

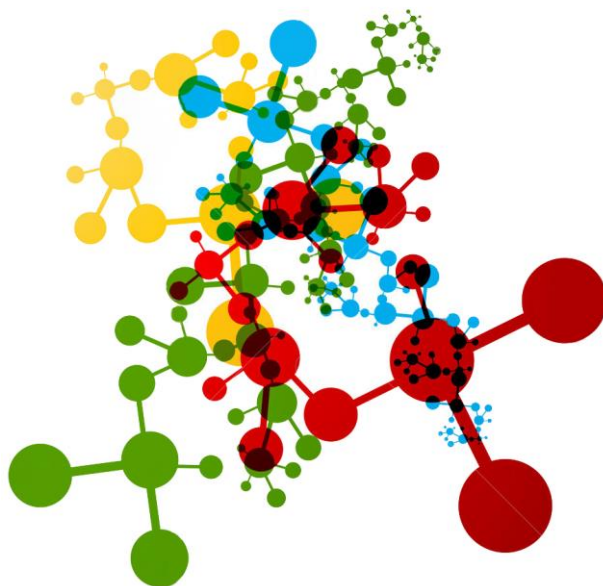
GRADO EN FARMACIA



TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Elaboración de hidrogeles oftálmicos ion sensibles para el
tratamiento de la cistinosis ocular**

**Preparation of ion sensitive ophthalmic hydrogels for the treatment
of ocular cistinosis**



Carla María García Mazás

Julio 2015

Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	4
2.1 Cistinosis	4
Formas clínicas	5
Diagnóstico	7
Tratamiento	9
2.2 Características de la vía ocular	12
2.3 Requerimientos de la vía ocular	14
2.4 Hidrogeles ion sensibles oftálmicos	15
2.5 Ensayos de toxicidad oftálmica	17
3. Objetivo	19
4. Material y método	20
4.1 Elaboración y ensayo de estabilidad del hidrogel sin fármaco.....	20
4.2 Incorporación de la cisteamina en el hidrogel	24
4.3 Estudios de toxicidad	25
Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad celular:	25
Determinación de la capacidad de irritación corneal aguda “The Hen's Egg Test (HET-CAM).....	29
5. Resultados	33
5.1 Elaboración y ensayo de estabilidad del hidrogel sin fármaco.....	33
5.2 Incorporación de la cisteamina en el hidrogel	35
5.3 Estudios de toxicidad	37
Ensayos <i>in vitro</i> de citotoxicidad celular	37
Determinación de la capacidad de irritación corneal aguda “The Hen's Egg Test (HET-CAM).....	39
6. Discusión	42
7. Conclusión	44
8. Bibliografía	46
9. Agradecimientos	50

1. Resumen

La cistinosis ocular es una enfermedad rara, caracterizada por la acumulación de cristales de cistina en el interior de los lisosomas de las células, por un defecto en el transportador de la cistina, conocido como cistinosis. El único tratamiento capaz de detener la progresión de la enfermedad, es la cisteamina. Esta es un aminotiol, que se combina con la cistina y permite su salida de los lisosomas.

En este trabajo se busca tratar los síntomas oculares de la enfermedad, mediante la formulación de un hidrogel ion sensible y demostrar su estabilidad y seguridad. Se ha realizado un estudio de estabilidad del gel en dos condiciones de conservación diferentes: a temperatura ambiente y en nevera (4-8°C). Los parámetros medidos han sido; pH, osmolalidad, transparencia, bioadhesión, esterilidad y ausencia de partículas. También se han realizado dos estudios para valorar la seguridad de la formulación, uno que mide la irritación aguda (HET-CAM) y otro que analiza la citotoxicidad mediante RTCA (real time cell analyzer).

No hubo diferencias significativas en la estabilidad del gel con respecto a la medida inicial, para ninguno de los dos almacenamientos. La cisteamina se mostró citotóxica pero no irritante, mientras que los polímeros que componen el gel, no son irritantes ni citotóxicos.

El uso de un gel hidrogel ion sensible, favorece la permanencia del fármaco en el área precorneal, dando tiempo a que penetre en la córnea y disminuye el número de aplicaciones diarias.

Abstract

Ocular cystinosis is a rare disease characterized by the accumulation of cystine crystals within the lysosomes of cells, by a defect in the transporter of cystine, known as cystinosis. Cysteamine is the only treatment capable of reducing the progression of the disease. It is an aminothioliol, which combined with cystine permits the output of lysosomes.

This paper seeks to treat eye symptoms of the disease through the formulation of an ion-sensitive hydrogel and to demonstrate its stability and security. A stability study with two different storage conditions (room temperature and in a refrigerator 4-8°C) was conducted. The measured parameters have been; pH, osmolality, transparency, bioadhesion, sterility

and absence of particles. Also two studies to assess the safety of the formulation was conducted, one measures acute irritation (HET-CAM) and the other analyzes the cytotoxicity by RTCA (real time cell analyzer).

Significant differences in gel stability were not appreciated with respect to the initial determination, in any storage. Cysteamine has demonstrated cytotoxic but not acute irritation, while polymers of the gel are not cytotoxic neither acute irritatives.

Using an ion sensitive hydrogel gel favors retention of the drug in the precorneal area, increasing time to penetrate the corneal and decreases the number of daily applications.

Palabras clave: Hidrogel oftálmico, Optimización, Seguridad, Cisteamina, Cistinosis.

2. Introducción

2.1 Cistinosis

La cistinosis es una enfermedad metabólica rara, que afecta a 1 de cada 100.000-200.000 niños. Se caracteriza por la acumulación excesiva de cristales de cistina (un dímero de dos cisteínas unidas por sus grupos funcionales tiol) en el interior de los lisosomas de las células.

La cistina actúa como reservorio de cisteína, este aminoácido participa en la síntesis de numerosas moléculas endógenas como el glutatión, la insulina o la inmunoglobulina G. Los residuos de cisteína tienen una función importante en las proteínas porque intervienen en la estabilidad, plegamiento, catálisis enzimática y regulación de la actividad proteica.

La cistina se forma en los lisosomas celulares, después de que las proteasas degraden las proteínas liberando cisteína, que rápidamente forma dímeros.

La acumulación de cistina en los lisosomas, se debe a una disfunción de una proteína transportadora llamada cistinosisina. La cual se expresa de manera importante en: córnea, riñón, páncreas, leucocitos, nódulos linfáticos, tiroides, cerebro, articulaciones y músculos (1,2,3). (Figura 2.1)

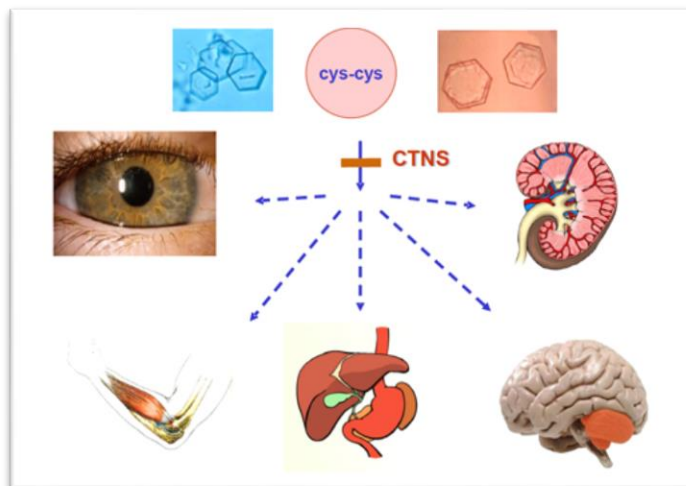


Figura 2.1. Lugares de acumulación de cristales de cistina. (<http://www.guiametabolica.org>)

La cistinosina se encuentra principalmente en los lisosomas y se encarga de transportar la cistina desde su interior hacia el citoplasma de la célula. Está asociada a una ATPasa- H^+ que se encarga de acidificar el interior de los lisosomas. Los errores en la síntesis de esta proteína, conducen a cambios en su estructura que tienen como resultado la no eliminación de la cistina y por tanto que se acumule en su interior (1).

La cistinosina está formada por 367 aminoácidos, agrupados en 7 dominios transmembrana (Figura 2.2). El gen que la codifica se conoce como CTNS, está localizado en la región 17p13 del cromosoma, este gen tiene 23kb de longitud y se transmite de forma autosómica recesiva.

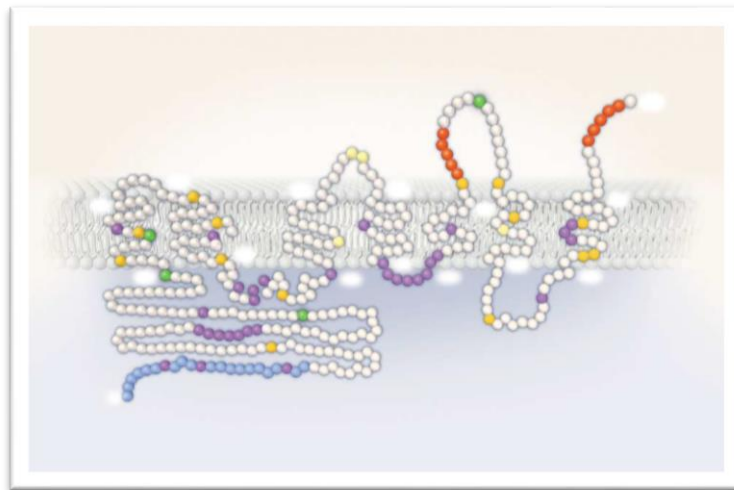


Figura 2.2. Disposición de cistinosina transmembrana (4).

Se han descrito más de 50 mutaciones diferentes del gen CTNS siendo las más comunes las deleciones de tamaño variable, entre 60 y 257 pb, que pueden ser fácilmente detectadas por PCR. (3,4,5).

Formas clínicas

Podemos clasificar la enfermedad en 3 formas clínicas en función de los síntomas y su gravedad:

- Cistinosis infantil: Se caracteriza por grandes deleciones del gen CTNS, mutaciones sin sentido o sin alteración en el marco de lectura. Es la forma de cistinosis más severa, llegando a ser letal si no se trata. Tiene dos manifestaciones clínicas principalmente:

- ✓ Renal: La acumulación de los cristales de cistina en las células tubulares impide su funcionamiento normal, produce poliuria al impedir la reabsorción de agua (se eliminan 2-6 litros de agua al día), iones (sodio, potasio, bicarbonato, fosfato, calcio, magnesio), glucosa y aminoácidos. El síndrome que produce se conoce como Síndrome de Fanconi.

Los principales síntomas son acidosis y retraso en el crecimiento por falta de fósforo y calcio (6).

El diagnóstico precoz de esta forma clínica es crucial, pues un tratamiento adecuado, puede reducir notablemente el curso de la enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos se necesita un trasplante renal, porque el daño producido es irreversible (Figura 2.3) (1,4).

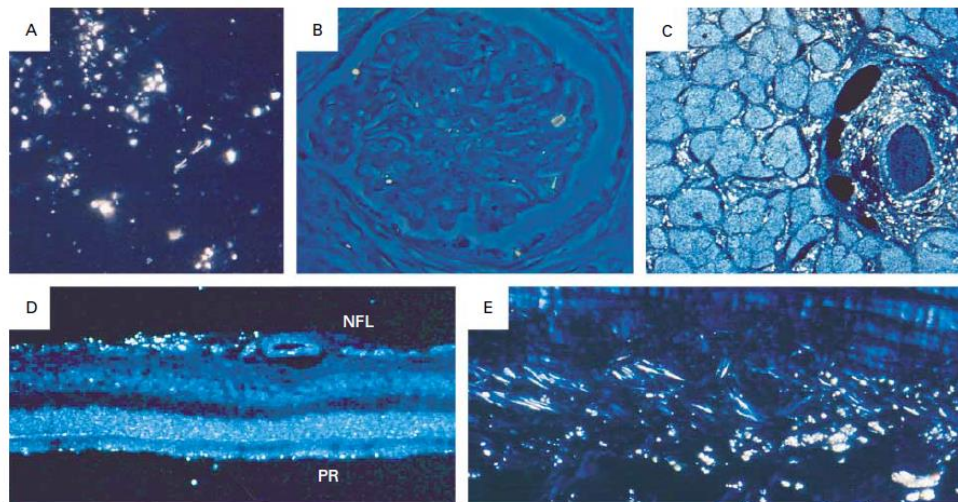


Figura 2.3. Muestras tomadas post mortem de un niño de 8 años con cistinosis nefropática. **A.** Muestra de hígado donde se observan cristales de cistina que exhiben refringencia bajo la luz polarizada. **B.** Muestra de riñón donde se observan cristales de cistina en el glomérulo renal. **C.** Muestra de nervio óptico y de la arteria central de la retina donde se muestran cristales de cistina en los espacios entre los haces de nervios. **D.** Muestra de retina donde se observan gran cantidad de cristales de cistina en la fibra nerviosa y menos cristales a nivel de los fotorreceptores. **E.** Muestra de la unión corneal-escleral, señalado cristales de cistina en el estroma (lado izquierdo) y los cristales de cistina con forma irregular en la conjuntiva que cubre la esclerótica (4).

- ✓ Ocular: Es común que estos pacientes presenten de manera prematura acumulación de cristales de cistina en las distintas capas de la córnea (endotelio, estroma y epitelio), conjuntiva y también en otras partes del ojo como la esclerótica y la retina (Figura 2.3 y 2.4). La deposición de estos cristales en la córnea es muy alta en niños enfermos de 6-10 años.

Estos cristales tienen forma hexagonal y se agregan formando acículas, son característicos de esta enfermedad (Figura 2.4). Los síntomas más predominantes suelen ser: fotofobia, lagrimeo y blefarospasmo, despigmentación irregular y periférica de la retina que puede dar lugar a una retinopatía (6,7).

Si no se tratan, los pacientes pueden llegar a desarrollar ceguera. Este trabajo se centra en el abordaje terapéutico de los síntomas oculares.

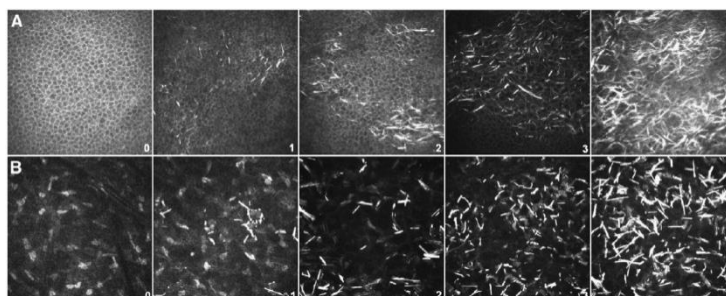


Figura 2.4. Cristales de cistina en el epitelio (A) y en el estroma (B) de la córnea. Imágenes de córneas de pacientes de menor a mayor porcentaje de depósito de los cristales (18).

Otras alteraciones que aparecen con frecuencia en los enfermos son: hipotiroidismo, atrofia muscular progresiva, alteraciones gastrointestinales (reflujo, vómitos, hepatomegalia), diabetes mellitus, deterioro del SNC o hipogonadismo masculino (8).

- Cistinosis intermedia: Es una forma más leve de la enfermedad que la anterior, tanto a nivel renal como a nivel ocular, y no produce retraso del crecimiento. La esperanza de vida es mayor (1,7).
- Cistinosis asintomática: Suele ser benigna y la única manifestación es la fotofobia. Para confirmar la enfermedad se buscan los depósitos de cistina en la córnea. Generalmente, tampoco es mortal (1,7).

Diagnóstico

El diagnóstico debería hacerse antes del primer año de vida para evitar, de este modo, complicaciones que pudiesen ser irreversibles. Los estudios bioquímicos son las herramientas diagnósticas más utilizadas.

Generalmente cuando se sospecha de la enfermedad, se realiza una medida de los electrolitos séricos (sodio, potasio, fosfato y bicarbonato que suelen estar disminuidos), medida de gases respiratorios (acidosis metabólica derivada de la enfermedad), presencia de glucosa y proteínas en orina (9).

El diagnóstico se confirma mediante la determinación de los niveles de cistina libre en los leucocitos polimorfonucleares o también, en fibroblastos cultivados de la piel o la conjuntiva, siendo este último método invasivo, por lo que es poco utilizado (1,10).

La determinación habitual de la cistina se realiza en los leucocitos, puesto que tienen gran cantidad de lisosomas. La determinación se realiza por cromatografía de intercambio iónico. Este método es poco sensible, por lo que cuando hay los recursos disponibles para ello, se recurre a uno más específico y sensible de tipo ELISA basado en la unión de la cistina libre a una proteína fijadora de cistina de *E. coli* (CBP: cystine binding protein) (4,10,11,12).

La concentración de cistina medida en los leucocitos de individuos sanos, se encuentra por debajo de 0,2 nanomoles de cistina por cada miligramo de proteína celular, siendo de 5-15 nanomoles en enfermos de cistinosis infantil y entre 3-6 nmoles en pacientes diagnosticados con la forma intermedia (1,9).

Cuando existe sospecha por antecedentes familiares, se puede hacer un diagnóstico prenatal, a través de los amniocitos, líquido amniótico o mediante una muestra de vellosidades coriales. Empleándose para ello cistina marcada con un isótopo de azufre (^{35}S) o por estudios de ADN fetal, cuando la mutación se conoce en los progenitores (1,4).

En el caso de la afectación ocular, se pueden observar los cristales de cistina directamente en la córnea mediante una lámpara de hendidura, esta prueba permite un diagnóstico confirmatorio de la afectación ocular (Figura 2.5) (6,7).

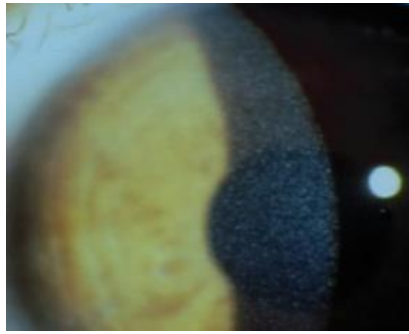


Figura 2.5. Cristales de cistina situados en la córnea observados con una lámpara de hendidura (5).

Otros métodos diagnósticos menos empleados, son los estudios moleculares del gen CTNS o las técnicas de imagen como radiografía o pruebas de ultrasonidos renal, que se emplean principalmente para descartar que sean calcificaciones en el tracto urinario (4,9).

Tratamiento

El tratamiento es paliativo, no existiendo hasta la fecha actual ninguna terapia que pueda interferir en el desencadenante de la enfermedad.

Este debe centrarse por un lado, en reducir las concentraciones de cistina mediante una terapia específica y por otro, en dar un tratamiento de soporte que permita reducir los síntomas y complicaciones derivados de la enfermedad.

- Terapia específica:

El único medicamento que puede reducir el curso de la enfermedad, es la cisteamina. Esta molécula provoca la eliminación de la cistina de los lisosomas. Químicamente es la sal de aminotiol (Figura 2.6) (1,2,5).

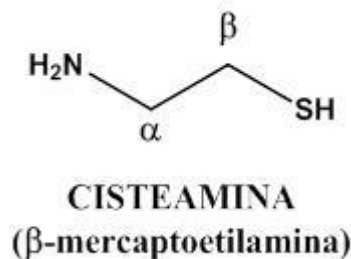


Figura 2.6. Estructura de la cisteamina.

La cisteamina reacciona con la cistina en el interior del lisosoma, dando un disulfuro mixto de cisteamina y cisteína, además de cisteína libre. Posteriormente, el disulfuro sale del lisosoma a través de un transportador de lisina, por su parecido estructural con este aminoácido (Figura 2.7). Una vez en el citoplasma, el glutatión reduce el disulfuro a cisteína y cisteamina y esta última vuelve a entrar en el lisosoma. Es un proceso cíclico (4,13,14).

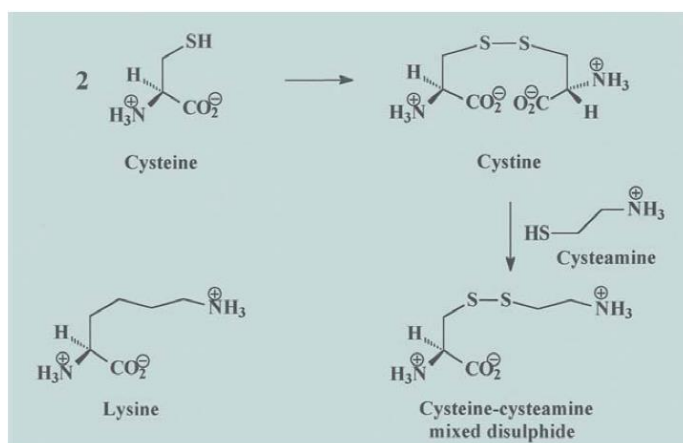


Figura 2.7. Mecanismo de acción de la cisteamina y similitud entre la estructura del aminoácido lisina y el disulfuro mixto de cisteamina-cisteína (14).

Este tratamiento se puede administrar por vía oral, como cápsulas, si se desea un efecto sistémico o por vía tópica, como colirio, si el efecto que buscamos es a nivel ocular.

El tratamiento mejora la progresión de la enfermedad y aumenta la esperanza de vida del enfermo, incluso sin necesidad de realizar el trasplante renal (4).

La cisteamina está comercializada para su administración por vía oral como bitartrato de cisteamina (Cystagon®). Tiene un sabor y un olor muy desagradable, dada su naturaleza azufrada, por lo que se formula como cápsulas de 50mg y 150mg (en los lactantes estas cápsulas se abren y se mezclan con zumo u otros líquidos, para hacer más fácil su administración) (4,5).

La posología de la cisteamina sistémica por vía oral se establece en función de la edad del paciente:

- Niños hasta 12 años se ajusta por superficie corporal, se administran 1,30 g/m²/día divididos en 4 tomas.
- Niños de más de 12 años se administran 2g/día dividido en 4 tomas.

El tratamiento se debe iniciar progresivamente para asegurar la tolerancia al fármaco, por lo que se comienza por $\frac{1}{4}$ de la dosis de la que le correspondería en función de los cálculos previamente indicados. Es conveniente tomar siempre el medicamento con comida, porque es irritante a nivel gastrointestinal (15).

Los efectos secundarios más frecuentes son náuseas, vómitos, cefalea u olor cutáneo desagradable, pudiendo llegar a provocar somnolencia si se utilizan dosis elevadas. (15).

También hay cápsulas de bitartrato de cisteamina de liberación retardada (Procysbi®) pero sólo esta comercializadas en EE. UU. (13).

Existen dos formulaciones con concentraciones distintas de clorhidrato de cisteamina, 0.44% (Cystaran®) y 0,55% (Cystadrops®), que se administran de 6 a 12 veces al día.

Pero por ahora no están comercializados en España, el Cystadrops® todavía está en ensayo clínico de fase III. Para poder dispensarlos se debe recurrir a la tramitación como medicamento extranjero, a pesar de que no tenga licencia definitiva para la indicación ensayada (16,17,18,19).

Los efectos adversos más frecuentes de la administración tópica del clorhidrato de cisteamina son: sensibilidad a la luz, enrojecimiento, irritación y dolor en los ojos, dolor de cabeza y defectos del campo visual.

Estos productos son medicamentos huérfanos y su precio es muy elevado.

- Terapia de soporte:

La cistinosis renal produce pérdida de agua, electrolitos y moléculas. El tratamiento de soporte está destinado a la reposición de todos ellos. Se debe hacer un aporte adecuado de agua. Además se emplean suplementos de potasio, calcio, magnesio, sodio, cloro, bicarbonato, aminoácidos, glucosa y carnitina.

También se puede administrar terapia hormonal sustitutiva, en el caso de padecer raquitismo (hormona del crecimiento), hipotiroidismo (levotiroxina) o hipogonadismo masculino (testosterona) (4).

2.2 Características de la vía ocular

El ojo es un órgano encargado de detectar la luz y convertirla en impulsos eléctricos, permitiendo la visión. Tiene una estructura compleja, anatómicamente podemos distinguir las siguientes partes, (20) (Figura 2.8):

- Párpados: estructura fundamental en la superficie ocular, proporcionan protección mecánica frente a traumatismos e irritaciones y favorecen la dinámica lagrimal sobre la córnea y la conjuntiva.
- Córnea: capa transparente y dura, cuya función es enfocar la luz y proteger el ojo.
- Esclera: rodea la córnea y une con la conjuntiva, es una capa protectora.
- Conjuntiva: es la capa mucosa que rodea el globo ocular, está ampliamente vascularizada.
- Iris: es el arco que rodea la pupila y regula la cantidad de luz que entra.
- Cristalino: se localiza detrás del iris y ayuda a enfocar la luz y las imágenes en la retina.
- Cuerpo ciliar: rodea justo el cristalino, situándose detrás del iris y produce humor acuoso
- Retina: es la cara posterior del globo y se encarga de transformar las señales en impulsos eléctricos.
- Nervio óptico: conduce el impulso eléctrico hasta la corteza.

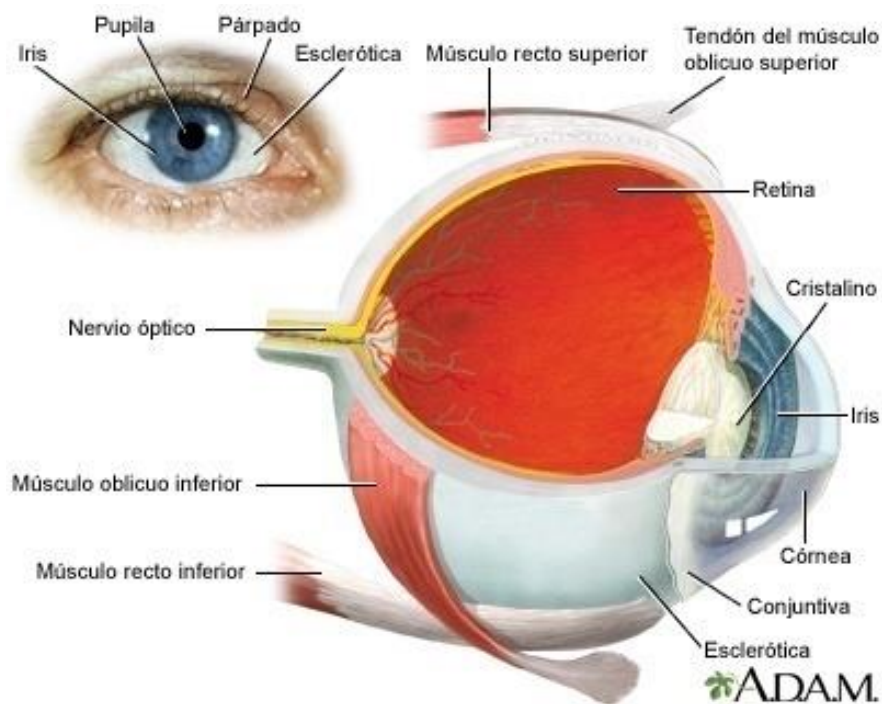


Figura 2.8. Anatomía del ojo. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/>

La penetración de los fármacos al interior del ojo tras la administración a nivel tópico corneal es muy complicada, ya que los fármacos tratan de atravesar las barreras protectoras del ojo, pero sin causar daños en su integridad (21).

Los cristales de cistina se localizan por casi todo el ojo, especialmente en la córnea, las principales capas de la córnea son:

El epitelio que está en contacto con la film lacrimonal y actúa como una barrera selectiva para las pequeñas moléculas, evitando la difusión de macromoléculas a través de la ruta paracelular. Las células epiteliales más superficiales tienen una vida media de pocos días y gran capacidad de regeneración.

La capa de Bowman es una estructura acelular incapaz de regenerarse y que representa la capa externa del estroma.

El estroma es una capa muy hidrófila, formada por queratocitos.

La membrana de pre-Descemet o de Dua, se desconoce su función y está en contacto con la membrana basal del endotelio.

El endotelio está formado por una capa de células hexagonales y es la capa responsable de la hidratación (22).

La cistina se acumula tanto en la región central como en la periférica, acumulándose en todo el espesor corneal. Comienza en el epitelio y va progresando hacia el endotelio. (23).

El ojo tiene numerosos mecanismos de protección, que también van a actuar como barreras en la administración ocular de fármacos (9). Las principales barreras que debe superar el fármaco son:

- Drenaje nasolagrimal: provocando que a medida que administramos el colirio, la mayor parte se pierda por el conducto nasolagrimal, disminuyendo los efectos locales y aumentando la absorción sistémica.
- Película lacrimal (o film lacrimal): es una capa fina de líquido que recubre las capas externas del globo ocular, podemos dividirla en tres capas: lipídica, hidrosoluble e hidrofílica. El volumen del film corneal normal son aproximadamente 7 μ L, tras administrar un colirio, el volumen de medicamento restante se elimina con los parpadeos hasta restaurar el volumen normal. La función principal del film es lubricante, nutritiva y antibacteriana.

El tiempo que tarda en renovarse todo el film es de aproximadamente 2 min, haciendo que el fármaco no se mantenga el tiempo suficiente para que penetre a través de la córnea y desarrolle su acción (24).

- Lagrimeo: actúa como un lavado de la superficie ocular. La lágrima contiene gran cantidad de agua, también contiene glucosa, proteínas (lisozima, albumina...) e iones (sodio, potasio, calcio...).

Todas estas barreras hacen que sólo penetre a la córnea entre el 1-5% del fármaco con características fisicoquímicas adecuadas para penetrar. Esto se traduce en la ineficacia del fármaco y en el caso de la cisteamina, que haya que administrarlo constantemente (cada hora) para lograr efectos terapéuticos (21).

2.3 Requerimientos de la vía ocular

Además las formas de administración oftálmicas deben cumplir una serie de requisitos como (25)(22):

- ✓ Osmolaridad:

La osmolaridad de la lágrima es igual a la del plasma (290 mOsm), la superficie ocular tiene un amplio margen de tolerancia a los cambios en este parámetro, tolerándose mejor las formulaciones ligeramente hipertónicas. Esta se puede aumentar añadiendo excipientes a la formulación, ya que generalmente las formulaciones suelen ser hipotónicas.

✓ pH

El pH ideal para una formulación oftálmica es de 7.4, igual que el del plasma. Cambios significativos en este valor, pueden provocar irritación y lagrimeo, provocando un efecto de lavado del ojo y además puede provocar cambios en la absorción del fármaco. Se pueden emplear soluciones tampón para ajustar el pH.

✓ Esterilidad

Es importante para evitar infecciones oculares, las formas de esterilización más empleadas son la filtración esterilizante, autoclave o esterilización por calor seco.

También se pueden elaborar las fórmulas ya en estéril, mediante una campana de flujo laminar y materias primas estériles. Se deben realizar controles microbiológicos mediante el cultivo en placas.

✓ Limpidez

La limpidez es la ausencia de partículas en suspensión en las formulaciones oftálmicas. Este requisito es importante, puesto que las partículas pueden provocar lesiones corneales.

2.4 Hidrogeles ion sensibles oftálmicos

Los hidrogeles oftálmicos, han sido diseñados para aumentar el tiempo de contacto del fármaco con la superficie del globo ocular, aspecto muy importante para que el medicamento que incorporan, pueda desarrollar su acción, bien a nivel superficial o penetrar y actuar en el interior. En la elaboración de los hidrogeles se emplean sustancias viscosizantes como los polímeros hidrofílicos, estos tienen capacidad mucoadhesiva y favorecen la permanencia precorneal del fármaco.

Los hidrogeles oftálmicos de gelificación *in situ*, se basan en la formulación de polímeros con capacidad de experimentar un cambio de fase en respuesta a un estímulo de su entorno, como pueden ser las variaciones en el pH, la temperatura o la presencia de iones. Esto va a depender de los polímeros que empleemos en la elaboración del gel.

Los geles sensibles a los cambios de temperatura contienen polímeros como por ejemplo: poloxámero o pluronic, los sensibles al pH contienen polímeros como: carbopol o ácido poliacrílico y los sensibles a los iones reaccionan en contacto con la lágrima como: el alginato, carragenato kappa o la goma gellan (9).

Originalmente son líquidos viscosos, pero cuando experimentan el cambio de fase, gelifican, prolongando el tiempo de contacto del fármaco con la superficie del globo ocular, y permitiendo una liberación continua del fármaco a lo largo del tiempo. Por tanto, además de favorecer la penetración de más cantidad de fármaco, al aumentar el tiempo de contacto va permitir que este penetre de manera continua, reduciendo el número de administraciones.

Dos polímeros ion sensibles ampliamente empleados son: el carragenato kappa y la goma gellan.

El carragenato es un polisacárido que se extrae de algunas especies de algas rojas (Rhodophyceae), está formado por repeticiones de β -D-galactosa y 3,6-anhidro- α -D-galactosa (Figura 2.9). Hay varios tipos y se diferencian en el grado de sulfatación de la α -D-galactosa, que va a condicionar las propiedades gelificantes del mismo: ι -carragenato (mono-sulfato), κ -carragenato (di-sulfato), y λ -carragenina (tri-sulfato). La λ -carragenina se emplea como espesante y los otros dos en la elaboración de hidrogeles.

El carragenato kappa, se caracteriza por su capacidad de gelificar en presencia de iones monovalentes, como el sodio presente en la lágrima. Este polímero forma enlaces físicos que ralentizan la salida del fármaco especialmente si este es hidrofóbico, pudiendo controlar su liberación mediante el control del número de enlaces, que está directamente relacionado con la concentración de polisacárido presente en el gel. Otros factores que influyen en la liberación son: la carga de fármaco y el agente que provoque la reticulación. Sus buenas características reológicas y la textura de los hidrogeles que forma, hacen que sea un componente adecuado para la elaboración de hidrogeles (22,26).

La Goma Gellan, se obtiene a partir de una bacteria conocida como *Sphingomonas elodea*. Este polisacárido se compone de 4 tipos de unidades que se repiten: L-ramnopiranosil-(α -1 \rightarrow 3), D-glucopiranosil-(β -1 \rightarrow 4), D-glucuronopiranosil-(β -1 \rightarrow 4), D-glucopiranosil-(β -1) y sustituyentes acetilo o L-glicerilo (Figura 2.9). Este polímero adopta una estructura tridimensional en forma de hélice, orientando los residuos acetilo hacia la cara externa y los glicerilo y los hidrógenos hacia la cara interna, para estabilizar la unión. Dependiendo del grado de acetilación de la goma gellan se hacen geles flexibles y elásticos (goma gellan acetilada) o frágiles y no elásticos (goma gellan des-acetilada).

Existen muchos estudios que avalan su uso en formulaciones oftálmicas, puesto que es capaz de gelificar aunque se encuentre en pequeña proporción. Este polisacárido forma geles en presencia de cationes mono (Na^+ y K^+) y divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}), como los que se encuentran en la lágrima, pero presenta mayor afinidad por los últimos (22,26).

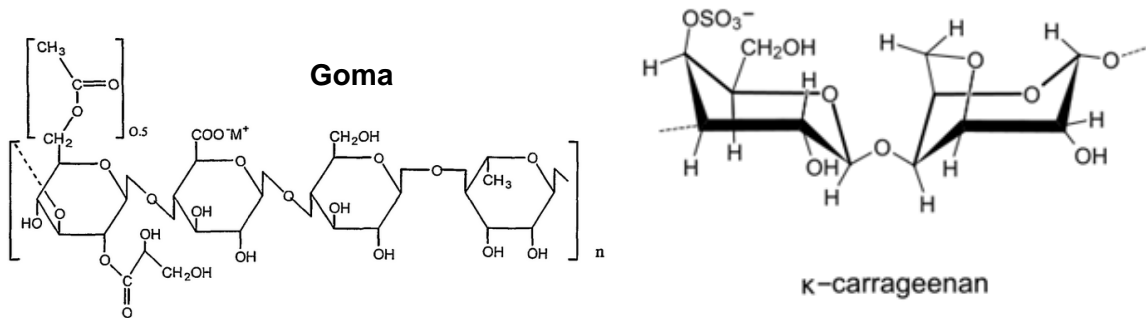


Figura 2.9. Estructuras químicas de la goma gellan y carragenato kappa.

2.5 Ensayos de toxicidad oftálmica

Uno de los factores más importantes para que un medicamento se pueda comercializar para su uso, es que se haya demostrado su seguridad. Para ello se pueden realizar numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los ensayos *in vivo* presentan la ventaja de que son más fácilmente extrapolables a la población real. Entre las desventajas: son poco éticos porque producen sufrimiento animal, hay más variables que en los ensayos *in vitro* y muchas de ellas no se pueden controlar, complicando el ensayo.

Los ensayos *in vitro* simplifican mucho el trabajo, porque se pueden controlar algunas variables, pero presentan como desventaja la falta de extrapolación que pueden tener sus resultados.

Por ejemplo, los ensayos de citotoxicidad, son ensayos *in vitro* que se basan en determinar las alteraciones, que una sustancia produce en las células con las que va a estar en contacto. Mediante la medición de propiedades de las células como: su actividad metabólica, su morfología (empleando colorantes), la adhesión o su viabilidad.

También se puede determinar la irritación ocular aguda a un medicamento, antiguamente la irritación ocular se medía mediante el test de Draïze, que es un test *in vivo*. Que consiste en administrar la sustancia objeto de estudio en uno de los ojos del conejo, mientras que el otro

se emplea como control. Después se observan durante un tiempo a ver si hay alguna reacción. Hoy en día, se están empezando a emplear ensayos organotípicos cuyos resultados parecen ser extrapolables.

3. Objetivo

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un sistema oftálmico para la administración tópica de cisteamina, asegurando un nivel adecuado de seguridad ocular.

El gel deberá ser estable durante al menos 3 meses de almacenamiento. Se pretende que esta formulación pueda ser elaborada en un Servicio de Farmacia hospitalaria, ya que la cantidad de enfermos de cistinosis es muy reducida y por lo tanto no posee interés comercial para la industria farmacéutica.

La formulación de un gel ion sensible, que gelifique en presencia de los iones de la lágrima, es una buena estrategia para aumentar el tiempo de contacto del fármaco con la superficie ocular, podría mejorar el tratamiento de los síntomas oculares de la enfermedad. Las propiedades bioadhesivas de los polímeros que forman parte del gel, pueden llegar a disminuir el número de administraciones diarias, mejorando el intervalo de administración.

4. Material y método

El presente estudio se ha desarrollado en diferentes etapas, inicialmente se ha centrado en el desarrollo de una parte galénica destinada al desarrollo de un hidrogel oftálmico adecuado para su administración ocular, seguido de una segunda etapa centrada en asegurar la seguridad toxicológica del mismo.

4.1 Elaboración y ensayo de estabilidad del hidrogel sin fármaco

Como punto de partida, hemos utilizado un hidrogel desarrollado en un trabajo previo, dadas sus buenas propiedades bioadhesivas y de permanencia en el ojo (27).

En la elaboración de esta formulación se han empleado los siguientes polímeros: carragenato kappa (Genugel® carrageenan GC-130) y goma gellan (Kelcogel® CG-LA). El hidrogel ensayado tiene una concentración de polímero total de 0,75%, con una proporción de 66% Goma Gellan y 33% Carragenato Kappa. El proceso de elaboración se describe a continuación:

Se calienta agua purificada (Ellix, Merck-Millipore) en un vaso de precipitados hasta aproximadamente 60°C. Se añade la goma gellan de manera progresiva hasta completa homogeneización, la disolución se mantiene con calor y agitación magnética (350rpm). Cuando el polímero está completamente disuelto, se añade el carragenato kappa y se retira del calor, manteniendo únicamente la agitación magnética hasta que no se aprecien partículas del polvo en el gel, aproximadamente 2 horas (Figura 4.1).



Figura 4.1. Elaboración del hidrogel.

Una vez elaborado el gel se procedió a su esterilización y envasado. Para ello, se ha seleccionado la filtración esterilizante en campana de flujo laminar a través de filtros de 0,22µm de diámetro Stericup® (Merck-Millipore).

Los geles se envasaron directamente en botes de vidrio topacios de 10ml y se almacenaron en dos condiciones de conservación: unos en nevera (4-8°C) y otros a temperatura ambiente, para estudiar si las condiciones de almacenamiento afectaban a las propiedades del hidrogel (Figura 4.2) (28).



Figura 4.2. Esterilización y envasado del gel.

Posteriormente se midieron las propiedades durante 3 meses. Los parámetros que se determinaron fueron: transparencia, esterilidad, ausencia de partículas, pH, bioadhesión y osmolalidad. Las medidas se realizaron los días 0, 7, 15, 30, 60 y 90 del almacenamiento. Para ello, todas las muestras se atemperaron durante 20 min a temperatura ambiente antes de la medición de las propiedades, de este modo cuando realizamos la determinación podemos eliminar variaciones debidas a la temperatura, y una vez agitados manualmente se procedió a la determinación de las sus propiedades (Figura 4.1) (29,30,31,32,33,34,35):

- Transparencia (Espectrofotómetro de red de diodos Hewlett Packard 8452): Se mide la transmitancia en un intervalo de λ entre 300 y 700 nm (zona visible) (Figura 4.3). Para medirla se empleó un espectrofotómetro que está conectado a un ordenador, este recoge los datos en una gráfica, que representa el porcentaje de luz transmitida frente a las longitudes de onda a las que se ha medido. Se considera que la transparencia máxima se obtiene cuando los valores de luz transmitida son del cien por cien. Como blanco se ha empleado agua destilada.



Figura 4.3. Espectrofotómetro de red de diodos Hewlett Packard 8452.

- Esterilidad y ausencia de partículas; la esterilidad se verificó mediante la siembra del gel en agar Columbia y agar Sabouraud. La ausencia de partículas se analizó mediante la observación del gel con una inspectora de partículas convencional (Figura 4.4).

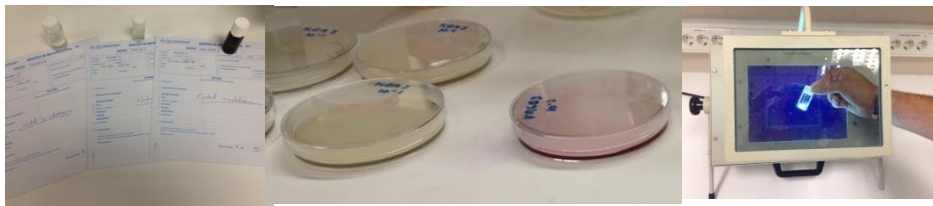


Figura 4.4. Control microbiológico y ausencia de partículas.

- pH (pHmetro WTW inoLab® con un electrodo especial para formulaciones viscosas). Tras la calibración se midió cada muestra por triplicado, agitando manualmente el gel antes de cada medida (Figura 4.5).

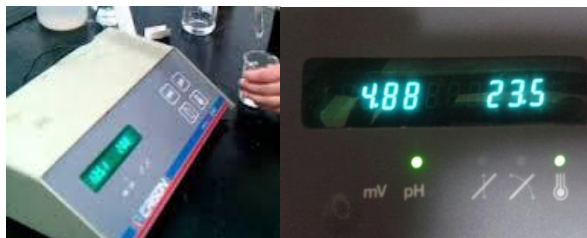


Figura 4.5. Determinación del pH mediante pHmetro WTW inoLab®.

- Bioadhesión (Analizador de textura TA-XT Plus); Se realizó un ensayo para medir la fuerza máxima y el trabajo necesario para romper los enlaces establecidos entre el

gel y el sustrato (piel curtida de cabra pakistaní), siendo estos parámetros los que determinan las características bioadhesivas del hidrogel.

Para ello se adhiere con cinta de doble cara, un círculo de piel de cabra al punzón superior (móvil) de su mismo diámetro (cubriendo su base) y se cubre la placa inferior también con piel de cabra, de manera que al bajar el punzón coincidan. A continuación, se pipetea 50 μ L del gel sobre la piel de la placa. Se realiza un ciclo de presión de 0,5N durante 1 min de contacto, para a continuación separar las dos muestras de sustrato a una velocidad de 1mm/s. Durante el ensayo se procede al registro de la curva de fuerza vs deformación (extensión) (Figura 4.6).

Se realizan 5 medidas de cada gel, sustituyendo la piel del punzón y de la placa, en cada medida.

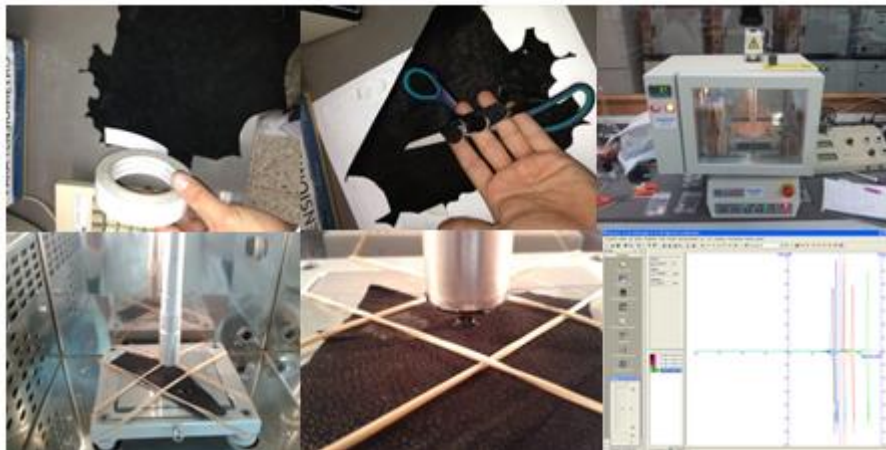


Figura 4.6. Procedimiento para medir la bioadhesión.

Este parámetro está relacionado con la capacidad del gel para mantenerse en la superficie del ojo.

La curva fuerza vs extensión nos permite determinar la fuerza máxima necesaria para separar los dos sustratos, y por lo tanto, para romper la unión bioadhesiva que los mantiene unidos.

El trabajo de adhesión, que se calcula como el área bajo la curva fuerza frente al desplazamiento, representa la energía o el trabajo necesario para separar los sustratos.

- Osmolalidad: se determinó mediante un Vapor Pressure Osmometer (VAPRO 5520®) (Figura 4.7), tras la calibración del aparato, se procedió a la medición de la osmolalidad del gel. Cada muestra se midió por triplicado.

Sólo se determinaron en la formulación recién preparada y una vez finalizó el periodo de almacenamiento del hidrogel.



Figura 4.7. Osmómetro VAPRO 5520®.

4.2 Incorporación de la cisteamina en el hidrogel

Una vez comprobada la estabilidad del vehículo durante los tres meses de almacenamiento se procedió a la incorporación de la cisteamina en el hidrogel. Para ello se incorporó el fármaco a la disolución acuosa antes de la dispersión de los polisacáridos.

La incorporación de la cisteamina supuso un aumento importante de la viscosidad del gel empleado, por lo que se procedió a la disminución de las proporciones de los polímeros. Para ello, inicialmente se elaboraron geles a diferentes concentraciones de polímero, pero manteniendo constante la proporción 66% goma gellan y 33% carragenato kappa. Posteriormente viendo los resultados obtenidos, se decidió modificar la proporción de los polímeros, disminuyendo la cantidad de carragenato kappa hasta una proporción final del 12% carragenato kappa y 88% goma gellan.

En todos los casos la elaboración se realizó en las siguientes etapas:

1. Se calienta el agua en un vaso de precipitados hasta aproximadamente 60°C y se le añadió la cisteamina, se deja agitando hasta completa disolución.
2. Adición de goma gellan con calor y agitación, hasta la obtención de una disolución transparente.
3. Por último, se le añade el carragenato kappa y se retira la disolución del calor, manteniendo únicamente la agitación, hasta que no se observen partículas en suspensión.

Una vez elaborados, a todos los geles se le midió la transparencia, pH y bioadhesión en el momento inicial.

4.3 Estudios de toxicidad

Ensayo *in vitro* de citotoxicidad celular:

En este caso se realizó un ensayo que cuantifica como varia el crecimiento *in vitro* de las células en presencia de las sustancias que queremos estudiar, en tiempo real, conocido comúnmente como RTCA (real time cell analyzer). Mediante la medición de la bioimpedancia del cultivo de queratocitos cada 15 minutos durante aproximadamente 50 horas.

Evaluamos la citotoxicidad de los componentes del hidrogel y de la cisteamina de manera independiente. El método empleado consiste en la medida de la variación de una población de queratocitos estromales primarios, en contacto con diferentes concentraciones de los compuestos.

Para ello se emplea un cultivo primario de queratocitos humanos, obtenido siguiendo el método modificado de Ramke (36). Se emplea como medio de cultivo el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) / Ham F-12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, con 2 mM L-glutamina, y antiinfecciosos (100 IU de penicilina, 100 mg / ml de estreptomina, 50 mg / ml de gentamicina).

El método de obtención y la calidad de los cultivos de queratinocitos han sido caracterizados previamente mediante pruebas inmunohistoquímicas (22,37).

Para este estudio se ha utilizado el xCELLigence Real-Time Cell Analyzer System (RTCA), este sistema mide, mediante unos microchips localizados en cada pocillo, las variaciones de la bioimpedancia debidas a los cambios en el número de células adheridas a la base de la placa, este dispositivo toma medidas cada 15 min (Figura 4.8 y 4.9).

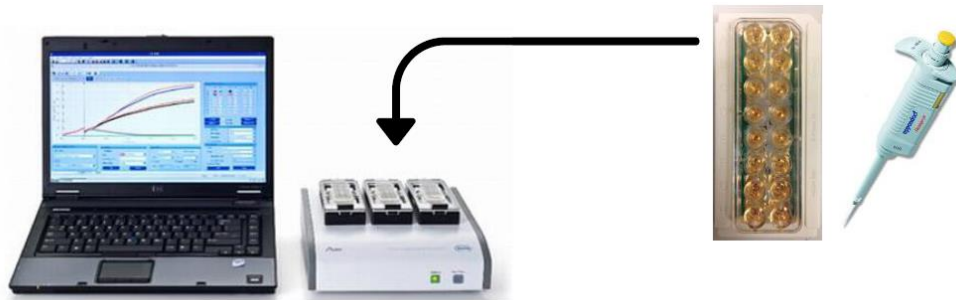


Figura 4.8. Sistema xCELLigence Real-Time System Cell Analyzer (RTCA) (ACEA Biosciences, San Diego, CA) con Eplates 16 pocillos con sensores de bioimpedancia. (22)

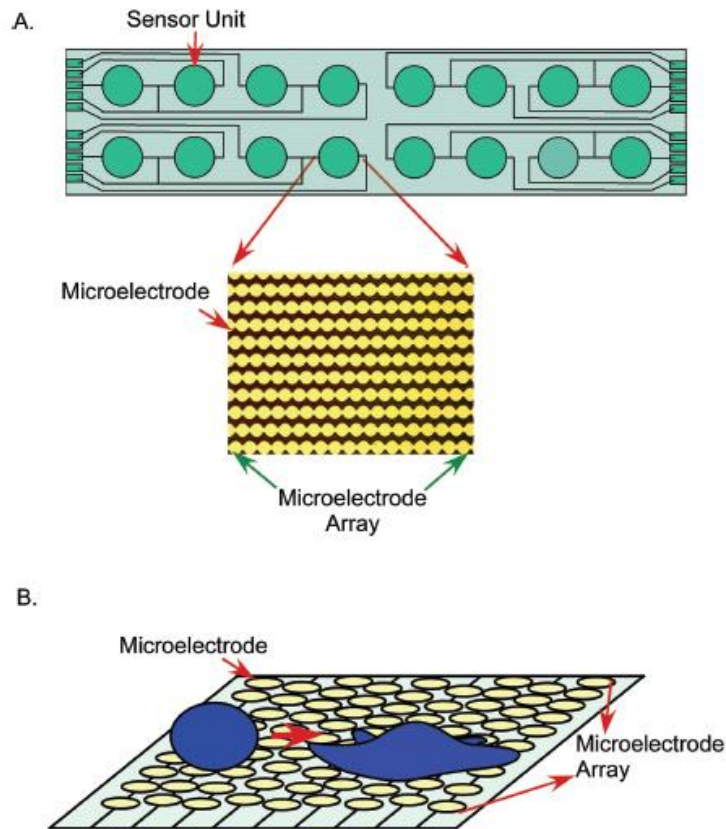


Figura 4.9. Esquema de funcionamiento del sistema xCELLigence Real-Time Cell Analyzer System (RTCA) (38).

El método de la impedancia bioeléctrica se basa en determinar la resistencia que oponen los materiales, a la conducción de una corriente de baja intensidad a través la base de la placa. El medio de cultivo por su alto contenido en agua, conduce bien la corriente en cambio las

células por su contenido en grasa (membranas, lipoproteínas...) oponen mayor resistencia al paso de la corriente. Por tanto la impedancia será mayor, cuantas más células haya en el pocillo.

Cuando una célula se adhiere a la placa, aumenta el área de contacto de las células con la placa (aumenta la cantidad de materia grasa en contacto con la placa) y esto se traduce en un aumento de la bioimpedancia.

Los valores de la bioimpedancia se transforman mediante un algoritmo matemático en otro parámetro conocido como índice celular (IC). Para calcularlo se emplea la siguiente fórmula $IC = (R_n - R_b) / 15$, donde R_n es la impedancia de la célula-electrodo del pocillo cuando contiene células y R_b es la impedancia del fondo del pocillo sólo con el medio de cultivo. Para estudiar la citotoxicidad vamos a emplear los IC normalizados (ICN); $ICN_i = IC_i(t) / IC_i(t \text{ de la dosis})$, donde $IC_i(t)$ es el IC en cualquier momento, e $IC_i(t \text{ de la dosis})$ es IC en el momento de añadir los compuestos al medio de cultivo (22,38).

Las gráficas obtenidas muestran los cambios dinámicos, donde se representa el ICN desde la adición de los compuestos, frente al tiempo, para para cada una de las concentraciones ensayadas.

Por otro lado, se calcula el porcentaje de respuesta normalizado de las células expuestas a cada uno de los medicamentos (ICN tratamientos) en comparación con las células no expuestas a tóxicos (ICN control) usando la siguiente ecuación: $\text{Respuesta (\%)} = [ICN(\text{tratamiento}) / ICN(\text{control})] * 100$ (22,39).

Las concentraciones de compuestos, que inhiben el crecimiento del 50% de las células tratadas, en comparación con las células control, se conocen como IC50 y se calculan por la interpolación en los gráficos que representan la actividad de respuesta normalizada. Cuanto más bajo sea este valor, más tóxico será el compuesto (22,40).

➤ Procedimiento:

- i. Para realizar este ensayo, la población inicial de células en todos los pocillos debe ser igual. Para ello, es necesario conocer la cantidad que hay en el cultivo original, el conteo se realiza mediante una cámara de Neubauer. En nuestro caso se parte de una población de 20.000 células/ml, como la población inicial se ha acordado que sea de 3.000 en cada pocillo, se añaden 150µL de la suspensión de células a cada uno.
Posteriormente se incuban durante 24h a 37 °C y 5% CO₂.

- ii. Se elimina el medio y se le añade uno nuevo que contiene las sustancias, que queremos ensayar a diferentes concentraciones (Tabla 4.1). El último pocillo de cada columna es el control, se le añade medio de cultivo sin polímero ni fármaco (22,41). En la Tabla 4.2 aparece el método de dilución.

Nº Pocillo	Cisteamina disolución madre 5.5 mg/ml	Goma Gellan disolución madre 6.6 mg/ml	Carragenato disolución madre 3.2 mg/ml
1	2.75 mg/ml	3.3 mg/ml	1.6 mg/ml
2	1.83 mg/ml	2.2 mg/ml	1.067mg/ml
3	1.1 mg/ml	1.32 mg/ml	0.64 mg/ml
4	0.786 mg/ml	0.943 mg/ml	0.457 mg/ml
5	0.611 mg/ml	0.733 mg/ml	0.355 mg/ml
6	0.5 mg/ml	0.6 mg/ml	0.291 mg/ml
7	0.262 mg/ml	0.314 mg/ml	0.152 mg/ml
8	0	0	0

Tabla 4.1. Concentración de fármaco o polímero en cada pocillo.

Nº pocillo	Diluciones
<u>1</u>	0,5 mL disolución madre del fármaco + 0,5 mL cultivo celular
<u>2</u>	0,5 mL disolución madre del fármaco + 1 mL cultivo celular
<u>3</u>	0,5 mL disolución madre del fármaco + 2 mL cultivo celular
<u>4</u>	0,5 mL disolución madre del fármaco + 3 mL cultivo celular
<u>5</u>	0,5 mL disolución madre del fármaco + 4 mL cultivo celular
<u>6</u>	0,5 mL disolución madre del fármaco + 5 mL cultivo celular
<u>7</u>	0,25 mL disolución madre del fármaco + 5 mL cultivo celular

Tabla 4.2. Procedimiento de dilución.

- iii. Las sustancias se mantienen en contacto con las células depositadas en el fondo del pocillo durante 50 horas en las mismas condiciones de conservación (37 °C y 5% CO₂).

Determinación de la capacidad de irritación corneal aguda “The Hen's Egg Test (HET-CAM)

Este ensayo permite evaluar la irritación ocular aguda de los fármacos. Es un ensayo organotípico alternativo al test de Draize. Se realiza sobre la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, esta membrana tiene gran cantidad de vasos sanguíneos funcionales y puede reflejar los daños que produciría una sustancia en contacto con la superficie ocular.

Si el compuesto ensayado es irritante, se puede apreciar la coagulación, lisis vascular o hemorragia en estos vasos, durante los 5 min siguientes a la aplicación del compuesto.

La preparación de los huevos comienza con la elección de huevos Broiler embrionados, que se incubaran a lo largo de 8 días a 38°C y 70% HR, dándoles 5 volteos diarios. En este caso la incubadora empleada lo hacía de manera automática y continua, durante todo el día. Al noveno día de incubación, se colocan en posición vertical para crear el espacio aéreo superior y ya no se les vuelve a dar ninguna vuelta. Se mantienen en la posición vertical durante las siguientes 24 horas.

Pasado este tiempo, se perfora la cáscara externa por la parte superior del huevo, donde está situada la cámara de aire, con el disco cortante de la Dremel. Se humedece la membrana interna con una solución estéril de NaCl 0,9% durante al menos 5 min, para facilitar su extracción y se retira esta membrana (Figura 4.10).

De este modo el huevo queda con la Membrana corioalantoidea expuesta (CAM), y ya está preparado para el ensayo (42).



Figura 4.10. Procedimiento del ensayo HET-CAM. (42)

Se realizó el ensayo por triplicado para cada sustancia y se hizo un control negativo y otro positivo mediante la adición, directamente sobre la membrana corioalantoidea, de 300 μ L de NaCl 0,9% y NaOH 0,1N), respectivamente.

Una vez ya está el huevo preparado, se le adicionan 300 μ L de las sustancias que vamos a estudiar: carragenato kappa (0,32%), goma gellan (0,66%) y cisteamina (0,55%) (Figura 4.11).

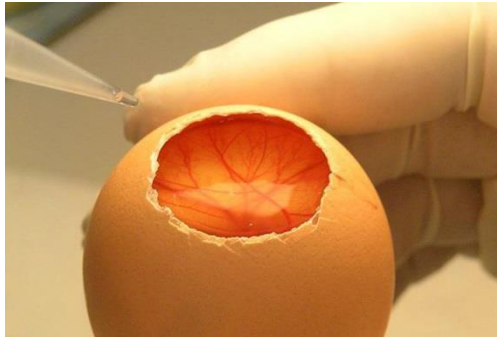


Figura 4.11. Adición de las disoluciones al huevo.

Se han empleado las concentraciones más altas que se van a emplear en la elaboración de los geles.

Se observa si se producen fenómenos vasculares durante los 5 min de observación. Además se graba en video para que evaluadores independientes contabilicen el tiempo de aparición de los posibles fenómenos, puesto que es un ensayo que presenta cierta subjetividad. Para ello se emplea una cámara integrada Standalone digital en un microscopio estereoscópico Olympus SZ-STN con Full HD Live Salida de vídeo Leica IC80 HD (Figura 4.12).



Figura 4.12. Cámara digital conectada a un microscopio estereoscópico con salida de vídeo similar a la empleada.

➤ Interpretación:

Los posibles fenómenos vasculares que podemos observar son: Hemorragia, Lisis y Coagulación (42).

Midiendo el tiempo que tardan en aparecer estos fenómenos, podemos determinar el potencial irritante de la sustancia (IS), mediante la fórmula:

$$IS = [(301 - t \text{ hemorragia})/300] \times 5 + [(301 - t \text{ lisis})/300] \times 7 + [(301 - t \text{ coagulación})/300] \times 9]$$

Dependiendo del IS la clasificaremos en:

- IS 0-0.9 → no irritante
- IS 1-4.9 → ligeramente irritante
- IS 5-9.9 → moderadamente irritante
- IS 10-21 → severamente irritante

5. Resultados

5.1 Elaboración y ensayo de estabilidad del hidrogel sin fármaco

El gel obtenido se comporta como un líquido viscoso que se fluidifica al ser agitado de forma intensa, lo que favorece su dosificación.

- **Transparencia**

De acuerdo con los resultados de la figura podemos afirmar que el gel se mantuvo transparente durante el periodo de estudio. Además, las dos condiciones de almacenamiento dieron resultados similares (Figura 5.1).

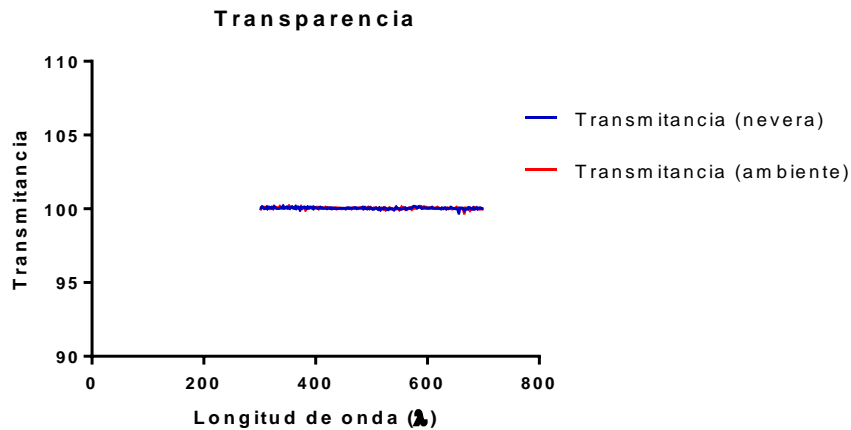


Figura 5.1. Representación de la transmitancia frente a la longitud de onda.

- **Esterilidad y ausencia de partículas**

El control microbiológico demostró que todos los geles, tanto los almacenados a temperatura ambiente como los de nevera, estaban estériles. Además, no se observaron partículas en ninguno de ellos.

- **pH**

Este parámetro permanece inalterado a lo largo del tiempo (Figura 5.2).

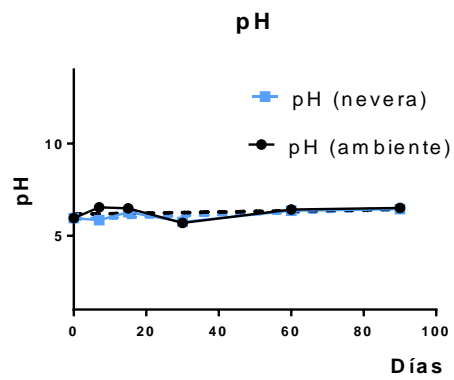


Figura 5.2. Representación de la variación del pH con el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente o en nevera.

- **Bioadhesión**

Los resultados indican que el gel mantiene su capacidad bioadhesiva durante el almacenamiento en las dos condiciones ensayadas (Figura 5.3 y 5.4).

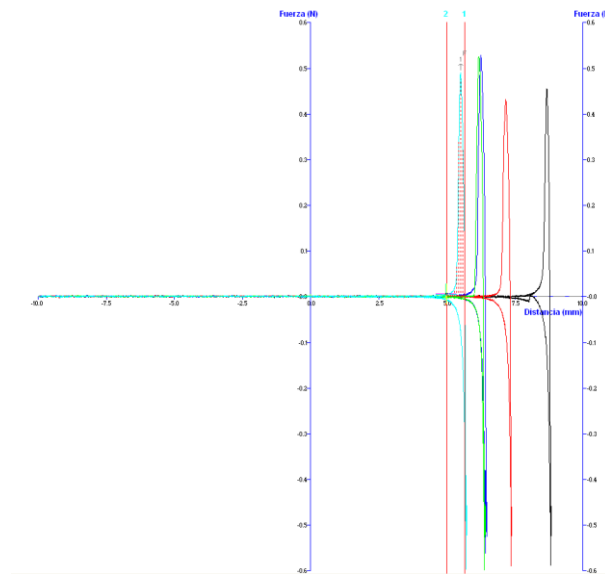


Figura 5.3. Gráfica de bioadhesión donde se representa la fuerza frente al desplazamiento del punzón superior.

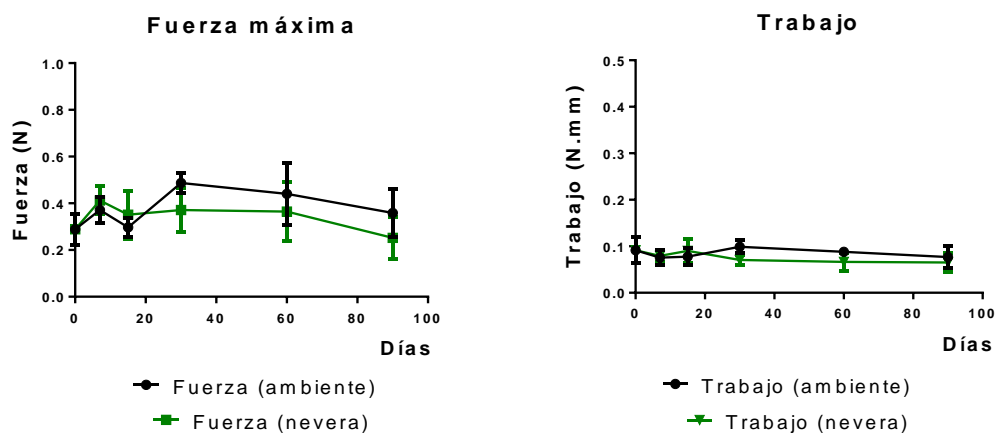


Figura 5.4. En la primera gráfica se representa la fuerza máxima frente al tiempo de almacenamiento del gel. En la segunda gráfica se representa el trabajo frente al tiempo de almacenamiento del gel.

- **Osmolalidad:**

Se ha realizado dos medidas de la osmolalidad del hidrogel, la inicial y la final. Las medidas iniciales fueron 108, 99, 110mOsm/Kg y la medida final, en el caso del gel almacenado en la nevera 116,116 y 109mOsm/Kg y para el gel almacenado a temperatura ambiente 92, 93 y 101mOsm/Kg.

5.2 Incorporación de la cisteamina en el hidrogel

La incorporación de la cisteamina al hidrogel produce su gelificación prematura durante su preparación, aumentando la viscosidad de manera importante. La causa puede deberse al carácter iónico de la cisteamina, que debido a su pKa de 9,42 se encuentra ionizada al pH del gel, pudiendo interactuar con los grupos sulfato del carragenato o los ácido de la goma gellan. Para minimizar el aumento de la viscosidad se procedió a adaptar la formulación.

Después de ensayar varias concentraciones de polímero total y dentro de estas diferentes proporciones de polisacáridos, se llegó a la conclusión de que el grupo amino de la cisteamina reacciona en mayor medida con el carragenato y por ello se ha disminuido su proporción en el gel.

Las primeras concentraciones de polímero total ensayadas fueron las de 0,75%, el hidrogel quedaba muy consistente con apariencia de sólido, siendo incapaz de reconstituirlo con una

simple agitación. Tuvimos que reducir sustancialmente las concentraciones de polímero total. Como el carragenato era el que reaccionaba mayoritariamente con la cisteamina, disminuimos su proporción del 33% al 12% de carragenato, y aumentamos el porcentaje de goma gellan al 88%. En todos los casos la reducción del polímero no modifica el pH final del gel. Los geles con una textura adecuada para poder medirlos están recogidos en la Figura 5.5.

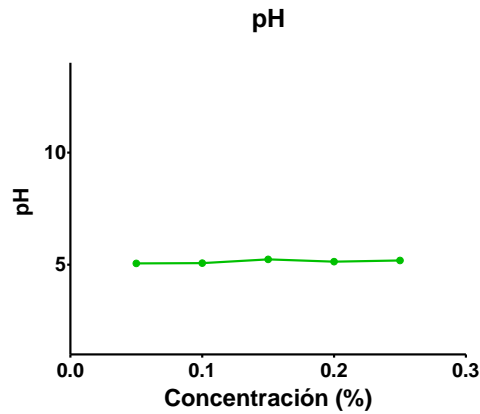


Figura 5.5. La gráfica representa como el pH es independiente de la concentración de polímero total.

Se aprecia una reducción significativa, sobre todo en la fuerza máxima de adhesión, al reducir la cantidad de polímero en el gel, si bien el trabajo no se ve tan afectado. La disminución puede estar relacionada con la resistencia de la capa de gel que se forma entre los sustratos que es más débil cuanto menor es la proporción de polímero y por lo tanto más frágil. Sin embargo, pese a la reducción el valor del trabajo de adhesión es adecuado para las concentraciones menores de polisacáridos (Figura 5.6).

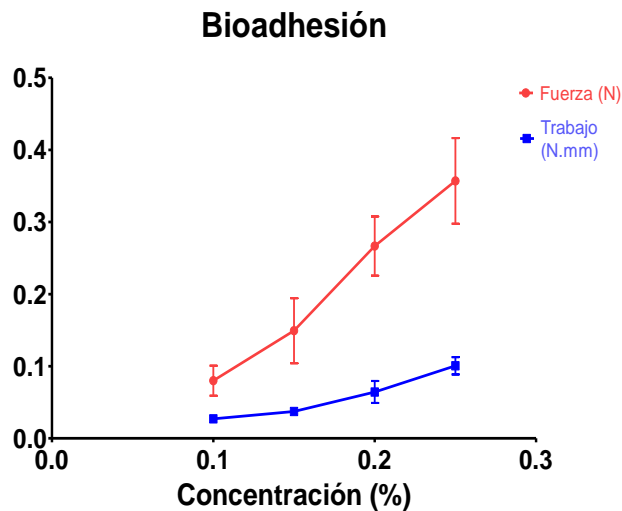


Figura 5.6. La gráfica representa como la fuerza máxima y el trabajo son proporcionales a la concentración de polímero total.

Desde el punto de vista de su administración, el gel con concentración total de polímero de 0,15% ha sido el que ha demostrado mejores propiedades. Por su fácil reconstitución y su aspecto transparente.

5.3 Estudios de toxicidad

Ensayos *in vitro* de citotoxicidad celular

En la Figura 5.7, 5.8 y 5.9 se muestran los resultados del estudio de citotoxicidad de los componentes del hidrogel.

El carragenato kappa no ha mostrado signos de citotoxicidad, sino que incluso favorece la proliferación de los queratocitos, dando mayor crecimiento celular que en el caso del control. Este efecto es dosis y tiempo dependiente y los incrementos más marcados ocurren a las dosis más altas.

No tiene sentido calcular el IC50 para este parámetro, ya que tiene un efecto promotor del crecimiento, favorece la proliferación de los queratocitos. El índice celular normalizado es incluso superior al observado con el grupo control (Figura 5.7)

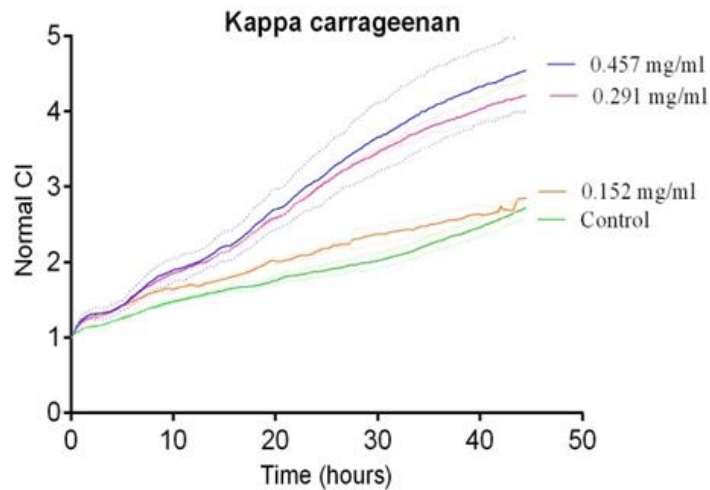


Figura 5.7. Representación de los índices de crecimiento normalizados tras la adicción del carragenato kappa frente al tiempo.

La goma gellan presenta un aumento del índice celular normalizado por debajo del grupo control, dependiente de la concentración del polímero. Cuanto mayor es la concentración menor es el índice celular normalizado y más se inhibe el crecimiento normal de los queratocitos. Por tanto, la proliferación de estas células se haría más lenta de lo normal tras la adicción del polímero y este efecto se mantiene constante en el tiempo (Figura 5.8). Tampoco se halla el IC50 de la goma gellan porque no tiene efecto citotóxico.

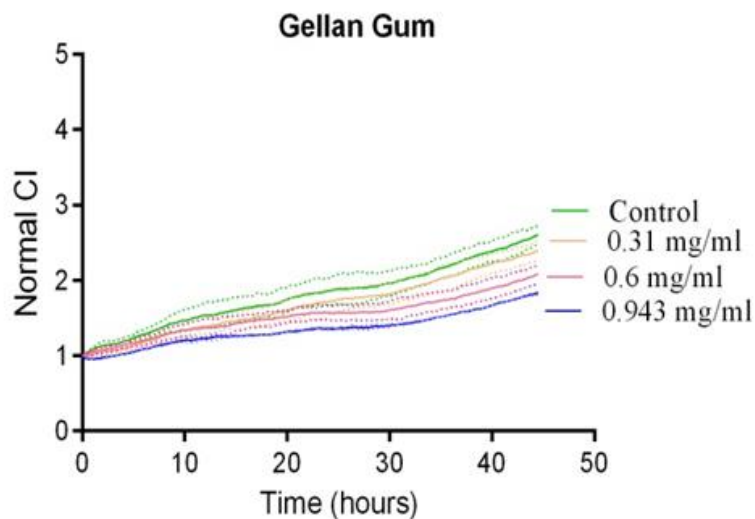


Figura 5.8. Representación de los índices de crecimiento normalizados tras la adicción de la goma gellan frente al tiempo.

La cisteamina presenta una toxicidad importante, durante las cinco primeras horas tras la adición del fármaco el índice celular normalizado disminuye un 50%, mostrándose todas las concentraciones testadas con similar citotoxicidad (Figura 5.9).

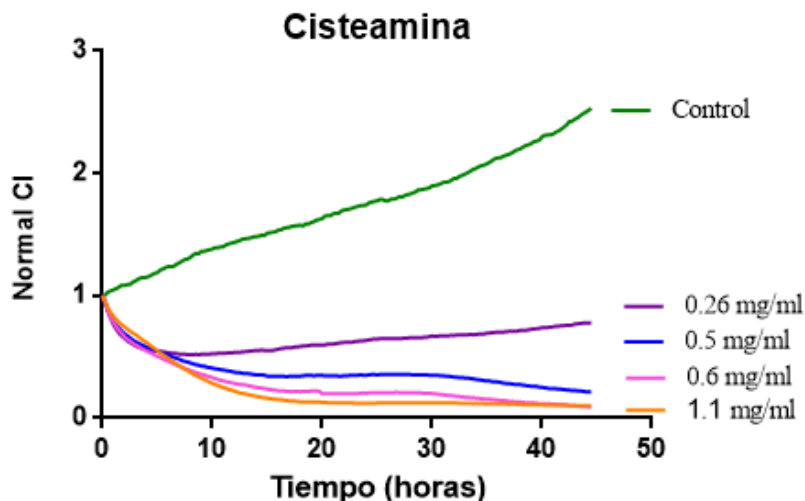


Figura 5.9. Representación de los índices de crecimiento normalizados tras la adición de la cisteamina frente al tiempo.

Para esta sustancia, calculamos el IC₅₀, concentración de compuesto que hace disminuir al 50% el índice celular (Figura 5.10). Podemos observar que en las 5 primeras horas pasamos de un IC₅₀ de 1.34mg/ml a 0.5mg/ml y a partir de ahí se mantiene prácticamente constante.

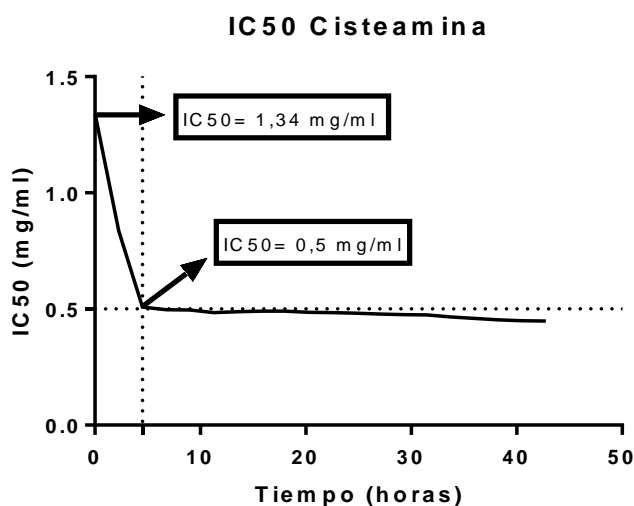


Figura 5.10. Representación del IC₅₀ para la cisteamina.

Determinación de la capacidad de irritación corneal aguda "The Hen's Egg Test (HET-CAM)

En la Figura 5.11 se observa el resultado del control negativo, tras la adición del NaCl 0,9%. No observándose ninguna reacción o cambio que indique irritación durante los 5 min de estudio.

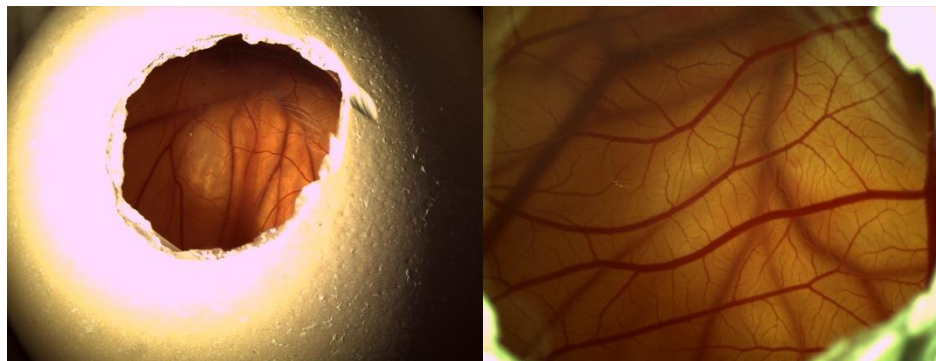


Figura 5.11. Membrana corioalantoidea intacta tras la adición de 300µl de NaCl 0.9%.

En la figura 5.12 se observa el resultado del control positivo, tras la adición del NaOH 0,1N. Se observó la coagulación instantánea de los vasos y además cierta hemolisis.

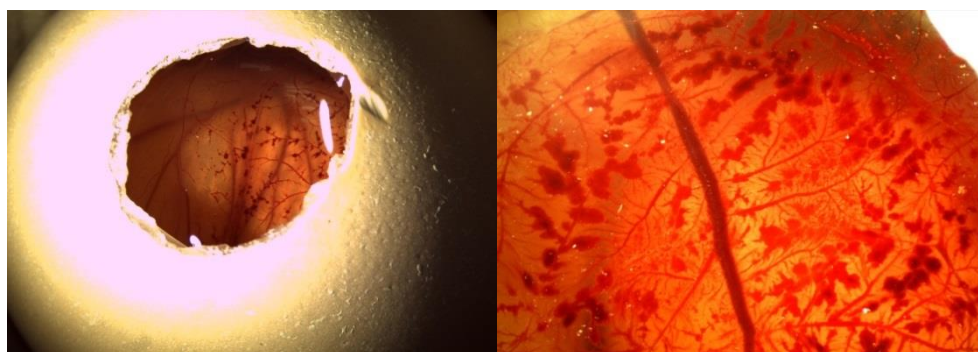


Figura 5.12. Membrana corioalantoidea con coagulación tras la adición de 300µl de NaOH 0.1N.

En el caso de los compuestos ensayados, no se observó ningún indicio de coagulación, lisis o hemolisis en la membrana corioalantoidea de los huevos durante los 5 min de observación. Los resultados indican que ninguno de los productos posee capacidad irritante, dando lugar a índices de irritación de 0. (Figura 5.13).

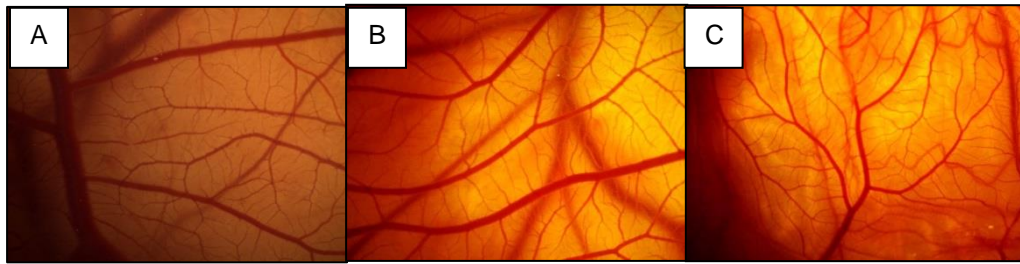


Figura 5.13. **A.** Membrana corioalantoidea tras 5 min desde la administración de 300 µl de carragenato kappa 0.32%. **B.** Membrana corioalantoidea tras 5 min desde la administración de 300 µl de goma gellan 0,66%. **C.** Membrana corioalantoidea tras 5 min desde la administración de 300 µl de cisteamina 0,55%.

6. Discusión

La eficacia de la mayoría de los fármacos oftálmicos, está condicionada por la baja retención del principio activo en la superficie ocular, debido al fluido lacrimal y al aclaramiento del ojo, favoreciendo el drenaje por el conducto nasolacrimal y con ello, la aparición de efectos adversos y la absorción sistémica. En el caso de la cisteamina, en el arsenal terapéutico español no existen preparaciones oftálmicas para su administración por lo que o bien se preparan como fórmula magistral en el hospital o se importa el colirio CYSTARAN®. En ambos casos se requiere de una administración muy continuada debido al elevado aclaramiento ocular de estas formulaciones.

La formulación de la cisteamina en un sistema de gelificación in situ, podría presentar ventajas importantes con respecto a los colirios oftálmicos utilizados, puesto que estos sistemas favorecen la permanencia del fármaco en contacto con el área precorneal y pueden mejorar su penetración, incluso permiten una liberación controlada del fármaco, pudiendo incrementar el intervalo de administración (22,27) .

Para la formulación de la cisteamina, se seleccionó un hidrogel sensible a los iones mono y divalentes, presentes en la lágrima, elaborado a partir de carragenato kappa y goma gellan. Ya que en estudios previos demostró gran capacidad bioadhesiva y de permanencia ocular (27). Para cumplir con los requisitos de la vía de administración, fue necesario establecer un protocolo de esterilización adecuado. Finalmente, la esterilización del gel se realizó mediante filtración esterilizante, ya que se ha observado que cuando sometemos la goma gellan a un ciclo estándar de autoclavado, 121°C durante 15 minutos, esta pierde sus propiedades viscosizantes, bioadhesivas y adquiere un tono amarillento, probablemente resultado de su degradación por efecto de la temperatura.

Para evaluar la utilidad del gel es necesario garantizar que no va a sufrir alteraciones durante su almacenamiento, desde que se elabora hasta su utilización. Por ello se realizó un ensayo de estabilidad del gel sin principio activo durante tres meses de almacenamiento a temperatura ambiente o en nevera. Los resultados han demostrado su buena estabilidad en ambas condiciones, no modificando significativamente ninguna de las propiedades del gel estudiadas.

La inclusión de la dosis de cisteamina seleccionada en el hidrogel, dio lugar a un aumento de la viscosidad muy importante, debido a un proceso de gelificación en presencia del principio activo. Probablemente, se establecen interacciones entre los grupos ácido

carboxílico de la goma gellan y sobre todo, los radicales sulfato del carragenato kappa, con los grupos amino de la cisteamina, causando la gelificación del sistema. Por ello, ha sido necesario modificar la concentración de los polisacáridos en el gel, para conseguir unas propiedades adecuadas que permitan su administración. Finalmente tras varias pruebas, se disminuyó el contenido de polímeros a un 0.15%, con unas proporciones de goma gellan y k-carragenato del 88 y del 12%, respectivamente. En estas condiciones se consigue una disolución manejable, que continúa con sus propiedades de sensibilidad a iones sin comprometer su bioadhesión.

En las pruebas de toxicidad realizadas, se ha observado que los polímeros no producen irritación aguda ni citotoxicidad. El carragenato kappa, incluso ha demostrado mejorar la proliferación de los queratocitos por encima del grupo control. Al contrario que la cisteamina, que si se ha mostrado citotóxica, a pesar de no producir irritación aguda.

La falta de un método sencillo de determinación de la cisteamina, constituye una limitación muy importante del ensayo (9), puesto que no se pueden realizar ensayos de liberación del fármaco incluido en el gel. Además sería conveniente estudiar la penetración del fármaco a nivel corneal.

7. Conclusión

En España, no existe ninguna formulación oftálmica comercializada para el tratamiento de los cristales de cistina, que se acumulan en la córnea. El Servicio de Farmacia hospitalaria, elabora el colirio a partir de hidrocloreto de cisteamina, pero este presenta algunas desventajas, como que el fármaco no se mantiene en la superficie ocular el tiempo suficiente para penetrar y desarrollar su acción. Por ello, se tiene que administrar de 6 a 12 veces al día. Otro de los mayores inconvenientes es que no se han realizado ensayos de citotoxicidad de esta molécula en los queratocitos, por lo que se desconoce su perfil de seguridad.

Para solucionar estos problemas se ha propuesto la elaboración de un hidrogel de gelificación in situ, a partir de carragenato kappa y goma gellan. Este experimenta un cambio de fase en presencia de los cationes mono y divalentes de la lágrima.

Este gel, al igual que el colirio, se puede elaborar en Servicio de Farmacia hospitalaria. Además se ha estudiado su estabilidad y la toxicidad, demostrando que es estable al menos a lo largo de 3 meses, independientemente de su almacenamiento en nevera o a temperatura ambiente. Los polímeros empleados no presentan citotoxicidad ni irritación ocular aguda.

Con la formulación de estos geles se espera mejorar, tanto la penetración del fármaco, como su intervalo de administración, al aumentar el tiempo de permanencia del mismo en la superficie ocular.

8. Bibliografía

- (1) Crespo PS, Vázquez AB. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. : Ergon; 2014.
- (2) Puentes R. R, Ibáñez T. S, Solar G. E, Valenzuela L. A, Aracena A. M. Cistinosis nefropática infantil. Revista chilena de pediatría 2000;71(2):122-127.
- (3) Ibarra C. Enfermedades hereditarias relacionadas con defectos genéticos del trasplante tubular renal. Arch.latioam.nefrol.pediátr 2002;2(3):144-159.
- (4) Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Review: Cystinosis. N Engl J Med 2002 07/11; 2015/06;347(2):111-121.
- (5) Nesterova G, Gahl W. Cystinosis: the evolution of a treatable disease. Pediatr Nephrol 2013;28(1):51-59.
- (6) A. Gahl W, M. Kuehl, Ernest & Co. Corneal Crystals in Nephropathic Cystinosis: Natural History and Treatment with Cysteamine Eyedrops. Molecular Genetics and Metabolism 2000 Aug. 2000;71:100-120.
- (7) Prado-Serrano A, Nava-Hernández NG. Manifestaciones corneales de cistinosis en un adolescente. Revista Mexicana de Oftalmología 2011 Junio 2011;85(2):97-102.
- (8) Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al, editors. GeneReviews(R) Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2001.
- (9) Bolanle Lawal. Development of a cysteamine in situ gelling system for the treatment of corneal crystals in cystinosis. London: University of London; July 2008.
- (10) Morell GP. Cistinosis: desde los cristales de cistina a la cistinosina. Nefrología 2003;23(Supl 1):60-70.
- (11) Negrette A. Leucocitos: Gránulos o lisosomas. Investigación Clínica 1977;18(4).
- (12) Oshima RG, Willis RC, Furlong CE, Schneider JA. Binding assays for amino acids. The utilization of a cystine binding protein from Escherichia coli for the determination of acid-soluble cystine in small physiological samples. J Biol Chem 1974 Oct 10;249(19):6033-6039.

- (13) Agencia Europea del Medicamento (EMA). Informe Público Europeo de Evaluación (EPAR) de Procysbi. 2013; Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002465/WC500151312.pdf. Accessed Enero, 2015.
- (14) Cairns D, Anderson R, Coulthard M, Terry J. Cystinosis and its treatment. *Pharmaceutical Journal* 2002;269(7221):615-616.
- (15) Agencia Europea del Medicamento (EMA). Ficha técnica: Cystagon. 2007; Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000125/WC500037764.pdf. Accessed Enero, 2015.
- (16) SigmaTau. Prospecto del Cystaran. Oct. 2012; Available at: <http://www.sigmatau.com/products/CYSTARANPI.pdf>. Accessed Enero, 2015.
- (17) Orphan Europe: Cystadrops. 2015; Available at: <http://www.orphan-europe.com/current-products-and-pipeline>. Accessed Jun, 2015.
- (18) Labbé A, Baudouin C, Deschênes G, Loirat C, Charbit M, Guest G, et al. A new gel formulation of topical cysteamine for the treatment of corneal cystine crystals in cystinosis: The Cystadrops OCT-1 study. *Mol Genet Metab* 2014;111(3):314-320.
- (19) Sigma-Tau Pharmaceuticals. Cystaran. 2014; Available at: <http://www.cystaran.com/>. Accessed 13 May, 2015.
- (20) Lobato Fuertes C, Cordero Coma M. Anatomía funcional de la superficie ocular. In: Complejo Asistencial Universitario de León, editor. Manual de iniciación a la cirugía del segmento anterior ocular. 2ª ed. León; 2011. p. 7-10.
- (21) Andrés-Guerrero V, Herrero-Vanrell R. Absorción de fármacos por vía tópica: Papel de la conjuntiva. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 2008;83(12):683-685.
- (22) Anxo Fernández Ferreiro. Manejo, seguridad y optimización de formulaciones tópicos oftálmica en servicios de farmacia hospitalaria. Santiago de Compostela: Universidad Santiago de Compostela; 2015.
- (23) Zarranz-Ventura J, Nova ED, Moreno-Montañés J. Manifestaciones corneales en las enfermedades sistémicas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 2008;31:155-170.

- (24) Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Review: Ocular drug delivery. The AAPS journal 2010;12(3):348-360.
- (25) Batistuzzo J, Lima Filho A. Formulações Magistrais em Oftalmologia. Acta Farmacêutica Portuguesa 2011;1(1):65-76.
- (26) Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, Alhaique F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. J Controlled Release 2007;119(1):5-24.
- (27) Fernández-Ferreiro A, Barcia MG, Gil-Martínez M, Vieites-Prado A, Lema I, Argibay B, et al. In vitro and in vivo ocular safety and eye surface permanence determination by direct and Magnetic Resonance Imaging of ion-sensitive hydrogels based on gellan gum and kappa-carrageenan. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2015;94:342-351.
- (28) Carlfors J, Edsman K, Petersson R, Jörnving K. Rheological evaluation of Gelrite® in situ gels for ophthalmic use. European journal of pharmaceutical sciences 1998;6(2):113-119.
- (29) Volltexte, Start Allgemeines Für Autoren Bestellmöglichkeit. Formulation and evaluation of a novel in situ gum based ophthalmic drug delivery system of linezolid. Sci pharm 2008;76:515-532.
- (30) Siddiqui F, Kalam MA, Parvez N, Yadav S, Sultana Y, Ali A, et al. Gellan-based systems for sustained ophthalmic delivery of ofloxacin. Cont J Pharm Sci 2008;2:1-14.
- (31) Wu H, Liu Z, Peng J, Li L, Li N, Li J, et al. Design and evaluation of baicalin-containing in situ pH-triggered gelling system for sustained ophthalmic drug delivery. Int J Pharm 2011;410(1):31-40.
- (32) Gupta S, Samanta MK, Raichur AM. Dual-drug delivery system based on in situ gel-forming nanosuspension of forskolin to enhance antiglaucoma efficacy. Aaps Pharmscitech 2010;11(1):322-335.
- (33) Pawar P, Kashyap H, Malhotra S, Sindhu R. Hp-beta-CD-voriconazole in situ gelling system for ocular drug delivery: in vitro, stability, and antifungal activities assessment. Biomed Res Int 2013;2013:341218.

- (34) Nagargoje S, Phatak A, Bhingare C, Chaudhari S. Formulation and evaluation of ophthalmic delivery of fluconazole from ion activated in situ gelling system. *Der Pharmacia Lettre* 2012;4(4):1228-1235.
- (35) Tejera BI, de Almagro, C Garzas Martín, Aranzana MC, Rodrigo IP, Rubio MA, Sánchez RG. Estabilidad y actividad in vitro de voriconazol en colirio a una concentración de 3 µg/mL. *Farmacia Hospitalaria* 2005;29(5):331-334.
- (36) Ramke M, Lam E, Meyer M, Knipper A, Heim A. Porcine corneal cell culture models for studying epidemic keratoconjunctivitis. *Molecular vision* 2013;19:614.
- (37) Ramke M, Lam E, Meyer M, Knipper A, Heim A. Porcine corneal cell culture models for studying epidemic keratoconjunctivitis. *Molecular vision* 2013;19:614.
- (38) Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *J Biomol Screen* 2005 Dec;10(8):795-805.
- (39) Otero-González L, Sierra-Alvarez R, Boitano S, Field JA. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. *Environ Sci Technol* 2012;46(18):10271-10278.
- (40) Boyd JM, Huang L, Xie L, Moe B, Gabos S, Li X. A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals. *Anal Chim Acta* 2008;615(1):80-87.
- (41) Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Mammalian Cell Viability: Springer*; 2011. p. 33-43.
- (42) Fernández-Ferreiro A, González Barcia M, Gil Martínez M, Blanco Mendez J, Lamas Díaz MJ, Otero Espinar FJ. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM. *Farmacia Hospitalaria* 2014;38(4):300-304.

9. Agradecimientos

Todo mi agradecimiento a las personas que han hecho posible este trabajo.

A mi tutor, Fran, por su dedicación, apoyo y paciencia, por inculcarme ese afán de querer aprender cada día más y por darme la oportunidad de haber trabajado con él.

A Anxo por enseñarme la constancia y el sacrificio. Por permitirme participar en sus ensayos, para expresar al máximo mi experiencia en el laboratorio.

A todo el personal del Servicio de Farmacia del CHUS y del IDIS.

A mi familia, especialmente a mis padres y como no, a mi abuela por mostrarme siempre su apoyo y su interés en mi trabajo.

A todos mis amigos y compañeros por su tiempo y cariño.