y 10 min de radiación ya existe desarrollo de microorganismos (Figura 32C y D) sin embargo en AST no, lo que puede ser debido a que



en este medio se realizó un sembrado por hisopo. Las observaciones se realizaron durante 14 días mostrando que a partir de los 20 min de tiempo de radiación UV ya no se observa presencia de crecimiento microbiano, por lo que este tiempo fue elegido para esterilizar los IO.

Como última etapa de la estrategia experimental se realizaron las pruebas *in vivo* utilizando 20 animales (conejos albinos nueva Zelanda) con un peso promedio de entre 1.5-2 kg (Ver sección 6.9). El modelo inflamatorio causado por ácido araquidónico (AA) fue modificado incrementando la concentración reportada (0.05%) (Butrus et al., 1987; Katara & Majumdar, 2013) al 0.25% ya que es en la cual se encuentran diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) como se observa en la figura 33A, además fue importante determinar si el IO por sí solo (placebo) producía inflamación (Figura 34) y se determinó que sí existe diferencia entre el control y el placebo, sin embargo a pesar de desarrollarse el proceso de inflamación aguda los conejos no mostraron molestia durante el tiempo que tuvieron el placebo, pues los animales no se tuvieron en contención (cepo). Igualmente se estableció la duración de la inflamación estableciendo que el tiempo en el que existía una mayor migración de células PMN era a las 6 h (Figura 33B) por lo que se pudieron establecer los tiempos de muestreo: 0, 10 min, 3,6,10,12,15 y 24 h. Posteriormente, se realizó el estudio comparativo entre ambas formas farmacéuticas GO e IO, obteniendo los resultados promedio que se encuentran en la tabla 22; al realizar el tratamiento estadístico de los mismos (prueba de  $t$   $p < 0.05$ ) se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento IO, la cual no existe entre el control y el tratamiento de las gotas, lo anterior se debe al corto tiempo de residencia de las GO por lo cual su instilación se recomienda cada 2h, igualmente en la figura 35 se observa cómo el efecto antiinflamatorio de las gotas sucede a los pocos

minutos de su instilación sin permitir que la cantidad de PMN alcance los valores del grupo control, sin embargo una vez que la gota es eliminada el efecto antiinflamatorio ya no es notorio pues ya no existe diferencia entre el control y el tratamiento con GO. Los resultados obtenidos demuestran que al comenzar la liberación de DXM y alcanzar las concentraciones terapéuticas la inflamación provocada por el IO también es disminuida, estos resultados demuestran que el mayor reto dentro de la terapia ocular consiste en el mantenimiento de concentraciones terapéuticas en el sitio diana tomando en consideración las restricciones anatómicas y fisiológicas de dicha estructura anatómica como el lagrimeo, el drenaje nasolagrimal, la baja absorción en la conjuntiva y la poca permeabilidad corneal, especialmente de los fármacos solubles en agua, los cuales permiten que únicamente una fracción de la dosis administrada (menor al 1%) sea absorbida en el ojo. El requerir una frecuente administración de las formas farmacéuticas convencionales implica tener como resultado concentraciones de fármaco muy elevadas lo que tiene como consecuencia efectos oculares severos además de la posibilidad del efecto sistémico (Shivakumar et al., 2007).

El conteo de PMN tiene como fundamento que los glucocorticoides son hormonas esteroideas que tienen un efecto inmunológico y función metabólica en el cuerpo al unirse al receptor de glucocorticoides (GR) su efecto principal está relacionado con la restricción de la respuesta inflamatoria que es debida a su actividad inmunosupresora (Urbańska et al., 2014), por lo tanto, una disminución en el número de células PMN es el reflejo de que el fármaco está teniendo acción sobre el sitio diana, debido a que la inhibición de la entrada de los neutrófilos al foco inflamatorio se debe a que la DXM bloquea la expresión de las moléculas de adhesión celular que permiten la fijación de los leucocitos al endotelio inflamado, además de reducir el recuento de eosinófilos y mastocitos (Flórez, 2008).

## 9 CONCLUSIONES

En el presente estudio se comparó el efecto antiinflamatorio de insertos oculares de DXM como nueva forma farmacéutica de uso veterinario respecto a la terapia convencional en gotas existente en el mercado. Para ello se realizaron pruebas mecánicas, fisicoquímicas y estudios *in vitro* y *ex vivo*, lo que permitió establecer que las concentraciones e interacciones de los polímeros utilizados PVPK30 y ERS100 tienen impacto sobre las propiedades, principalmente en la variación de masa, el pH, la tensión a la ruptura y la fuerza de mucoadhesión *ex vivo*. Las pruebas de liberación concluyen que la cantidad de fármaco liberada (1.007 mg DXM) es la necesaria para alcanzar dosis terapéutica durante 5 días con la administración del IO, además los estudios de permeación *ex vivo* indican que al administrar el IO se obtuvo un efecto local al no existir evidencia de que se atravesó la estructura biológica colocada en las celdas tipo Franz. La técnica de esterilización utilizada para los IO fue la radiación UV por 20 min. Por lo anterior, la realización de estudios *in vitro* y *ex vivo* dan la pauta para la realización de estudios *in vivo*, los cuales fueron de gran importancia en el proyecto, pues es necesario comprobar, correlacionar y complementar las pruebas de caracterización con el uso de modelos animales pues la variabilidad biológica juega un papel importante dentro de la investigación. Al ser administrado el IO en los conejos, se obtuvieron mejores resultados que con la instilación de gotas como terapia convencional, debido a que el tiempo de residencia de las gotas es mucho menor respecto al inserto ocular lo que se demuestra en el conteo de PMN.

El presente estudio confirma el uso potencial de sistemas poliméricos utilizando PVPK30 y ERS100 como nueva estrategia de liberación controlada de fármacos por vía oftálmica para

uso veterinario, al lograr controlar y prolongar la liberación de DXM en el sitio afectado disminuyendo los efectos sistémicos del fármaco.

## 10 PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

-Realizar estudios de farmacocinética *in vivo* que permitan determinar el tiempo de residencia del fármaco en cada una de las estructuras anatómicas del ojo, pues las permeaciones indican que el fármaco no es capaz de atravesar el globo ocular, sin embargo, esto no quiere decir que no se encuentre en alguna estructura interna.

-Administrar el inserto oftálmico a perros que cursen con cuadro de inflamación aguda.

## 11 REFERENCIAS

Aroch, I., Holmberg, B. J., Sutton, G. A., & Wilcock, B. P. (2008). *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* (4th ed.). Missouri: Elsevier Inc.

Baeyens, V., Felt, O., Gurny, R., Behar-Cohen, F. F., Percicot, C., & Régnier, A. (2000). Design and development of controlled release veterinary drug delivery systems to the eye. In *Controlled Release Veterinary Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1016/b978-044482992-4/50024-1>

Bao, Q., Newman, B., Wang, Y., Choi, S., & Burgess, D. J. (2018). In vitro and ex vivo correlation of drug release from ophthalmic ointments. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.003>

Bartlett, J. D. (1984). Clinical administration of ocular drugs. In J. S. D. Bratlett J.D. (Ed.), *Clinical Ocular Pharmacology* (pp. 365–418).

- Boateng, J. S., & Popescu, A. M. (2016). Composite bi-layered erodible films for potential ocular drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 353–361. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.014>
- Botana López, L. M., Landoni, M. F., & Martín-Jimenez, T. (2002). *Farmacología Veterinaria*. Madrid, España: McGraw-Hill/Interamericana.
- Butrus, S. I., Smith, L. M., Corey, E. J., Kliman, G. H., Abelson, M. B., & Larson, D. L. (1987). Topical Arachidonic Acid: A Model for Screening Anti-Inflammatory Agents. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 3(1), 63–75. <https://doi.org/10.1089/jop.1987.3.63>
- Castelli, F., Messina, C., Sarpietro, M. G., Pignatello, R., & Puglisi, G. (2003). Eudragit as controlled release system for anti-inflammatory drugs a comparison between DSC and dialysis experiments. *Thermochimica Acta*, 400(1–2), 227–234. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00496-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00496-3)
- Ceulemans, J., & Ludwig, A. (2002). Optimisation of carbomer viscous eye drops: An in vitro experimental design approach using rheological techniques. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00036-X)
- De Souza, J. F., Maia, K. N., De Oliveira Patrício, P. S., Fernandes-Cunha, G. M., Da Silva, M. G., De Matos Jensen, C. E., & Da Silva, G. R. (2016). Ocular inserts based on chitosan and brimonidine tartrate: Development, characterization and biocompatibility. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, 21–30.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.01.008>

Escalona-Rayo, C. F. (2017). *Formulación y optimización de un parche bucal mucoadhesivo para la entrega unidireccional de tartrato de metoprolol: Una alternativa a la vía oral en el tratamiento de la hipertensión arterial*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Flórez, J. (2008). *Farmacología Humana* (5th ed.). Barcelona: Elsevier Masson SAS.

Gelatt, K. (2007). *Veterinary Ophthalmology*. Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.

Gelatt, K. N., Gilger, B. C., & Kern, T. J. (2013). *Veterinary Ophthalmology*. (K. N. Gelatt, Ed.) (5th ed.). Oxford, UK: Wiley-Blackwell A John Wiley & Sons, Inc., Publication.

Ghose, D., Patra, C. N., Swain, S., Panigrahi, K. C., Priya, R., & Kumar Jena, G. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.02.001>

Giuliano, E., & Moore, C. P. (2007). Diseases and Surgery of the Lacrimal Secretory System. In K. Gelatt (Ed.), *Veterinary Ophthalmology* (pp. 633–661). Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.

Grahn, B. H., Peiffer, R. L., Cullen, C. L., & Haines, D. M. (2006). Classification of feline intraocular neoplasms based on morphology, histochemical staining, and immunohistochemical labeling. *Veterinary Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2006.00479.x>

- Gruetzmann, R., & Wagner, K. G. (2005). Quantification of the leaching of triethyl citrate/polysorbate 80 mixtures from Eudragit® RS films by differential scanning calorimetry. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(1), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.11.004>
- Gupta, H., & Aqil, M. (2012). Contact lenses in ocular therapeutics. *Drug Discovery Today*, 17(9–10), 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.01.014>
- Hermans, K., Plas, D. Van Den, Kerimova, S., Carleer, R., Adriaensens, P., Weyenberg, W., & Ludwig, A. (2014). Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1–2), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.017>
- Herring, I. P. (2007). Clinical Pharmacology and Therapeutics. In Gelatt, K. (Ed.), *Veterinary Ophthalmology* (pp. 332–347). Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.
- Hornof, M., Weyenberg, W., Ludwig, A., & Bernkop-Schnürch, A. (2003). Mucoadhesive ocular insert based on thiolated poly(acrylic acid): Development and in vivo evaluation in humans. *Journal of Controlled Release*, 89(3), 419–428. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00135-4)
- Jain, D., Carvalho, E., & Banerjee, R. (2010). Biodegradable hybrid polymeric membranes for ocular drug delivery. *Acta Biomaterialia*, 6(4), 1370–1379. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.11.001>
- Kalam, M. A. (2016). Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for topical ocular delivery of dexamethasone. *International Journal of Biological*

*Macromolecules*, 89, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.070>

Katara, R., & Majumdar, D. K. (2013). Eudragit RL 100-based nanoparticulate system of aceclofenac for ocular delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 455–462. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.056>

Kitazaki, S., Tanaka, A., & Hayashi, N. (2014). Sterilization of narrow tube inner surface using discharge plasma, ozone, and UV light irradiation. *Vacuum*, 110, 217–220. <https://doi.org/10.1016/J.VACUUM.2014.06.014>

La Mantia, F. P., Morreale, M., Botta, L., Mistretta, M. C., Ceraulo, M., & Scaffaro, R. (2017). Degradation of polymer blends: A brief review. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.07.011>

Lee, V. H. L., & Robinson, J. R. (2009). Topical Ocular Drug Delivery: Recent Developments and Future Challenges. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1089/jop.1986.2.67>

Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, L., Leza, J., Moro, M., & Portolés, A. (2014). *Velázquez Farmacología básica y clínica. Igarss 2014*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Maggs, D. J., Miller, P. E., & Ofri, R. (2013). *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* (5th ed.). Missouri: Elsevier Inc.

Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R. K., & Jain, N. K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*, 100, 151–172. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011>



- Matsumoto, S., Brassard, J. A., Attar, M., Vangyi, C., Kim, A. S., & Ramos, M. (2012). *Safety Evaluation of Ocular Drugs. A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387815-1.00024-1>
- Münker, T. J. A. G., van de Vijfeijken, S. E. C. M., Mulder, C. S., Vespasiano, V., Becking, A. G., Kleverlaan, C. J., ... Zaat, S. A. J. (2018). Effects of sterilization on the mechanical properties of poly(methyl methacrylate) based personalized medical devices. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 81, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.01.033>
- Nanda, A., Sahoo, R. N., Pramanik, A., Mohapatra, R., Pradhan, S. K., Thirumurugan, A., ... Mallick, S. (2018). Drug-in-mucoadhesive type film for ocular anti-inflammatory potential of amlodipine: Effect of sulphobutyl-ether-beta-cyclodextrin on permeation and molecular docking characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172(September), 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.011>
- O'Sullivan, N. L., Montgomery, P. C., & Sullivan, D. A. (2005). *Ocular mucosal immunity. Mucosal Immunology, Two-Volume Set* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012491543-5/50090-5>
- Patel, M., Patel, M., & Patel, D. (2009). Formulation and evaluation of drug-free ophthalmic films prepared by using various synthetic polymers. *Journal of Young Pharmacists*, 1(2), 116. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.55742>
- Patil, S. S., Bade, A., & Tagalpallewar, A. (2018). Design, optimization and pharmacodynamic comparison of dorzolamide hydrochloride soluble ocular drug insert

- prepared by using 32 factorial design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46(June 2017), 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.010>
- Pignatello, R., Bucolo, C., & Puglisi, G. (2002). Ocular tolerability of Eudragit RS100® and RL100® nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(12), 2636–2641. <https://doi.org/10.1002/jps.10227>
- Regnier, A. (2007). Clinical Pharmacology and Therapeutics. In K. Gelatt (Ed.), *Veterinary Ophthalmology* (pp. 271–331). Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.
- Reichl, S., Borrelli, M., & Geerling, G. (2011). Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*, 32(13), 3375–3386. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.052>
- Rodríguez-Villanueva, J., Rodríguez-Villanueva, L., & Guzmán Navarro, M. (2017). Pharmaceutical technology can turn a traditional drug, dexamethasone into a first-line ocular medicine. A global perspective and future trends. *International Journal of Pharmaceutics*, 516, 342–351.
- Rogers, W. J. (2012). Sterilisation techniques for polymers. In *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices* (pp. 151–211). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857096265.151>
- Rupenthal, I. D., Green, C. R., & Alany, R. G. (2011). Comparison of ion-activated in situ gelling systems for ocular drug delivery. Part 1: Physicochemical characterisation and in vitro release. *International Journal of Pharmaceutics*, 411(1–2), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.042>

- Saettone, M. F., & Salminen, L. (1995). Ocular inserts for topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16(1), 95–106. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00014-X](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00014-X)
- Schoenwald, R. D. (1990). Ocular drug delivery: Pharmacokinetic considerations. *Clinical Pharmacokinetics*, 18, 225–269.
- Shivakumar, H. N., Desai, B. G., Subhash, P. G., Ashok, P., & Hulakoti, B. (2007). Design of ocular inserts of brimonidine tartrate by response surface methodology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17(6), 421–430. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(07\)50083-3](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(07)50083-3)
- Slatter, D. (2004). *Fundamentos de Oftalmología Veterinaria*. Buenos Aires: Intermédica.
- Stades, F. C., & Gelatt, K. N. (2007). Diseases and Surgery of the Canine Eyelid. In K. Gelatt (Ed.), *Veterinary Ophthalmology* (pp. 563–617). Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.
- Tipnis, N. P., & Burgess, D. J. (2018). Sterilization of implantable polymer-based medical devices: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 544(2), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.003>
- Turner, S. (2005). *Veterinary Ophthalmology. A manual for Nurses and Technicians*. Tottenham Court Road: Elsevier Butterworth.
- Turner, S. M. (2005). *Veterinary Ophthalmology*. Philadelphia, USA: Elsevier.
- Turner, S. M. (2010). *Small Animal Ophthalmology*. (F. Nind, Ed.). Saunders, Elsevier.
- Urbańska, J., Karewicz, A., & Nowakowska, M. (2014). Polymeric delivery systems for

dexamethasone. *Life Sciences*, 96(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.12.020>

Vandewalle, J., Luypaert, A., De Bosscher, K., & Libert, C. (2018). Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(1), 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.010>

Velázquez-Tapia, C. A. (2018). *Desarrollo y caracterización de lentillas poliméricas cargadas con dexametasona como alternativa para el tratamiento de procesos inflamatorios oculares*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Wypych, A. (2013). Citrates. *Plasticizers Databook*, 135–175. <https://doi.org/10.1016/B978-1-895198-58-4.50014-6>

Zhu, Q., Cheng, H., Huo, Y., & Mao, S. (2018). Sustained ophthalmic delivery of highly soluble drug using pH-triggered inner layer-embedded contact lens. *International Journal of Pharmaceutics*, 544(1), 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.004>

## 12 ANEXOS

### ANEXO 1

Preparación de FLS (Ceulemans & Ludwig, 2002), se ajusta a pH fisiológico ( $7.4 \pm 0.1$ ) con HCl 0.1 N.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
KCl	1.7983
NaCl	6.3118
NaHCO <sub>3</sub>	2.1842
CaCl <sub>2</sub>	44.4 mg/L
MgCl <sub>2</sub>	47.6 mg/L

## ANEXO 2

Para el estudio se utilizó el método analítico para Fosfato Sódico de Dexametasona desarrollado y validado por Velázquez-Tapia, 2018 utilizando como parámetros y criterios de aceptación los siguientes:

- **Precisión del sistema:** % C.V de la respuesta analítica debe ser  $\leq 1.5\%$ .
- **Linealidad del sistema:** El  $r^2$  de la relación entre la concentración y la respuesta analítica debe ser  $\geq 0.98$  y el IC ( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero.
- **Linealidad del método:** el valor de la  $r^2$  de la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada debe ser  $r^2_{y/x} > 0.98$ , el IC ( $\beta_1$ ) debe incluir la unidad y el %C.V.<sub>y/x</sub> no debe ser mayor al 3%. Según el porcentaje de recobro el IC ( $\mu$ ) debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro debe incluirse en el intervalo de 97-103% con un %CV no mayor de 3%.
- **Exactitud y repetibilidad del método:** El IC( $\mu$ ) debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se debe incluir en el intervalo de 97-103%. El %CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 3%.
- **Precisión del método:** el % CV del contenido químico no debe ser mayor al 3%.

Previo a la selección del método se realizaron barridos espectrofotométricos a los excipientes y al principio activo para asegurar que no existiera ninguna interferencia en la lectura. Las muestras se analizaron por espectrofotometría UV en un equipo UV-Vis (Cary 100 Varian<sup>®</sup>), a una longitud de onda de 243 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm<sup>2</sup>.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>Conclusión</b>
Precisión del sistema	%CV= 0.7224	Cumple
Linealidad del sistema	R <sup>2</sup> =0.9999 IC (β <sub>1</sub> )= 0.0297, 0.0287	Cumple
Exactitud y repetibilidad del método	Promedio= 101.78 %CV= 2.0105 IC (μ)= 99.6322, 103.9278	Cumple
Linealidad del método	Promedio= 99.8679  %CV <sub>Y/X</sub> =1.4943  R <sup>2</sup> <sub>Y/X</sub> =0.99052 IC (β <sub>1</sub> ) = 0.9634, 1.1050  IC (μ)= 98.7208, 101.0151	Cumple
Precisión del método	%CV= 2.5037	Cumple

### **ANEXO 3**

Oficio de aprobación del protocolo de investigación por el CICUAE-FESC.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO  
DE LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN  
CICUAE-FESC  
OFICIO: FESC/CICUAE/11/04/2019

**DR. JOSÉ JUAN ESCOBAR CHÁVEZ**  
**ACADÉMICO DE LA FES-CUAUTITLÁN**  
**P R E S E N T E**

En respuesta a las correcciones solicitadas (según oficio FESC/CICUAE/04/03/2019) por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación CICUAE-FESC a su protocolo de experimentación **“Diseño y caracterización de insertos oftálmicos cargados con dexametasona como nueva forma farmacéutica de uso veterinario para el tratamiento de afecciones inflamatorias en perros”**.

**Clave de registro CICUAE-FESC C 19\_01.**

El comité le notifica:

Las correcciones solicitadas fueron solventadas satisfactoriamente.

Por lo que la resolución del Comité fue **APROBAR** el presente protocolo.

Se le solicita notificar por escrito a este Comité cuando su proyecto experimental con los animales quede concluido.

Sin otro en particular, le envío un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli Estado de México a 3 de abril de 2019.  
VICEPRESIDENTE DEL CICUAE-FESC

  
M. en D. OLAVIA ADAMS VAZQUEZ.



C.c.p. Archivo CICUAE-FESC  
CMM/cmm



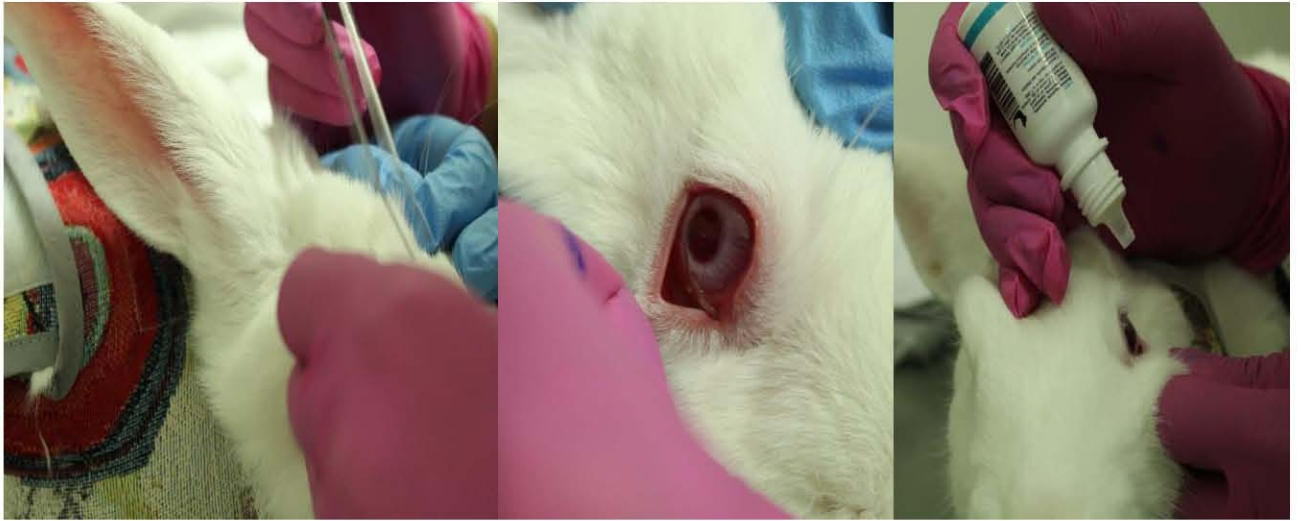
#### ANEXO 4

Fotografías que muestran el estado de contención de los animales durante las pruebas realizadas. Todas las fotografías fueron tomadas con cámara Canon® EOS REBEL T6 con lente EFS 18-55 mm sin flash y no fueron editadas para la publicación de las mismas.

i)



ii)



iii)



- i) Se observa la manera en que los animales fueron contenidos durante su manipulación, no fue necesario el uso de un cepo, por lo que la técnica utilizada implica un menor estrés en el manejo de los animales.
- ii) Colocación del inserto ocular o las gotas de acuerdo al tratamiento asignado. Para la colocación del inserto las pinzas que se utilizaron fueron previamente esterilizadas.
- iii) Los conejos se mantuvieron únicamente contenidos en sus jaulas sin el uso de otro aditamento durante toda la prueba, con la finalidad de no estresarlos y de evaluar si el inserto se salía del ojo o que causara irritación como para que el conejo intentara retirarlo con las patas.