

Modelo animal de glaucoma crónico inducido con microesferas biodegradables: influencia de la adición de dexametasona

García Herranz David^{1,2}, Rodrigo María Jesús^{3,4,5}, Aragón Navas Alba^{1,2}, Subias Manuel^{4,5}, Martínez Rincón Teresa^{4,5}, Méndez Martínez Silvia^{4,5}, Cardiel María José^{4,5}, García Feijóo Julián^{1,3,7,8}, Pablo Luis^{3,4,5}, García Martín Elena^{3,4,5}, Herrero Vanrell Rocío^{1,2,3,6}, Bravo Osuna Irene^{*1,2,3,6}

¹ Innovación, Terapia y Desarrollo Farmacéutico en Oftalmología (InnOftal), Grupo de investigación UCM 920415, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, España.

² Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), IdISSC, 28040 Madrid, España.

³ Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (Oftared), Instituto de Salud Carlos III, 28040 Madrid, España.

⁴ Departamento de Oftalmología, Hospital Universitario Miguel Servet, 50009 Zaragoza, España.

⁵ Grupo de Investigación e Innovación Miguel Servet Oftalmología, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), 50009 Zaragoza, España

⁶ Instituto Universitario de Farmacia Industrial (IUPI), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, España.

⁷ Servicio de Oftalmología, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, España.

⁸ Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), IdISSC, 28040 Madrid, España.

*Correspondencia: ibravo@ucm.es

1. Introducción

El aumento de la presión intraocular (PIO) es el factor de riesgo modificable más importante en el desarrollo de glaucoma [1]. Con el objetivo de desarrollar un modelo animal crónico de glaucoma que simule las condiciones fisiopatológicas de esta patología mediante un aumento gradual de la PIO se ha procedido a la inyección, en cámara anterior, de microesferas (Ms) de ácido poli láctico-co- glicólico (PLGA) sin carga (PLGA-Ms) y cargadas con dexametasona (PLGA-Ms-DX). De esta forma se ha conseguido un bloqueo físico del drenaje de humor acuoso en la malla trabecular, en el primer caso y una combinación de daño físico y farmacológico en el segundo [2], elevando así la PIO. El objetivo del presente trabajo es la comparación de los valores de PIO como resultado de la inyección de las microesferas en ambos modelos animales, así como la degeneración retiniana.

2. Materiales y métodos

2.1. Elaboración y caracterización de las microesferas.

Las Ms blanco (PLGA-Ms) y las cargadas con DX (PLGA-Ms-DX) se elaboraron siguiendo la técnica de extracción- evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A. Como disolvente orgánico se utilizó diclorometano (DCM) para disolver el PLGA (50:50, viscosidad aparente 0.16–0.24 dL/g) y como emulgente de la fase externa alcoholpolivinílico (PVA). En el caso de las PLGA- Ms-DX, el fármaco fue dispersado en la fase interna de la emulsión. Tras su maduración, las Ms se lavaron, se separaron por tamización, y se liofilizaron. Las microesferas así obtenidas se caracterizaron en cuanto a morfología (microscopía electrónica de barrido, SEM), tamaño y distribución de tamaño de partícula (dispersión de luz dinámica). Además, con las PLGA-Ms-DX se estudió también la

eficacia de encapsulación de DX y se realizó el correspondiente ensayo de cesión in vitro durante 24 semanas (cuantificando la DX con HPLC-MS). En este ensayo, para simular el comportamiento in vivo, se incluyó una segunda dosis de microesferas al ensayo de cesión a las 4 semanas del comienzo del ensayo.

2.2. Ensayo in vivo.

Para el estudio in vivo (longitudinal e intervencionista) se emplearon ratas Long-Evans. 25 de ellas recibieron PLGA-Ms (inicial, cada dos semanas el primer mes y mensual hasta la semana 20). En el modelo inducido por PLGA-Ms-DX los animales (42 ratas) recibieron dos inyecciones (inicial y en la semana 4). En todos los casos, los animales recibieron una suspensión de Ms administrada en la cámara anterior del ojo derecho (OD) (10 % p/v).

Se evaluaron los signos clínicos, PIO medida con tonómetro de rebote) y se realizó evaluación neurorretiniana seriada e in vivo mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) y electroretinografía (ERG) hasta la semana 24.

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización de las microesferas.

Las Ms resultaron esféricas y de superficie lisa en ambas formulaciones. El tamaño de partícula resultó unimodal y similar en ambos casos (10-20 μm) (Fig.1).

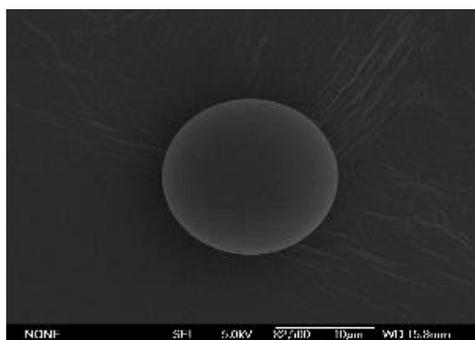


Fig. 1. Imagen de SEM y distribución de tamaños de las partículas PLGA-Ms- DX

En las PLGA-Ms-DX la eficacia de encapsulación fue de 66.77 ± 1.14 % (60.70 ± 1.03 μg DX/mg Ms). El perfil de liberación in vitro mostró dos liberaciones rápidas correspondientes al "burst" inicial y a la segunda administración de Ms en

la semana 4, seguidas de liberaciones sostenidas de DX hasta el día 77.

En los ojos inyectados con PLGA-Ms, la PIO aumentó significativamente ($p < 0,05$), a lo largo del estudio, en comparación con los ojos contralaterales, con valores que superaron los 20 mm Hg (señal de hipertensión ocular) a partir de la semana 12. La PIO en los ojos que recibieron PLGA-Ms-DX aumentó, en comparación con el contralateral, desde la primera semana, superando los 20 mm Hg en la semana 5. En ambos casos el incremento de la PIO resultó más progresiva que en animales sanos [3] y otros modelos que se caracterizan por producir una elevación de la PIO poco representativa del glaucoma crónico en humanos [4] (fig. 2). La liberación de dexametasona no sólo inició el aumento de la PIO antes, sino que además se necesitaron únicamente dos administraciones de las microesferas, mientras que el modelo de PLGA-Ms requirió 7 inyecciones. Los estudios de OCT y ERG mostraron, en ambos modelos, una tendencia descendente progresiva en el espesor de la retina y en la función neurorretiniana a lo largo del tiempo.

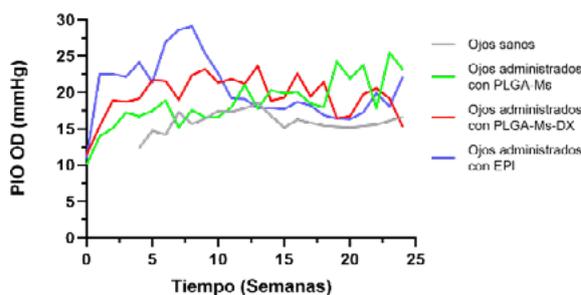


Fig. 2. Evaluación de la PIO en ojos administrados con PLGA-Ms (verde) y PLGA-Ms-DX (rojo), comparados con el modelo de Morrison producido por daño en la vena episcleral (azul) y con ojos sanos (gris).

4. Conclusiones

Los modelos de glaucoma presentados en este trabajo y que se fundamentan en el bloqueo físico y farmacológico de la salida del humor acuoso a través de la malla trabecular, por inyección de microesferas biodegradables, producen un incremento gradual de la PIO que se asemeja más a las condiciones fisiopatológicas en humanos, con la consiguiente degeneración crónica de la retina. El número de administraciones de microesferas se reduce considerablemente (de 7 a 2) cuando se emplea como agente de daño

farmacológico la dexametasona, lo que no sólo reduce el número de intervenciones en el animal, sino que permite una mejor caracterización del modelo (y de la evaluación de los posibles tratamientos experimentales) mediante técnicas no invasivas.

Agradecimientos

Rio Hortega Research Grant M17/00213, PI20/00437, PI17/01726, PI17/01946 (ISCIII), MAT2017-83858-C2-1, MAT2017- 83858-C2-2 MINECO/AEI/FEDER, Grupo de investigación UCM 920415, ISCIII-FEDER "Una manera de hacer Europa" RETICS Oftared, RD16/0008/0004, RD16/0008/0009, and RD16/0008/029. Beca Santander-UCM CT17/17-CT17-18, Beca PRE2018-083951.

Referencias bibliográficas

1. Qu J, Wang D, Grosskreutz CL. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Exp Eye Res.* 2010 Jul;91(1):48–53.
2. Kersey JP, Broadway DC. Corticosteroid-induced glaucoma: a review of the literature. *Eye.* 2006;20:407–16.
3. Rodrigo MJ, Martínez-Rincón T, Subias M, Méndez-Martínez S, Luna C, Pablo LE, et al. Effect of age and sex on neurodevelopment and neurodegeneration in the healthy eye: Longitudinal functional and structural study in the Long–Evans rat. *Exp Eye Res.* 2020 Nov;200.
4. Biswas S, Wan KH. Review of rodent hypertensive glaucoma models. *Acta Ophthalmol.* 2019;97(3):e331–40.

Este trabajo debe ser citado como:

García Herranz D, Rodrigo MJ, Aragón Navas A, Subias M, Martínez Rincón T, Méndez Martínez S, Cardiel MJ, García Feijó J, Pablo L, García Martín E, Herrero Vanrell R, Bravo Osuna I. Modelo animal de glaucoma crónico inducido con microesferas biodegradables: influencia de la adición de dexametasona. *Rev Esp Cien Farm.* 2021;2(2):60-2