UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Implementación de un bioensayo *ex vivo* de permeación e irritación corneal: valoración del clorhidrato de proparacaína como caso de estudio

Natalia Carolina González Jiménez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
2025

Implementación de un bioensayo *ex vivo* de permeación e irritación corneal: valoración del clorhidrato de proparacaína como caso de estudio

Natalia Carolina González Jiménez

Proyecto de tesis como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacología

Directora:

Q.F. MSc. PhD. Yolima Baena Aristizábal

Codirectora:

MV. MSc. PhD. María Constanza Lozano Álvarez

Línea de Investigación:

Farmacocinética y estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia

Grupo de Investigación:

Sistemas para Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas (SILICOMOBA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

2025

A mi Familia,

“Vive como si fueras a morir mañana, aprende como si fueras a vivir para siempre”

Mahatma Gandhi

"Las matemáticas puras son, en su forma, la poesía de las ideas lógicas"

Albert Einstein

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Natalia Carolina González Jiménez

_____

Natalia Carolina González Jiménez
02/04/2025

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente a todas las personas que hicieron posible la culminación de esta etapa de mi vida.

A mi madre, este sueño siempre fue nuestro, y aunque ya no estás físicamente, te siento en cada paso que doy. Desde el cielo, me has visto reír, llorar y disfrutar de este proceso. Siempre estás presente, transciendes. Te veo, te busco y te encuentro en los detalles más simples: un atardecer, un arcoíris, un libro, en la oscuridad y en la luz. Eres y serás mi mundo entero. Aunque ha sido difícil sonreír sin ti, aprendí a hacerlo de nuevo, sabiendo que tenemos algo en común: somos dos mariposas. Tú te convertiste en una, cuando dejaste atrás las preocupaciones mundanas, ahora vuelves a casa, a Dios, y yo sigo aquí, con resiliencia, inteligencia emocional y madurez, cumpliendo los sueños que fueron nuestros.

A mi papá, por estar siempre a mi lado, guiándome y brindándome su apoyo incondicional. Gracias por su sabiduría, paciencia y por ser un pilar fundamental en mi vida. Por apoyarme en mis decisiones, incluso cuando no estás de acuerdo, por cuestionarme, por retarme, y por permitirme ser libre y autónoma desde niña. Me enseñaste a ser independiente, a no buscar el camino fácil, y a valorar tanto lo tangible como lo intangible. Pero, sobre todo, gracias por siempre creer en mí. A mis hermanos y a toda mi familia, quienes son el motor que me impulsa a seguir. Su amor y apoyo han sido invaluables, especialmente en los momentos más difíciles.

A mi directora de tesis, la profesora Yolima Baena Aristizábal, gracias por su apoyo constante, por creer en mí desde el inicio y guiarme con sus valiosas enseñanzas. Sin su confianza y orientación, este proyecto no habría sido posible. A mi codirectora, la profesora María Constanza Lozano Álvarez, agradezco profundamente el tiempo dedicado, su conocimiento y el respaldo que me brindó a lo largo de esta investigación.

A Jacid y Alexander, quienes permitieron realizar la recolección de muestras para el proyecto, gracias por su disposición y ayuda.

A mis compañeros del laboratorio y todos aquellos que estuvieron dispuestos a ayudarme siempre, mi gratitud es inmensa. A mis amigos, por cada palabra de aliento, por estar presentes en los momentos más cruciales y por ser parte de este viaje.

Gracias a Dios por permitirme seguir adelante, por darme la fortaleza para enfrentar cada obstáculo y por rodearme de personas tan maravillosas.

Resumen

La córnea es una barrera esencial para la protección ocular y su daño representa una causa significativa de ceguera a nivel mundial. El uso inadecuado de anestésicos tópicos como el clorhidrato de proparacaína puede generar lesiones corneales severas, lo que resalta la importancia de evaluar su permeabilidad e impacto histológico. Este estudio implementó un ensayo *ex vivo* para evaluar la permeación y el potencial de irritación del clorhidrato de proparacaína. Se emplearon celdas de Franz y córneas porcinas para evaluar la permeabilidad del fármaco en diferentes concentraciones. La cuantificación del fármaco se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis. También se llevó a cabo un análisis histológico de las córneas tratadas, clasificando las lesiones en epitelio, estroma y endotelio. Los ensayos de permeación en celdas de Franz evidenciaron que la proparacaína presenta baja permeabilidad corneal (9.33×10^{-7} cm/s), favoreciendo su retención en el epitelio y limitando su difusión al estroma. Se determinó que la concentración inicial y el tiempo influyen significativamente en la cantidad permeada, con un efecto dominante del gradiente de concentración. Aunque la formulación comercial presentó diferencias en algunas dosis aplicadas, estas se atribuyen más a la concentración que a la presencia de cloruro de benzalconio (CB) como preservante en la solución oftálmica. El análisis histológico mostró que concentraciones elevadas de proparacaína causan daño corneal significativo al igual que el etanol, empleado como control positivo y clasificado como causante de irritación ocular grave. El coeficiente de correlación de Spearman ($\rho = 0.5449$, $p = 3.027 \times 10^{-16}$) confirmó una relación positiva entre la permeación y el potencial irritante. Este estudio soporta el uso de córneas porcinas y celdas de Franz como un modelo *ex vivo* eficaz para evaluar la permeación y el potencial de irritación de fármacos oftálmicos, reduciendo la dependencia de ensayos *in vivo*. Se destaca la importancia de estandarizar las pruebas *in vitro* según el tipo de tejido, ya que la córnea es más especializada que la piel y presenta características únicas que afectan la permeabilidad y la respuesta a los fármacos.

Palabras clave: clorhidrato de proparacaína, permeación corneal, irritación corneal, integridad histológica, *ex vivo,* celdas de difusión de Franz.

Abstract

Implementation of an *ex vivo* bioassay for corneal permeation and irritation: evaluation of proparacaine hydrochloride as a case study

The cornea serves as a critical barrier for ocular protection, and its damage constitutes a significant cause of blindness worldwide. The improper use of topical anesthetics such as proparacaine hydrochloride can induce severe corneal injury, underscoring the need to assess its permeability and histological impact. This study implemented an *ex vivo* assay to evaluate the permeation and irritation potential of proparacaine hydrochloride. Franz diffusion cells and porcine corneas were employed to investigate drug permeability across different concentrations. Drug quantification was performed using UV-Vis spectrophotometry. Additionally, histological analysis of the treated corneas was conducted, classifying lesions across the epithelium, stroma, and endothelium. Permeation assays using Franz cells revealed that proparacaine exhibits low corneal permeability (9.33 $x10^{-7}$ cm/s), favoring its retention in the epithelium and limiting its diffusion into the stroma. The initial concentration and exposure time were found to significantly influence the permeated amount, with the concentration gradient exerting a dominant effect. Although the commercial formulation showed variation at certain applied doses, these differences were primarily attributed to drug concentration rather than the presence of benzalkonium chloride (BAK) as a preservative in the ophthalmic solution. Histological analysis demonstrated that high concentrations of proparacaine induced significant corneal damage, comparable to ethanol, which was used as a positive control and classified as a severe ocular irritant. Spearman's correlation coefficient ($\rho = 0.5449$, $p = 3.027x\ 10^{-16}$) confirmed a positive association between drug permeation and its irritative potential. This study supports the use of porcine corneas and Franz diffusion cells as an effective *ex vivo* model for evaluating the permeation and irritation potential of ophthalmic drugs, contributing to the reduction of reliance on *in vivo* testing. The importance of standardizing *in vitro* assays according to tissue type is emphasized, given that the cornea is more specialized than the skin and possesses unique properties that influence both drug permeability and tissue response.

Keywords: proparacaine hydrochloride, corneal permeation, corneal irritation, histological integrity, *ex vivo,* Franz diffusion cells.

Contenido

Resumen VI
Abstract VII
Lista de figuras XI
Lista de tablas XIV
Lista de símbolos y abreviaturas XV
Introducción 1
Objetivos 3
Objetivo general 3
Objetivos específicos 3
Capítulo 1. Marco teórico 4
Características anatómicas e histológicas del ojo 4
Barreras oculares y su impacto en la biodisponibilidad de fármacos oculares 7
Propiedades fisicoquímicas y su relación con la permeabilidad 11
Permeación de sustancias a través de la córnea 16
Modelos preclínicos para la evaluación de permeación e irritación corneal 18
Evaluación de la permeabilidad corneal en un modelo *ex vivo* utilizando celdas de Franz 23
Irritación ocular 27
Anestésicos tópicos 31
Capítulo 2. Materiales y métodos 36
2.1 Materiales 36
2.1.1 Equipos y reactivos 36
2.1.2 Material biológico 36
2.1.3 Consideraciones éticas 37
2.2 Métodos 37
2.2.1 Recolección y transporte del globo ocular 38
2.2.3 Condiciones que afectan la permeabilidad corneal en un modelo *ex vivo* utilizando celdas de Franz 40
2.2.4 Evaluación de la permeación del clorhidrato de proparacaína 43
2.2.5 Ensayo del potencial de irritación ocular 46

2.2.6 Análisis estadístico 50
Capítulo 3. Resultados y discusión 53
3.1 Definición de las condiciones del ensayo de permeación corneal 54
Configuración del montaje 54
Velocidad de agitación y tipo de agitador 54
Temperatura 55
Frecuencia de muestreo, volumen de recolección y selección del medio de difusión 56
Evaluación histológica de la integridad corneal y definición del tiempo de experimentación 57
Solubilidad del clorhidrato de proparacaína 59
Condiciones s*ink* 60
3.2 Evaluación de permeación del clorhidrato de proparacaína 61
3.3 Lesiones histológicas asociadas al potencial irritante ocular del clorhidrato de proparacaína 69
Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones 85
4.1 Conclusiones 85
4.2 Recomendaciones 86
Anexo A: Validación parcial de la metodología analítica para la cuantificación del clorhidrato de proparacaína 88
Métodos: 88
Evaluación espectrofotométrica y control de interferencias en la cuantificación de proparacaína 88
Determinación de la longitud de onda de máxima 89
Selectividad 90
Curva de calibración 90
Rango, límite de detección y cuantificación 91
Linealidad 91
Resultados: 92
Selectividad 92
Linealidad 93
Anexo B: Análisis estadístico 97
Ensayo de permeación 97

Ensayo de irritación 99
Bibliografía 100

Lista de figuras

Figura 1. Anatomía del ojo humano (EPR, epitelio pigmentario de la retina). Fuente: (33). 4
Figura 2. Diagrama de la estructura corneal en sección transversal. Fuente: (34). 5
Figura 3. Inervación sensorial de la córnea. Fuente: (34). 6
Figura 4. Barreras oculares en la administración de fármacos (BRB, barrera hematorretiniana). Fuente: (38). 9
Figura 5. Vías de administración de fármacos. Fuente: (39). 10
Figura 6. Penetración de fármacos después de la aplicación tópica, sistémica y administración intravítrea. Las barreras oculares (BRB, barrera hematorretiniana). Fuente: (40). 11
Figura 7. Mecanismos de permeación a través del epitelio. Difusión pasiva (A), difusión facilitada (B) y por transporte activo (C). Transporte de sustancias a través del epitelio: mecanismos en membranas apical (1 y 2) y basolateral (3 y 4). Fuente: (28). 17
Figura 8. Esquema de celda de Franz. A) Celda de Franz utilizada para piel. B) Celda de Franz empleada para cornea. Fuente: (126). 24
Figura 9. Estructura química del clorhidrato de tetracaína A), clorhidrato de proparacaína B) y clorhidrato de lidocaína C). Fuente:(150). 32
Figura 10. Hallazgos clínicos comunes por el uso de anestésicos tópicos. A) y C) queratitis estromal en forma de semianillo. B) opacidad central difusa, D) defecto epitelial central Fuente:(167). 34
Figura 11. Esquema metodológico. 38
Figura 12. Proceso de disección del globo ocular. Se utilizó un ojo con más de 24 horas post mortem únicamente con fines ilustrativos. (A) Globo ocular recién extraído, sumergido en solución de PBS. (B) Ojo completo con estructuras extraorbitarias (músculos y conjuntiva). (C) Eliminación de los músculos extraoculares y la conjuntiva, exponiendo la esclera, córnea y nervio óptico. (D) Sección posterior del ojo tras la separación del nervio óptico. (E) Retiro del humor vítreo mediante incisión en la esclera. (F) Extracción cuidadosa del cristalino e iris con pinzas de disección. (G) Vista de la córnea con 4 mm de esclera circundante. (H) Preparación final compuesta por córnea y esclera, conservada en PBS a 4 °C hasta su uso experimental. Fuente: autor. 40
Figura 13. Imágenes fotográficas del montaje con el sistema de difusión y las celdas de Franz de articulación esférica utilizadas para los estudios de permeación corneal. Fuente: autor. 45
Figura 14. (A, B) Córnea humana con edema estromal (*) y edema intraepitelial (triángulo verde) debido a queratopatía retardada por gas mostaza (x400). (C) Córnea humana con tinción PAS (x400). (D) Análisis histológico de córnea porcina. Se observan artefactos en el estroma, presentes en C y D. Fuente: (192–194). 50
Figura 15. Imágenes fotográficas de muestras de ensayos preliminares de permeación corneal con fluoresceína sódica: A) velocidad de 240 rpm y temperatura de 32°C, y B) velocidad de 480 rpm y temperatura de 34°C. Fuente: autor. 56

Figura 16. Comparación histológica de córneas sometidas a diferentes condiciones. Tinción H&E. Se observa continuidad del epitelio (estrella), estroma (flecha) y del endotelio (triángulo). (A) Córnea antes del montaje en la celda de Franz y sin exposición a PBS (30 min post mortem, 5 minutos de extracción). (B) Córnea transportada en PBS con características similares a (A) (35 min post mortem, 5 minutos de extracción, 1 hora de transporte antes de la fijación en formol). (C) Córnea expuesta a PBS e incubada en celdas de Franz por 6 horas bajo las condiciones del ensayo (40 min post mortem, 5 min de extracción, 1 hora de transporte y 6 horas en las celdas antes de fijarla al formol). Los espacios interlamelares observados en el estroma se consideran normales. Fuente: autor. 58
Figura 17. Perfil de permeación clorhidrato de proparacaína en dosis infinita (activo). .. 61
Figura 18. Perfiles de permeación del clorhidrato de proparacaína a dos niveles de concentración (2,25 y 4,5 mg/mL), a partir del producto (P) y empleando al activo solo (A). 62
Figura 19. Lesiones en córnea de porcinos expuestas a diferentes sustancias. Tinción H&E Aumento 20X. (a) PBS, (b) dosis infinita, (c) producto 4.5 mg/mL (dosis de abuso), (d) Etanol. Los principales hallazgos en el epitelio son espongiosis (flecha negra), descamación (*), condensación de la cromatina (flecha blanca), edema (flecha verde). En todas las imágenes, los espacios dentro del estroma son artefactos de procesamiento (triángulo amarillo). Fuente: autor. 71
Figura 20. Comparación del estroma corneal en porcinos con PBS y dosis infinita (H&E, 10X). (A) Córnea en PBS, utilizada como control, se observan espacios interlamelares normales (EIL) (triángulo amarillo). (B) Córnea expuesta a dosis infinita, con estroma compacto y reducción EIL, sin apreciarse separación entre las lamelas de colágeno (*). Fuente: autor. 73
Figura 21. A. Córnea expuesta a etanol en donde se aprecia severo edema estromal (flecha)**. B.** Gráfico de barras de la escala de gradación según tratamiento y lesión: edema de estroma. 74
Figura 22. Gráfico de barras de conteo de células según tratamiento y lesión. Lesiones epiteliales: Ep Ed (Edema intraepitelial), Ep Es (Espongiosis), Ep Ds (Descamación), Ep Cn (Condensación de cromatina). Tratamientos: DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo), 2.25 mg/mL (Producto), EtOH (Etanol) y PBS (Control negativo). El conteo celular para cada lesión corresponde al promedio de las tres réplicas; para cada réplica se promedió la lectura hecha en los 4 campos observados.. 76
Figura 23. Gráfico de barras de la escala de gradación según tratamiento y lesión. Lesiones epiteliales: Ep Ed (Edema intraepitelial), Ep Es (Espongiosis), Ep Ds (Descamación), Ep Cn (Condensación de cromatina). Tratamientos: DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo), 2.25 mg/mL (Producto), EtOH (Etanol) y PBS (Control negativo). El grado se estimó según se indica en materiales y métodos (Tabla 3) a partir del promedio del conteo celular para cada lesión en cada tratamiento (n=3 con cuatro réplicas o campos por córnea). 77
Figura 24. Box plot del conteo de células según tipo de lesión y tratamiento. Lesiones epiteliales: Ep Ed (Edema intraepitelial), Ep Es (Espongiosis), Ep Ds (Descamación), Ep

Cn (Condensación de cromatina). Tratamientos: DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo), 2.25 mg/mL (Producto), EtOH (Etanol) y PBS (Control). Los datos representan los valores individuales obtenidos en cuatro campos de análisis por réplica, considerando el triplicado de cada tratamiento, sin promediarlos. 78
Figura 25. Box plot de la escala de gradación según tipo de lesión epitelial y tratamiento. Lesiones epiteliales: Ep Ed (Edema intraepitelial), Ep Es (Espongiosis), Ep Ds (Descamación), Ep Cn (Condensación de cromatina). Tratamientos: DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo), 2.25 mg/mL (Producto), EtOH (Etanol) y PBS (Control). Los datos representan los valores individuales obtenidos en cuatro campos de análisis por réplica, considerando el triplicado de cada tratamiento, sin promediarlos. 79
Figura 26. Mapa de calor: resultados de la prueba de Dunn para diferencias significativas entre tratamientos en el conteo de células y la escala de gradación. Los valores representan -log10(P Ajustado), donde colores más oscuros indican diferencias más significativas. Cada valor corresponde a las lecturas hechas en cada una de las córneas y representa el promedio de lectura en cuatro campos microscópicos. 80
Figura 27 Espectro UV-Vis del clorhidrato de proparacaína a 1 hora de permeación. A) Dosis infinita (activo); B) 4.5 mg/mL (producto); C) 4.5 mg/mL (activo); D) 2.25 mg/mL (producto) y E) PBS. 93
Figura 28 Curva de calibración clorhidrato de proparacaína en PBS. 93
Figura 29. Gráfico de los residuos. 95
Figura 30. Probabilidad normal. 96

Lista de tablas

Tabla 1. Criterios de irritantes oculares según la SGA. 28
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del clorhidrato de tetracaína, clorhidrato de proparacaína y clorhidrato de lidocaína. 31
Tabla 3. Lesiones histológicas y su gradación numérica. 47
Tabla 4. Parámetros de permeación. 65
Tabla 5 Niveles de la curva de calibración preparados a partir de una solución madre de concentración de 0.04 mg/mL. 91
Tabla 6. Datos para elaborar la curva de calibración del método 94
Tabla 7. Datos para el cálculo del límite de detección y cuantificación..... 94
Tabla 8. Prueba de significancia t Student para evaluar la linealidad. 94
Tabla 9. Resultados del ANOVA de medidas repetidas para la evaluación de la variable cantidad acumulada permeada en diferentes dosis. 97
Tabla 10. Resultados del ANOVA de tres vías para la evaluación de la cantidad acumulada permeada en función del tiempo (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 4 horas) y las distintas condiciones de dosificación (dosis finita, condiciones de abuso y activo a 4.5 mg/mL). . 98

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolo/ Abreviatura	Término
ANOVA	Análisis de varianza
TCA	Acido tricarboxílico
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ATP	Trifosfato de adenosina
BRB	Barrera hematorretiniana
LogS	Logaritmo de la solubilidad intrínseca
ADMET	Absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad
LogP	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua
LogD	Logaritmo del coeficiente de distribución
SGA	Sistema globalmente armonizado
OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
pH	Potencial de hidrógeno
P_{app}	Permeabilidad aparente
P_{eff}	Permeabilidad efectiva
BCOP	Permeabilidad y opacidad corneal bovina
BE-CAM	Ensayo de membrana corioalantoidea de huevo de pollo y ojo bovino
RhCE	Membrana corneal reconstituida
CAMVA	Membrana corioalantoidea vascular del embrión de pollo
HET-CAM	La prueba del huevo de gallina
Por-CORA	Ensayo de reversibilidad de la opacidad corneal porcina
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
Mg	Microgramo

cm^2	Centímetro cuadrado
h	Hora
s	Segundo
Min	Minuto
J_{SS}	Flujo en estado estacionario
TL	Tiempo de latencia
J	Flujo
Nm	Nanómetro
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observado
ICH	Conferencia internacional de armonización
UA	Unidades de absorbancia
LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
NaOH	Hidróxido de sodio
PIO	Presión intraocular
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
NBF	Formalina neutra tamponada al 10 %, sigla en ingles
Ep Ed	Edema intraepitelial
Ep Es	Espongiosis epitelial
Ep Ds	Descamación epitelial
Ep Cn	Condensación de cromatina en epitelio
Es Ed	Edema en el estroma
En Ps	Presencia de endotelio
HCE	Células epiteliales corneales humanas
HA	Humor acuoso
Qn	Cantidad acumulada permeada
CB	Cloruro de benzalconio.

Introducción

La córnea, elemento esencial en la función visual, actúa como barrera protectora frente a múltiples sustancias (1). Según la organización mundial de la salud (OMS), la ceguera corneal constituye el 5,1% de los casos de ceguera mundial, lo que resalta la necesidad de estudios que permitan entender la seguridad de compuestos químicos capaces de provocar daño irreversible (2). Estos estudios son fundamentales no solo para la evaluación de compuestos químicos (entre ellos los fármacos o ingredientes farmacéuticos activos), sino también para el desarrollo de medicamentos oftálmicos seguros y efectivos (3).

En línea con ello, la OMS también señala que las enfermedades de la córnea representan la cuarta causa de ceguera prevenible a nivel mundial (4). Esta realidad, junto con la alta prevalencia de ceguera y baja visión, subraya la importancia de impulsar investigaciones que contribuyan a reducir el impacto de estas condiciones sobre la calidad de vida (5,6). Desde una perspectiva de salud pública, resulta clave promover la estandarización y validación de metodologías *ex vivo*, que permitan garantizar la eficacia, seguridad y calidad de las formulaciones oftálmicas, facilitando su aprobación regulatoria y posterior acceso al mercado (7).

Aunque los estudios *in vivo* se destacan en la investigación preclínica ocular, sus limitaciones éticas, económicas y de reproducibilidad han impulsado el desarrollo de alternativas. Estas, además de reducir el uso de animales, ofrecen ventajas como menor variabilidad biológica y mayor estandarización (8). En este estudio se adopta el término *ex vivo* para describir el modelo empleado, dado que utiliza córneas porcinas aisladas, las cuales conservan la estructura y propiedades biológicas del tejido. A diferencia de los ensayos puramente *in vitro*, que usan membranas sintéticas o cultivos celulares, este enfoque permite evaluar la permeación del fármaco en condiciones más cercanas a la fisiología ocular (9).

Un objetivo compartido por varias organizaciones es el desarrollo de nuevas estrategias para implementar guías con metodologías *ex vivo* en la evaluación y seguridad de sustancias químicas. Estas guías han surgido como una solución para estandarizar protocolos experimentales en un contexto de regulación internacional (9). En este contexto,

las celdas de Franz emergen como una herramienta para evaluar la permeación corneal, proporcionando información clave sobre la interacción de fármacos con los tejidos oculares.

Existen varios ingredientes farmacéuticos activos (IFA) con riesgo potencial de generar toxicidad a nivel corneal, un ejemplo relevante es el clorhidrato de proparacaína, un anestésico local ampliamente utilizado en procedimientos oftálmicos (10). Aunque efectivo, su uso indebido puede generar daños severos en la córnea, como defectos epiteliales y pérdida visual. Este problema se agrava por su venta sin prescripción médica, lo que aumenta el riesgo de abuso y toxicidad (11,12). Estudios recientes han demostrado efectos citotóxicos y proapoptóticos del fármaco en modelos *in vitro* (13), pero la información sobre su permeación e impacto histológico en la córnea sigue siendo limitada (14–18).

Los estudios preclínicos oculares *in vivo*, aunque valiosos, presentan limitaciones para evaluar con precisión el papel de la córnea como barrera de penetración debido a la interacción con otros tejidos y a la dificultad para medir su permeabilidad de manera cuantitativa (19–22). A nivel internacional, organismos como la organización para la cooperación y el desarrollo económico (OCDE) y la administración de alimentos y medicamentos (FDA) han trabajado en la estandarización de metodologías para la evaluación de sustancias químicas, promoviendo el reemplazo de estudios *in vivo* por alternativas *ex vivo* (9,23,24). Sin embargo, estas guías presentan limitaciones, especialmente en el contexto de la permeación corneal, donde los estudios existentes se enfocan en mayor medida en piel o mucosa bucal (24). Esto subraya la necesidad de desarrollar y validar protocolos específicos para córneas. En Colombia, los estudios locales que emplean celdas de Franz se limitan principalmente a investigaciones desarrolladas al interior del Grupo de Investigación, en piel y boca, evidenciando una brecha en su aplicación para estudios oftálmicos (25–27).

La administración tópica de fármacos, por su naturaleza no invasiva, es la vía más utilizada en oftalmología, lo que resalta la importancia de validar protocolos de permeación e irritación corneal mediante ensayos *ex vivo*. El empleo de córneas porcinas se presenta como una alternativa eficaz debido a su similitud con la córnea humana (28–30). Dado que los cultivos y tejidos corneales humanos son de difícil acceso, este modelo de origen animal se posiciona como una opción viable y efectiva para evaluar la eficacia y seguridad

de diversas sustancias químicas, entre ellos los IFAs y los medicamentos que se desarrollen con estos (31).

En este contexto, la implementación de un ensayo *ex vivo* para analizar la permeación e irritación corneal del clorhidrato de proparacaína en celdas de Franz permite evaluar su capacidad de absorción y los daños histológicos generados, además de abordar el problema del uso indebido del medicamento en Colombia. Adicionalmente, la implementación de este ensayo pone a disposición del grupo de investigación una herramienta de evaluación para estudios similares o para el desarrollo de nuevos medicamentos de administración ocular.

Objetivos

Objetivo general

Implementar un ensayo *ex vivo* de permeación e irritación corneal, para evaluar la posible absorción y lesiones celulares, que el clorhidrato de proparacaína de aplicación tópica pudiera ocasionar.

Objetivos específicos

- Definir las condiciones metodológicas del o los ensayos *ex vivo* de permeación e irritación corneal para la evaluación del clorhidrato de proparacaína.
- Evaluar el potencial de permeación e irritación del clorhidrato de proparacaína solo y como medicamento oftálmico.

Capítulo 1. Marco teórico

Características anatómicas e histológicas del ojo

El ojo presenta una anatomía, fisiología y bioquímica compleja, lo que hace que este órgano sea altamente impenetrable para ciertos fármacos. El ojo se puede dividir en dos segmentos (Figura 1); segmento anterior, formado por la córnea, la conjuntiva, el iris, el cuerpo ciliar y el cristalino; y el segmento posterior se refiere a los dos tercios posteriores del ojo, incluida la membrana hialoidea anterior y todas las estructuras detrás de ella, como el vítreo, la retina, la coroides y el nervio óptico (32).

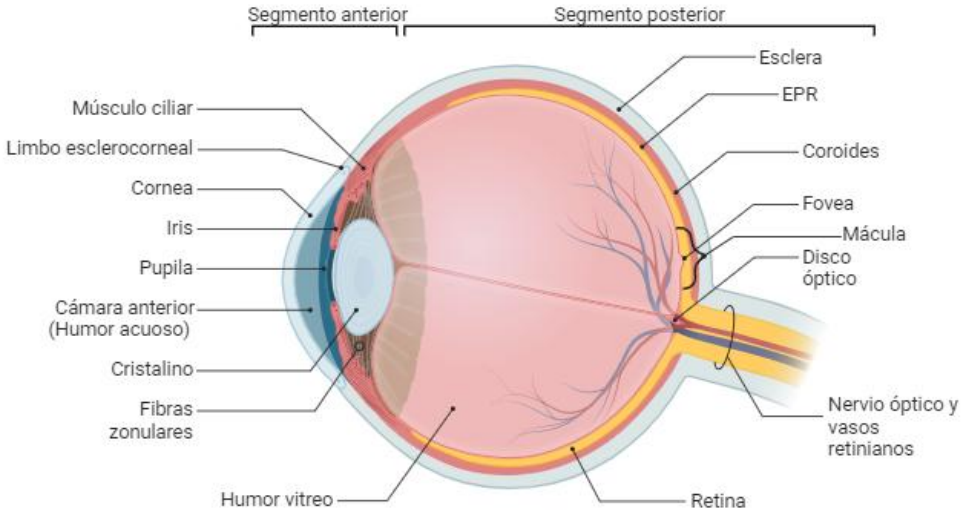

Figura 1. Anatomía del ojo humano (EPR, epitelio pigmentario de la retina). Fuente: (33).

La córnea es una estructura delgada, transparente, lisa, avascular, altamente inervada, de forma convexa y asférica, es la responsable de las tres cuartas partes del poder dióptrico del ojo. Al ser una estructura avascular, el aporte de oxígeno, nutrientes y la eliminación de productos metabólicos se realiza por medio del humor acuoso, película lagrimal y vasculatura perilímbica. El suministro de oxígeno a la córnea proviene de la atmósfera; la córnea accede a ese oxígeno por difusión a través de las lágrimas, con un gradiente de oxígeno descendente anteroposterior (34). El sustrato principal para la generación de trifosfato de adenosina (ATP) en la córnea es la glucosa, la cual ingresa desde el humor acuoso hacia el endotelio corneal. Esta glucosa se metaboliza a través de la glucólisis, el

ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la cadena transportadora de electrones. El ATP generado se utiliza localmente, aunque también puede difundirse a través del estroma hacia los queratocitos y células del epitelio corneal, siendo este último el tejido con mayor demanda energética debido a su alta actividad metabólica y regenerativa (34).a

La córnea está delimitada por el limbo esclerocorneal, el cual se encuentra vascularizado; además de servir de reservorio para albergar a las células madre pluripotentes, la córnea continua con la esclera y conjuntiva (1). La córnea se compone de cinco capas: epitelio corneal, capa de Bowman, estroma, membrana de Descement y endotelio, las cuales se diferencian no solo por su anatomía sino también por su función (Figura 2). El espesor corneal va aumentando a medida que se acerca a la periferia; en la zona central el espesor es de 540-560 nm y en la periferia de 660-700 nm (34).

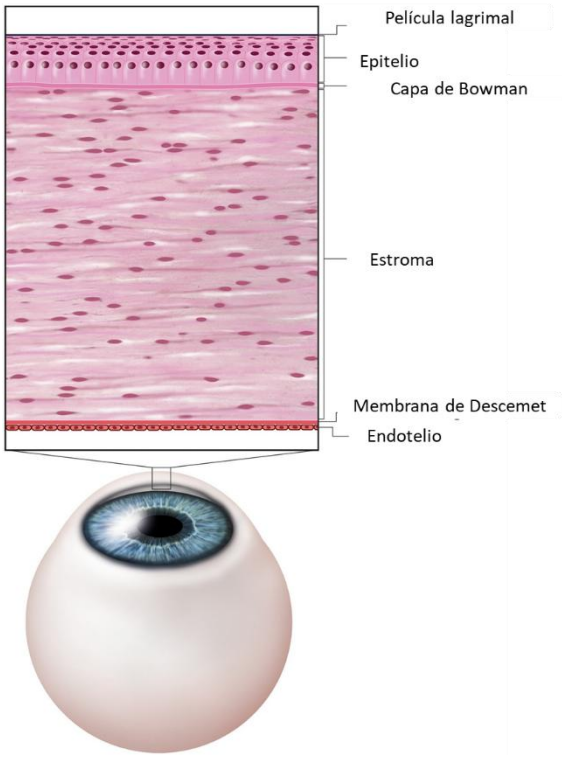

Figura 2. Diagrama de la estructura corneal en sección transversal. Fuente: (34).

El epitelio corneal está formado por cinco o seis capas de células epiteliales no queratinizadas, estratificadas y escamosas. Las diferentes capas epiteliales de la córnea incluyen dos o tres capas de células superficiales y aladas, y una sola capa de células basales. El epitelio corneal es una estructura compacta sin espacios intercelulares ni

interdigitaciones entre las células. Las superficies celulares están conectadas por uniones desmosómicas. Las funciones clave del epitelio corneal son: protección radiológica, filtrando la radiación ultravioleta; estabilización de las lágrimas, mediante microvellosidades que ayudan a mantener la película lagrimal; barrera protectora, con uniones estrechas que bloquean el paso de líquidos y microorganismos, y producción de moco a través del glicocáliz (34).

Las células epiteliales superficiales son las únicas células de la córnea que se renuevan, esto gracias a las células madre pluripotentes ubicadas en el limbo corneoescleral; esto sucede cada 7-10 días. El estroma corneal se intercala entre la capa de Bowman y la membrana de Descemet y representa el 95% del grosor corneal. El estroma consiste en queratocitos, células fibroblásticas, tejido neural y células de Schwann. Esta capa no es regenerativa. La membrana de Descemet es la membrana basal del endotelio corneal. Contiene fibrillas de colágeno y tiene una textura amorfa y acelular. El endotelio corneal es la monocapa más interna de células hexagonales, está en contacto directo con el humor acuoso y presenta una bomba metabólica activa que extrae el agua del estroma para mantener la transparencia (35).

Los nervios sensoriales en el epitelio corneal ingresan como axones desnudos, tras desprenderse de las células de Schwann. La mayoría viaja entre los pliegues del plasmalema de las células basales, y algunas proyecciones se extienden hacia la superficie ocular (Figura 3). La córnea es uno de los tejidos más inervados, con unos 7000 nociceptores por mm², principalmente derivados del nervio trigémino (34).

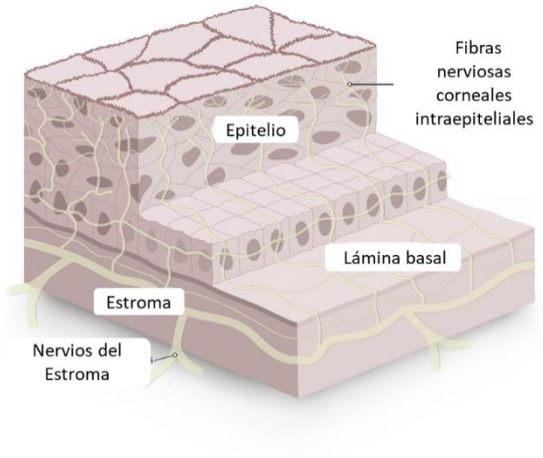

Figura 3. Inervación sensorial de la córnea. Fuente: (34).

La inervación sensorial juega un papel crucial en la regulación de la producción de lágrimas. Las neuronas aferentes del nervio trigémino, presentes en la córnea y los párpados, captan información sensorial en respuesta a cambios de temperatura y a estímulos nocivos mediante mecanorreceptores, receptores polimodales y receptores de frío. Esta activación desencadena reflejos tanto autónomos como somáticos, que incluyen un aumento en la producción de lágrimas y el reflejo de parpadeo (34).

En cuanto al resto de estructuras que componen el segmento anterior del ojo está la conjuntiva, una membrana mucosa transparente que recubre el ojo, está muy vascularizada y gracias a esto contribuye al drenaje de sustancias a la circulación sistémica; también presenta una amplia red linfática, tiene función de protección y media en la inmunidad pasiva y activa. El iris está ubicado en la región posterior de la córnea y aparece como una raíz del cuerpo ciliar; el iris permite la formación de una abertura llamada pupila encargada de regular la cantidad de luz que pasa a través de la retina. El cuerpo ciliar es el encargado de controlar la entrada y salida del humor acuoso. La zona de las fibras zonulares ubicada en el cuerpo ciliar se encarga del enfoque de objetos. El cristalino es transparente, avascular, no inervado y biconvexo. Su función es regular el intercambio pasivo de sustratos metabólicos y desechos a través de una difusión simple; además, controla la entrada de luz en el ojo y su refracción (34).

Barreras oculares y su impacto en la biodisponibilidad de fármacos oculares

La baja biodisponibilidad ocular y la compleja farmacocinética de los fármacos se deben en gran parte a las barreras oculares. La biodisponibilidad ocular se ve influenciada por varios factores que están relacionados con las propiedades fisicoquímicas del IFA y la complejidad de las estructuras oculares, como: drenaje de la película lagrimal, absorción sistémica del activo, permeación, presencia de conservantes, unión del fármaco a la melanina y a las proteínas de la lágrima, barreras oculares, metabolismo, entre otros, todos en conjunto van a dar como resultado un 5-10% de biodisponibilidad total del IFA (3,32,36,37).

Suponiendo que un medicamento se administre por vía tópica ocular, su instilación inadecuada y un mal cierre de los puntos lagrimales pueden disminuir el volumen instilado.

Desde el momento en que el IFA entra en contacto con el ojo, el parpadeo reflejo, la unión del fármaco a las proteínas de la película lagrimal, el conducto nasolagrimal, va a provocar que una buena parte del volumen instalado sea excretado, además del drenaje de la conjuntiva debido a la presencia de capilares sanguíneos y linfáticos conjuntivales, que pueden causar una pérdida significativa del fármaco en la circulación sistémica; la velocidad del drenaje depende de la viscosidad, potencial de hidrógeno (pH), conservantes y tonicidad del medicamento que debe ser igual al del ojo, para no provocar un exceso, disminución de secreción de la lágrima o una alteración en la permanencia en el tejido (3,32,36,37).

Una vez que el fármaco ingresa, intenta permear las barreras anatómicas, ya sea por vía corneal o conjuntival, dependiendo de su solubilidad. Si el fármaco pasa a la cámara anterior, el flujo y drenaje del humor acuoso, además de las enzimas metabolizadoras y bombas de salida que tienen los tejidos oculares, va a seguir influyendo y disminuyendo la biodisponibilidad. Por otro lado, la unión del fármaco a la melanina afecta su respuesta, la toxicidad y la duración de la actividad, que puede deberse a su distribución y retención en los tejidos oculares pigmentados (3,32,36,37).

La farmacocinética ocular presenta varias limitaciones, principalmente debido a la complejidad de analizar y extraer muestras *in vivo* de los fluidos intraoculares. Por esta razón, la aprobación de nuevas moléculas de aplicación oftálmicas suele basarse en estudios preclínicos en animales y modelos farmacodinámicos. En términos de farmacocinética por compartimentos, cada estructura del ojo puede considerarse un compartimento independiente, separado por barreras anatómicas y bioquímicas, lo que refleja la diversidad estructural y funcional de los tejidos oculares (3).

Las barreras oculares se pueden dividir según su ubicación y la naturaleza del tejido. Su función es impedir el acceso de diferentes sustancias químicas, tóxicas y/o agentes terapéuticos a su sitio de acción (Figura 4). En el segmento anterior existen varios tipos de barreras: la película lagrimal, compuesta por una estructura lípido-acuosa-mucina, con una eliminación constante; parpadeo reflejo, que puede aumentar o disminuir según el pH o tonicidad del medicamento o frente a la presencia de una alteración palpebral; la córnea como barrera principal estática de moléculas hidrofílicas; y la barrera hematoacuosa que se compone de uniones estrechas de epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar y del iris, y vasos sanguíneos del círculo arterial mayor (36).

En el segmento posterior, el vítreo presenta componentes bioquímicos que afectan la tasa de movimiento de las moléculas a través del tejido para llegar a la retina; además, los cambios estructurales relacionados con la edad y la presencia de inflamación también pueden tener un efecto sobre dicho movimiento. El epitelio pigmentario de la retina y el endotelio retiniano forman la barrera hematorretiniana (BRB, por sus siglas en inglés). Estas estructuras presentan uniones estrechas que disminuyen la permeación para las sustancias hidrófilas. La BRB tiene características similares a las de la barrera hematoencefálica; el transporte de las sustancias en su mayoría está mediado por transportadores de membranas, lo que dificulta el paso de sustancias por su compleja estructura (36).

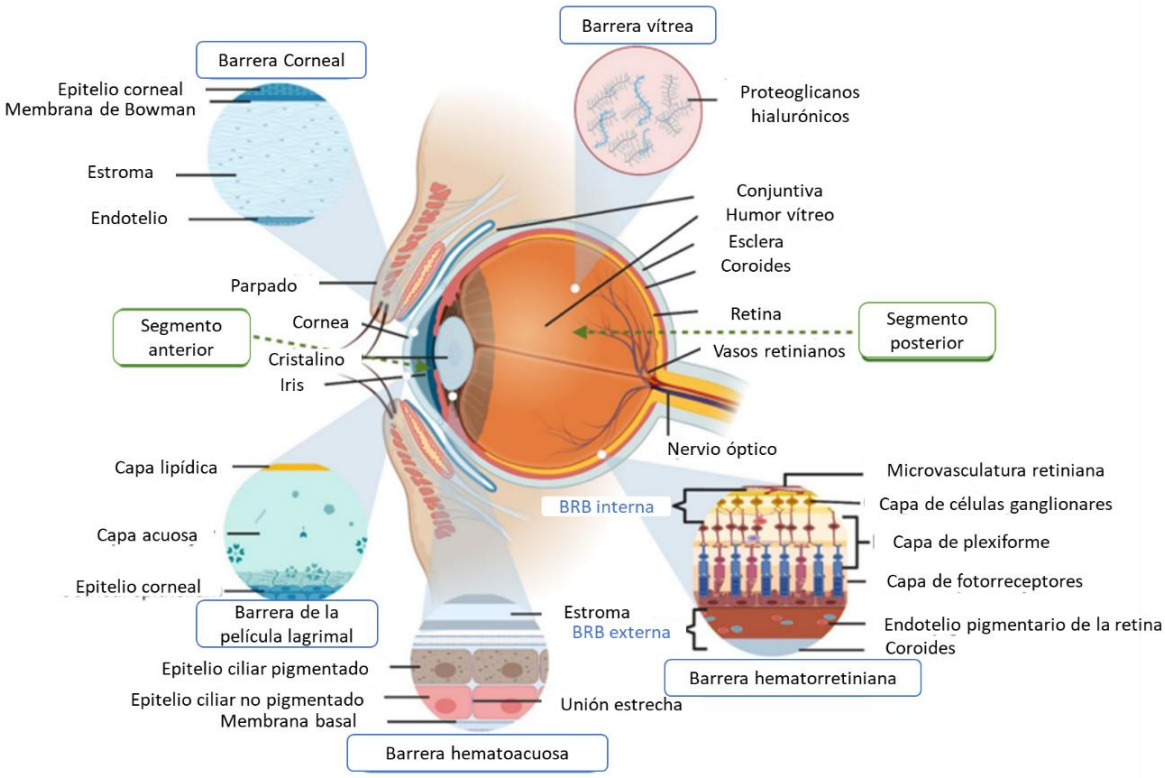

Figura 4. Barreras oculares en la administración de fármacos (BRB, barrera hematorretiniana). Fuente: (38).

Comprender la farmacología ocular, los mecanismos moleculares y las interacciones de los fármacos con las membranas ha permitido el desarrollo de nuevas vías de administración. Estas surgen a partir de la baja biodisponibilidad de muchas moléculas ocasionadas por las barreras oculares y las características fisicoquímicas propias del compuesto (Figura 5) (37).

En el segmento anterior, las vías de administración se dividen según el tejido blanco que quieren penetrar: administración tópica, subconjuntival, intraestromal e intracameral, siendo la vía tópica la más utilizada por su autoadministración no invasiva y buena adherencia reportada. Por otro lado, en el segmento posterior se destaca la vía intravítrea y subretiniana para tratar enfermedades de retina y vítreo, permitiendo así el uso de sustancias con un tamaño molecular grande, volúmenes altos, disminución de efectos secundarios en tejidos no diana y la introducción de moléculas poco permeables (37).

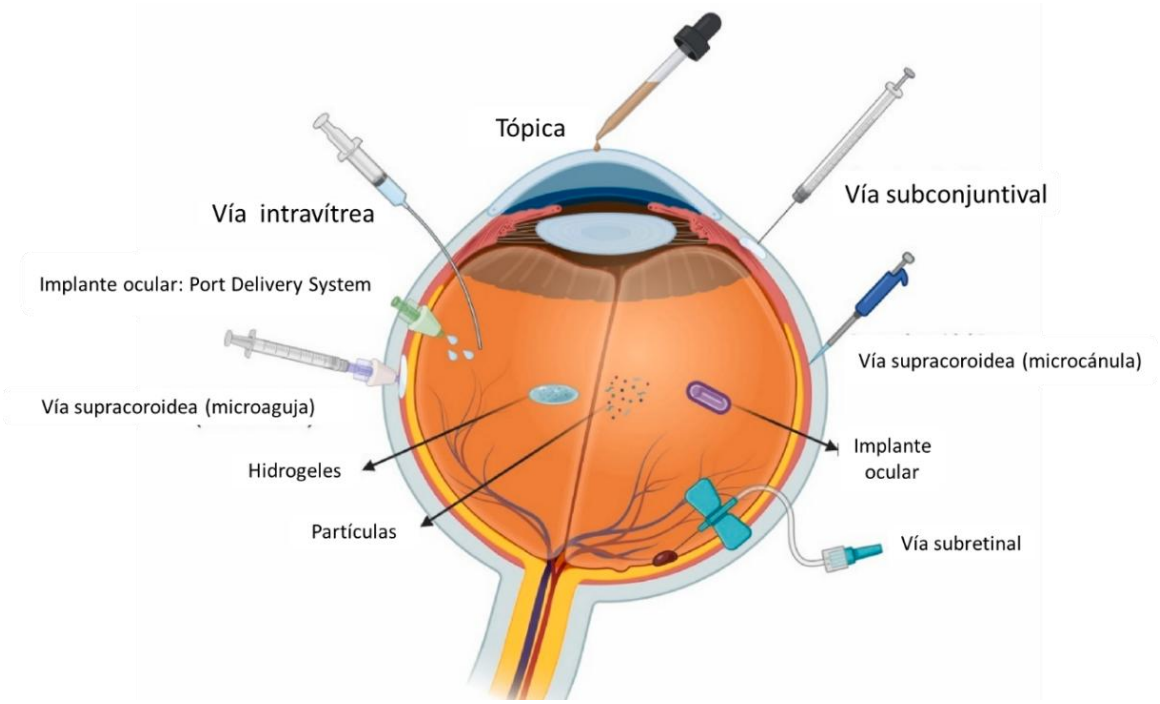

Figura 5. Vías de administración de fármacos. Fuente: (39).

La penetración del fármaco a través de los tejidos oculares después de la administración tópica puede seguir el camino corneal o conjuntival, dependiendo de la solubilidad o el tamaño de partícula (40). El recorrido de la sustancia a través de la córnea hasta la circulación sistémica se evidencia en la Figura 6.

Por otra parte, el que un fármaco alcance una diana terapéutica a nivel oftálmico, mediante una administración sistémica, ya sea por vía oral o intravenosa, tiene como inconveniente que se requerirían concentraciones muy elevadas para alcanzar un efecto terapéutico, y solo una pequeña fracción del fármaco alcanzaría los tejidos oculares debido a la presencia de la barrera hematorretiniana que, como se mencionó, presenta una estructura con

uniones estrechas que impiden el paso de sustancias por difusión; estos altos niveles de concentración pueden ocasionar efectos tóxicos. La otra alternativa, la administración intravítrea, presenta desventajas por su naturaleza invasiva como desprendimiento de retina, hemorragia vítrea, cataratas, elevación de la presión y toxicidad ocular. Esto hace que la administración tópica sea la vía de preferencia. En este contexto, en el presente estudio se pretende simular mediante un ensayo *ex vivo* la administración tópica (37).

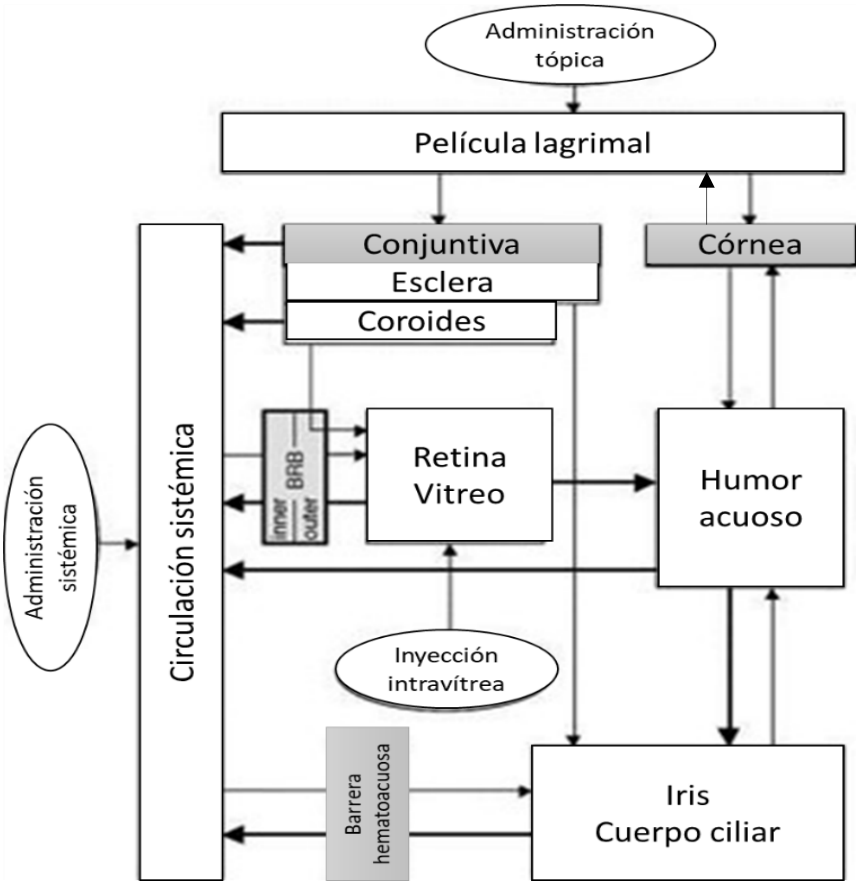

Figura 6. Penetración de fármacos después de la aplicación tópica, sistémica y administración intravítrea. Las barreras oculares (BRB, barrera hematorretiniana). Fuente: (40).

Propiedades fisicoquímicas y su relación con la permeabilidad

La solubilidad de una sustancia en un disolvente se refiere a la concentración máxima de soluto que puede disolverse bajo condiciones específicas de temperatura, presión y composición del disolvente. En otras palabras, corresponde a la concentración del soluto

en la solución en equilibrio con el soluto en exceso, y se puede determinar cuantificando la concentración en el sobrenadante, en la condición de equilibrio señalada. Por su parte, cuando la concentración del soluto supera este límite de solubilidad, se produce un estado de sobresaturación. Esta condición es termodinámicamente inestable y constituye el principal impulsor del proceso de cristalización, ya que es necesario alcanzar cierto grado de sobresaturación para que se inicie la formación de una fase sólida a partir de una solución previamente saturada (41).

En este contexto, es importante diferenciar entre la solubilidad intrínseca (So) y la solubilidad aparente, ya que modificar el pH puede mejorar la solubilidad, y por consiguiente la permeabilidad de una sustancia. La solubilidad intrínseca se refiere a la capacidad de disolución del fármaco en su forma original, sin disociar, mientras que la solubilidad aparente incluye la forma disociada del fármaco, que puede estar influenciada por factores como el pH del medio (42,43).

Aunque la solubilidad no depende de factores cinéticos, como el tamaño de las partículas, la disolución, que es el proceso mediante el cual un soluto se convierte en una solución, sí lo hace. Esto es crucial, ya que tanto la solubilidad como la velocidad de disolución tienen un impacto directo en la biodisponibilidad del fármaco, es decir, en la cantidad y la rapidez con que el fármaco es absorbido por la córnea (42,43).

Según la definición de la OMS sobre la absorción, acogida por el comité científico de seguridad del consumidor (SCCS) adaptándola al contexto ocular, la permeabilidad corneal se refiere a la capacidad de las sustancias para atravesar la córnea. Este concepto se puede desglosar en términos específicos: la penetración implica la entrada de una sustancia en el epitelio corneal. En contraste, la permeación involucra que la sustancia no solo ingresa a una capa, sino que se desplaza de manera continua hacia una segunda capa que presenta diferencias funcionales y estructurales con respecto a la primera, es decir el estroma o endotelio corneal (44). Finalmente, la absorción se entiende como el proceso completo que incluye la penetración, la permeación y la posterior llegada del compuesto a los tejidos internos. Es decir, implica que una sustancia atraviesa todas las capas de la córnea y alcanza los tejidos oculares internos, donde puede ejercer un efecto biológico (45).

La interacción entre disolución, solubilidad y permeabilidad es clave en la formulación y desempeño de los medicamentos. La solubilidad determina la cantidad de fármaco que puede disolverse en un volumen determinado de medio antes de atravesar una barrera biológica; como se mencionó, el proceso mediante el cual el IFA entra en solución en ese medio biológico es lo que se refiere a la disolución, mientras la permeabilidad es la propiedad fisicoquímica intrínseca de un IFA, que está asociada con su capacidad de atravesar membranas biológicas y el proceso de permeación se relaciona con la velocidad y el grado con el que el fármaco atraviesa estas barreras biológicas (46). Estos procesos son determinantes para la biodisponibilidad (47).

Un fármaco altamente soluble, pero con baja permeabilidad, puede disolverse rápidamente en un medio acuoso, como el agua, lo que facilita su disponibilidad, pero no logra atravesar de manera eficaz las barreras biológicas, limitando su efectividad. Por el contrario, un fármaco con alta permeabilidad, pero baja solubilidad por la falta de disolución adecuada en el medio acuoso impediría que las moléculas estén disponibles para atravesar dichas barreras, lo que comprometería su capacidad para alcanzar concentraciones terapéuticas efectivas. Por ello, es esencial lograr un equilibrio entre estas propiedades para garantizar que el fármaco sea absorbido y genere un efecto terapéutico; además, las propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad) también dependen de este equilibrio (46).

El potencial de absorción corneal de fármacos que se transportan principalmente por difusión pasiva se puede predecir a partir de propiedades moleculares, como el área de superficie polar, los enlaces de hidrógeno, el coeficiente de reparto octanol-agua (log P), el coeficiente de distribución (log D), el pKa y el peso molecular (47).

El log P es el coeficiente de reparto verdadero octanol-agua, que evalúa la lipofilia intrínseca de una sustancia considerando únicamente su especie no disociada, es decir, sin incluir el efecto de la ionización. Por otro lado, el log D se refiere al coeficiente de reparto aparente, que depende del pH del medio y puede incluir la contribución de especies ionizadas u otros factores, como el empleo de solventes diferentes al octanol. Ambos coeficientes reflejan la lipofilicidad de una sustancia; un log P elevado indica una mayor afinidad por los lípidos, lo que sugiere que es más probable que el compuesto permanezca en las capas lipídicas en lugar de difundirse al medio acuoso (47).

El Log D es un determinante crucial en la permeabilidad corneal de los fármacos, ya que su incremento mejora notablemente la capacidad del fármaco para atravesar las distintas capas de la córnea. Aunque el endotelio es una capa delgada, su permeabilidad depende tanto del tamaño molecular del fármaco como de su coeficiente de distribución. La principal ruta de entrada de los fármacos a través de la córnea es mediante difusión pasiva a través del camino transcelular, donde el coeficiente de reparto y distribución es esencial. En cambio, el transporte paracelular es limitado debido a las uniones estrechas entre las células epiteliales de la córnea (48).

Tanto el log P como el log D, según corresponda, son parámetros fisicoquímicos fundamentales que influyen directamente en la permeabilidad de un IFA. Estos coeficientes determinan la capacidad del compuesto para atravesar las distintas barreras lipídicas y acuosas de la córnea, modulando su absorción a nivel ocular. Un equilibrio adecuado entre lipofilia e hidrofilia, reflejado en estos valores, es esencial para optimizar el paso del fármaco (48).

La permeabilidad aparente (P_{app}) se determina en sistemas *in vitro;* suele depender de la concentración inicial del compartimento donante y el área de exposición. Refleja la permeabilidad en condiciones experimentales específicas y es útil para predecir la absorción en etapas tempranas del desarrollo de fármacos y medicamentos. Por otro lado, la permeabilidad efectiva (P_{eff}) se mide en condiciones *in vivo* y tiene en cuenta factores fisiológicos, como el flujo sanguíneo y las condiciones del entorno biológico, lo que la convierte en una estimación más precisa de la permeabilidad en situaciones reales. Las propiedades fisicoquímicas del fármaco, como su lipofilia (log P o log D), tamaño molecular, polaridad, afectan tanto a la P_{app} como a la P_{eff} (47).

El pKa del fármaco es otro parámetro físicoquímico que influye significativamente en el comportamiento de penetración corneal, que depende de su equilibrio de ionización. Las formas no ionizadas son generalmente más lipófilas, lo que les permite atravesar más fácilmente las membranas lipídicas de la córnea (49). Las variaciones en el pH van a influir en la ionización de los compuestos tipo electrolitos débiles, como son la mayoría de los activos administrados por vía tópica ocular, afectando su capacidad de penetrar las membranas (50).

La mayoría de los fármacos oftálmicos tópicos tienen un peso molecular bajo (menos de 500 Da), lo que facilita su paso a través de la córnea. La penetración ocular también aumenta al incrementar la concentración del fármaco en la solución oftálmica. Sin embargo, concentraciones excesivamente altas pueden elevar la osmolaridad, atrayendo líquido a través de la conjuntiva, diluyendo el fármaco en la película lagrimal (51).

Si se considera al medicamento que va a ser administrado tópicamente por vía ocular, además de las propiedades fisicoquímicas mencionadas relacionadas con el fármaco, van a tener influencia parámetros asociados a la formulación como son el pH, la tonicidad, la capacidad humectante, la estabilidad y la viscosidad, las cuales juegan un papel importante en la disponibilidad y penetración del IFA a través de la córnea (52). Soluciones oftálmicas con un pH muy diferente al de la película lagrimal (7.4) puede desencadenar una producción excesiva de lágrimas, especialmente si la capacidad reguladora del producto es superior a la fisiológica. La capacidad reguladora, determinada por la fuerza del buffer de la solución, influye en cómo el pH del producto se ajusta al del medio fisiológico. Por ejemplo, aunque el pH del producto sea tan bajo como 4.5, si su capacidad reguladora es inferior a la de la película lagrimal, el pH del producto tenderá a adaptarse al del medio lagrimal, minimizando la irritación. De manera similar, el manejo de la tonicidad es crucial, ya que las soluciones oftálmicas deben ser isotónicas con el líquido lagrimal para evitar una producción excesiva de lágrimas que pueda aumentar la pérdida del fármaco por dilución (50).

Se han empleado diversas estrategias para mejorar el tiempo de contacto del IFA con la córnea con la finalidad de aumentar su penetración ocular, partiendo desde lo convencional que es el ligero aumento de la viscosidad de soluciones y suspensiones mediante la adición de polímeros hidrófilos, pasando por el empleo de geles y ungüentos, hasta el desarrollo de sistemas de liberación modificada. Ejemplos de estos últimos sistemas, que generalmente son de tipo mucoadhesivo, son los lentes de contacto, insertos hidrófilos y la incorporación del fármaco en sistemas tipo reservorio con polímeros o fosfolípidos (liposomas) (39). Este tipo de estrategias permiten mediante diferentes mecanismos una permanencia del IFA en la zona y, por consiguiente, una eliminación más lenta por el drenaje lagrimal (51).

Adicionalmente, en la formulación de este tipo de medicamentos de administración por vía ocular, se pueden emplear potenciadores de la permeabilidad como son los tensioactivos, ácidos biliares y agentes quelantes, para mejorar la penetración corneal (39).

Permeación de sustancias a través de la córnea

La permeación de fármacos a través de la córnea es un proceso crucial para la administración ocular de medicamentos. Este proceso está determinado por varios factores: el tiempo de contacto del fármaco con la superficie ocular, las características fisicoquímicas del fármaco, entre las que se destaca la capacidad del fármaco para penetrar las barreras corneales y los factores asociados con el medicamento. La película lagrimal y las tres capas principales de la córnea, el epitelio, el estroma y el endotelio, desempeñan papeles importantes en este proceso, siendo el epitelio corneal la principal barrera con mayor resistencia a la difusión (28).

Los fármacos pueden atravesar el epitelio corneal a través de dos vías principales: la vía transcelular y la vía paracelular. La vía transcelular involucra el paso del fármaco a través del epitelio, el estroma y el endotelio, que presentan diferentes características. El epitelio y el endotelio son estructuras lipofílicas, permitiendo la permeabilidad para fármacos no polares y lipofílicos, mientras que el estroma y su estructura hidrofílica, que es crucial para el paso de moléculas polares de bajo peso molecular. Por otro lado, la vía paracelular está restringida por las uniones estrechas entre las células epiteliales, limitando la permeación de compuestos hidrofílicos grandes (53,54).

Una vez que las moléculas han penetrado en la córnea, pueden ser permeadas mediante diferentes mecanismos: difusión pasiva, difusión facilitada y transporte activo (Figura 7). La difusión pasiva depende exclusivamente del gradiente de concentración y las propiedades fisicoquímicas del fármaco, como ya fue discutido. La difusión facilitada y el transporte activo, por su parte, requieren la presencia de transportadores específicos en el epitelio corneal, los cuales permiten el paso de ciertos fármacos a través de mecanismos más especializados (28).

El epitelio corneal representa una barrera estática para las moléculas hidrofílicas de mayor tamaño, mientras que actúa como un depósito temporal para las moléculas lipofílicas más pequeñas, permitiendo que estas últimas se difundan de manera más eficiente, esto debido

a los estrechos espacios intercelulares del epitelio. La penetración de fármacos hidrofílicos es un proceso combinado, que involucra tanto la difusión pasiva como el transporte activo a través de los transportadores de membrana. Estos transportadores corneales incluyen aquellos que regulan el paso de aminoácidos, oligopéptidos, neurotransmisores, nucleósidos y aniones orgánicos, además de transportadores de eflujo que expulsan compuestos fuera de las células (28).

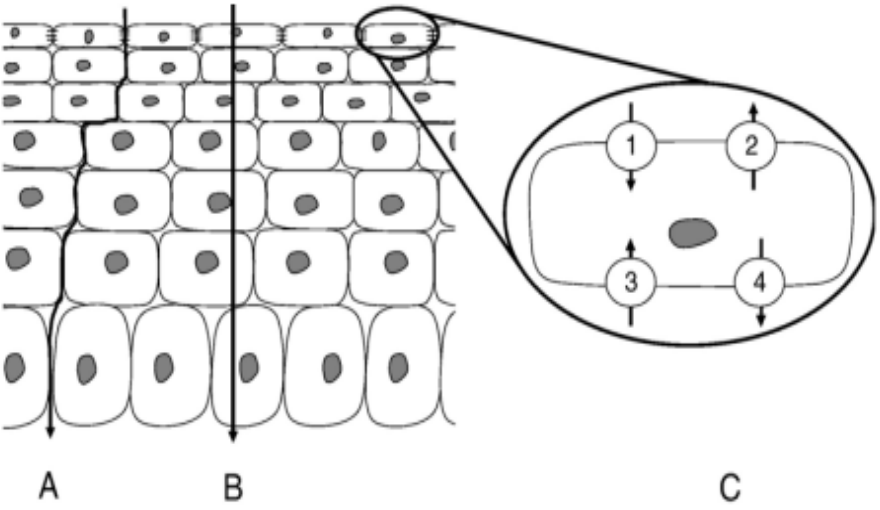

Figura 7. Mecanismos de permeación a través del epitelio. Difusión pasiva (A), difusión facilitada (B) y por transporte activo (C). Transporte de sustancias a través del epitelio: mecanismos en membranas apical (1 y 2) y basolateral (3 y 4). Fuente: (28).

Aunque el ojo posee una capacidad metabólica relativamente baja en comparación con otros órganos, esta capacidad cumple un papel fundamental en la inactivación y bioactivación de ciertas moléculas. Las actividades metabólicas más notables ocurren en las estructuras adyacentes a la úvea, pero la córnea también participa en la actividad metabólica de las fases I y II, lo que puede influir en la eficacia de la permeación de ciertos fármacos (55).

La permeabilidad de la córnea es generalmente baja, con rangos entre 10^{-7}-10^{-5} cm/s, lo que contribuye a la baja biodisponibilidad ocular de los fármacos tópicos, típicamente inferior al 5%. La lipofilia óptima para la permeación corneal corresponde a valores de LogD de 2-3. Los compuestos con LogD mayor de 3, tienen menor permeabilidad, porque su desorción del epitelio lipofílico al estroma hidrofílico se ralentiza por su alto coeficiente de reparto lípidos/agua (28).

La cinética de permeación corneal hace referencia al proceso a través del cual los fármacos incluidos en los medicamentos suministrados tópicamente penetran la córnea para alcanzar la cámara anterior del ojo. Para simular este proceso, usualmente se emplean modelos farmacocinéticos compartimentales, que ilustran cada tejido ocular como un compartimento distinto, lo que posibilita el análisis de la absorción y difusión del fármaco a través de las barreras oculares. Los modelos matemáticos que incluyen parámetros como la lipofilicidad, el tamaño molecular y entre otros, proporcionan predicciones más precisas sobre la biodisponibilidad de los fármacos, mejorando así el desarrollo de formulaciones. En el desarrollo de formulaciones oculares, se tiene en cuenta que sistemas de administración basados en nanotecnología, como micelas, nanopartículas y liposomas, ofrecen soluciones prometedoras para mejorar la biodisponibilidad ocular (56).

Además de los factores intrínsecos del fármaco, los relacionados con el medicamento y las características estructurales del tejido, la permeación también se ve influenciada por factores biológicos. En adultos, los cambios en la densidad endotelial y los queratocitos estromales de la córnea afectan su permeabilidad y la transparencia del tejido es esencial para permitir el paso de moléculas. Además, enfermedades como la queratitis, el ojo seco o daños estructurales en la córnea pueden alterar la permeabilidad (57).

Modelos preclínicos para la evaluación de permeación e irritación corneal

Existe una gran variedad de modelos utilizados en la evaluación de la permeación corneal; estos también pueden ser útiles en la predicción de la biodisponibilidad de la sustancia en el humor acuoso, después de la aplicación tópica. Los modelos *in vivo* se basan en la administración de la sustancia en organismos vivos y la posterior evaluación del humor acuoso tras la eutanasia del animal. Los modelos *in vitro* emplean cultivos celulares, sistemas de membranas sintéticas o estructuras generadas mediante bioimpresión 3D. En cambio, los modelos *ex vivo* utilizan tejidos biológicos aislados, como córneas de origen animal, que conservan la arquitectura permitiendo una evaluación más representativa sin recurrir al uso de animales vivos. La mayoría de estos modelos usan cámaras o celdas de difusión, ya sea en modo vertical u horizontal (31,58).

Se considera que el uso de cultivos celulares es más útil para la evaluación de citotoxicidad, ya que no representan todo el tejido corneal, lo que limita la funcionalidad como barrera, además de requerir mucho tiempo para generar resultados significativos. Por otro lado, se ha demostrado que los modelos *ex vivo* son útiles como *screening*, debido a que presentan toda la membrana corneal, incluyendo enzimas metabolizadoras de fármacos y transportadores activos, dando un acercamiento más preciso de la permeación de sustancias a través de la membrana (55). El modelo *ex vivo* involucra tejidos oculares aislados de bovinos, cerdos, conejos y pollos; la selección depende de los objetivos del estudio, ya que cada animal presenta diferentes características anatómicas. Estos modelos implican el uso de ojos enucleados mientras el órgano aislado mantenga sus funciones bioquímicas y fisiológicas, y en ocasiones se complementan las mediciones cuantitativas de la permeabilidad de las sustancias con el análisis histológico (31,58).

El primer estudio de permeación corneal se llevó a cabo en 1951 por Maurice; en su investigación realizó una serie de experimentos en animales aplicando sustancias por vía tópica, intravenosa e intracameral, seguida de una recolección de muestras de sangre y humor acuoso en diferentes momentos y una valoración ocular durante el experimento, además de la valoración *post mortem* de la córnea y el humor acuoso. Después de la recolección del humor acuoso y la córnea, esta última se escindió, se secó, se pesó y se analizó en la forma habitual (59).

Maurice tuvo varias contribuciones en la época que permitieron dilucidar el metabolismo, transporte de sustancias y la presión de imbibición de la córnea, entre otras temáticas, las cuales fueron útiles para mejorar el diseño de técnicas *in vitro* de permeación por medio de cámaras de perfusión (60–62). La presión de imbibición es importante para el mantenimiento del espesor y la hidratación adecuada de la córnea, la cual está mediada por el metabolismo corneal; un estudio de Maurice permitió comprender que la presión de imbibición se regulaba por medio de la eliminación de sustancias mediadas por el transporte activo ubicado en el endotelio corneal (60). En adición a lo anterior, Maurice diseño un instrumento simple y económico para medir el grosor de la córnea, útil en el análisis de investigaciones posteriores (63).

El objetivo principal de la permeación corneal en un modelo *ex vivo* es proporcionar un entorno controlado similar al fisiológico para estudiar la función y la respuesta de los tejidos o células. Las cámaras de perfusión fueron la primera técnica utilizada; estas permiten la

evaluación de diversos parámetros como la absorción de sustancias, actividad metabólica, liberación de moléculas o la respuesta a diferentes estímulos. El principio fisiológico de las cámaras es mantener una perfusión continua del tejido con un medio líquido que asegura un suministro adecuado de nutrientes, oxígeno y eliminación de desechos; estas cámaras están diseñadas con dos compartimentos separados por una membrana. Las cámaras de perfusión cumplen ciertas condiciones para garantizar resultados reproducibles, como flujo constante, temperatura, pH, estabilidad, esterilidad, concentraciones y equilibrio de gases. El equilibrio de gases se hace por medio de un suministro de CO_2 y O_2, esto con el fin de mantener una función metabólica más precisa por más tiempo. Desde 1959, las primeras investigaciones en cámaras de perfusión buscaban validar esta metodología, buscando medios líquidos que demostraran resultados más reproducibles y que conservaran el tejido por más tiempo, además de dilucidar la permeabilidad de sustancias y sus rutas de penetración (64–66).

Maurice en 1967 también tuvo contribuciones importantes en el uso de la fluoresceína para estudiar la dinámica del movimiento de los colorantes y su penetración en diferentes estructuras oculares, utilizada más adelante en irritación corneal para evaluar citotoxicidad corneal. Maurice menciona que el valor de la permeabilidad del epitelio y endotelio corneal puede calcularse a partir de la cantidad que entra en la cámara anterior (67).

En 1975, el científico Franz incursionó con el diseño y uso de celdas de difusión para estudiar la permeación de sustancias a través de la piel. Esta técnica se utiliza en la actualidad para determinar la permeabilidad de fármacos, y el desarrollo de nuevas formulaciones empleando diferentes membranas (68). De igual forma, Franz estableció las ventajas del diseño experimental basado en dosis finitas para estandarizar de forma precisa y fácil la cantidad de compuesto aplicado en piel, lo que permite una reproducibilidad del experimento (69).

El primer uso de las celdas de Franz con tejido ocular fueron estudios de liberación de fármacos (70). En 2001 se hicieron los primeros estudios de permeación corneal utilizando celdas de Franz modificadas. Estos estudios mostraron resultados prometedores para determinar la velocidad y la cantidad de sustancia que atraviesa la córnea, y además permitieron la validación y difusión de la técnica (71,72). En la actualidad existe una robusta literatura científica y amplio uso de estas celdas en permeabilidad corneal en un modelo *ex vivo* (53,71,73–97).

Por otro lado, la prueba de irritación ocular es un requisito de seguridad para todos los productos químicos que puedan estar en contacto con el ojo; estas pruebas se realizan para determinar si una sustancia puede causar daño irreversible o irritación en la córnea y demás estructuras, siendo la córnea el principal objetivo por su relevancia clínica. La prueba de irritación ocular es ampliamente utilizada por la industria, ya que son requeridas por las agencias regulatorias para la comercialización de muchas sustancias químicas; estas pruebas también son útiles para la formulación de nuevos productos con un enfoque más seguro (98).

El primer método estandarizado por la FDA de irritación ocular *in vivo* fue publicado en 1944 por Draize et al (99). La evaluación de la irritación ocular empezó con la prueba de Draize, una prueba *in vivo* en conejos aprobada por la FDA en 1944, donde se exponía a un grupo de animales a la sustancia de interés; actualmente está prueba se sigue utilizando y es aceptada por organizaciones como la OCDE en su guía 405 (98). Sin embargo, tras las recomendaciones de distintas organizaciones basadas en la aplicación de los principios de reemplazo, refinamiento y reducción (3R), además del interés científico para entender mecanismos moleculares y el daño a nivel celular, condujeron al desarrollo de metodologías *in vitro* y *ex vivo* para valorar la irritación ocular, tal es el caso del ensayo de permeabilidad y opacidad corneal bovina (BCOP por sus siglas en inglés), que además sugiere el análisis histológico de los tejidos expuestos para determinar con mayor exactitud el potencial irritante de la sustancia de interés (100–102).

Además de las implicaciones éticas, la prueba de Draize presenta problemas de extrapolación de datos, reproducibilidad, subjetividad y variabilidad biológica (98). Por otro lado, en 1972 Burton presentó un método complementario a la prueba de Draize para evaluar la irritación ocular. Este enfoque se basa en la medición de los cambios en el grosor corneal de conejos New Zealand White, los cuales son secundarios a la exposición a una sustancia irritante (103).

Los modelos *in vitro* presentan ciertas limitaciones, como la falta de similitud fisiológica, es decir, la dificultad para imitar la complejidad estructural y funcional del sistema ocular. Modelos basados en cultivos celulares monoestratificados o en membranas sintéticas no replican adecuadamente las capas corneales ni su interacción dinámica con otros tejidos. Asimismo, la ausencia de interacción corneal con estructuras adyacentes limita la evaluación de respuestas inflamatorias y procesos de cicatrización. Además, muchos de

estos modelos enfrentan barreras en cuanto a validación y aceptación regulatoria, debido a la falta de protocolos estandarizados y criterios de validación rigurosos, como ocurre con algunos sistemas de bioimpresión 3D o de cultivo celular en matrices artificiales. Además, la mayoría de las pruebas *in vitro* son una aproximación a la irritación aguda, por consiguiente, no replican las condiciones reales de la exposición continua a medicamentos en el tratamiento de enfermedades crónicas (98).

Las primeras pruebas de irritación ocular *in vitro* fueron publicadas en 1984 por Borenfreund et al. Este estudio proporcionó información sobre el uso de la citotoxicidad en diferentes tipos de células en cultivo. Estas pruebas generalmente son para la detección y búsqueda de rangos de concentraciones tóxicas en condiciones agudas, es decir tras una única exposición; las pruebas de citotoxicidad se presentan en ambientes controlados que no manejan variables dependientes del animal, lo que conlleva una mayor rentabilidad, sensibilidad y respuesta a la dosis, además de facilidad en la manipulación, reducción del número de animales y una mayor reproducibilidad (104).

En 1992, paralelamente, se desarrollaron dos métodos *ex vivo* para evaluar la irritación ocular aguda, la prueba de opacidad y permeabilidad de la córnea bovina (BCOP) y el ensayo de membrana corioalantoidea de huevo de pollo y ojo bovino (BE-CAM), sin embargo, solo BCOP fue aceptado como método oficial por la OCDE en 2009 (102,105,106). Desde entonces se han desarrollado y validado otros métodos *in vitro* como el método de la membrana corneal humana reconstituida (RhCE) y el método de prueba ojo de pollo aislado (ICE), entre otros (107,108). Estas pruebas reguladas por la OCDE utilizan parámetros como opacidad corneal, permeabilidad y viabilidad celular, estos determinan la capacidad de una sustancia para causar irritación ocular aguda con el fin de clasificar la sustancia según los criterios de la SGA de la Organización de las Naciones Unidas.

Adicionalmente, la OCDE resalta la importancia de la evaluación histológica para definir la seguridad y categorizar el daño histológico de distintas sustancias químicas, como criterio de valoración adicional de metodologías como BCOP. La evaluación histológica proporciona información detallada sobre los cambios morfológicos y estructurales en los tejidos después de la exposición a una sustancia. Así mismo, permite analizar la magnitud de la respuesta inflamatoria, incluyendo células proinflamatorias, además de permitir una comparación más detallada con los grupos control (23). En la actualidad existen varios

autores que citan el uso de la evaluación histológica para refinar técnicas como BCOP y permeación corneal en celdas de Franz para mejorar su alcance, aplicación y previsibilidad de la seguridad de nuevas sustancias (109–118).

También existen pruebas toxicológicas de screening con fines no reglamentarios, como el ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular del embrión de pollo (CAMVA), la prueba del huevo de gallina (HET o HET-CAM), ensayo de reversibilidad de la opacidad corneal porcina (Por-CORA) entre otras. Estas tienen criterios de valoración sencillos para predecir la irritación ocular (101,119).

En cuanto a ensayos específicos que evalúen la permeación corneal de anestésicos locales, en 1979, Schoen et al. midieron la corriente de cortocircuito (SCC) y la resistencia de las córneas para evaluar los efectos terciarios de estos IFAs en el transporte iónico a través del epitelio corneal. Uno de los desenlaces fueron defectos epiteliales secundarios a la exposición de dosis repetidas de lidocaína tetracaína, entre otros (120). Existen pocos estudios con anestésicos oculares que empleen celdas de Franz. Los artículos publicados hacen referencia a la velocidad de permeación corneal a través del tiempo por medio de cámaras de perfusión. En estos se encuentra que los valores de permeabilidad corneal son similares para las moléculas: clorhidrato de cocaína, clorhidrato de procaína y tetracaína, además de indicar que un ajuste del pH mejora la permeabilidad transcorneal (121,122). Después de una revisión exhaustiva se encuentra un estudio que utiliza celdas de Franz para medir la permeación de la lidocaína; sin embargo, la experimentación *ex vivo* se realiza en piel (123).

En estudios locales se ha evaluado la permeación en piel de cerdo utilizando celdas de Franz, mientras que la irritación se ha valorado mediante análisis histológico, cultivos celulares, y métodos alternativos como HET-CAM y RBC. Sin embargo, estos modelos no se han aplicado al estudio de anestésicos locales, lo que representa una oportunidad para ampliar su uso en el ámbito oftálmico (124).

Evaluación de la permeabilidad corneal en un modelo *ex vivo* utilizando celdas de Franz

Las celdas de Franz permiten caracterizar la velocidad y el grado de permeación de un fármaco aplicado sobre la superficie de una membrana biológica, utilizando parámetros del

método que simulan condiciones *in vivo* (45). Las celdas de Franz son una metodología ampliamente utilizada para evaluar la permeación de fármacos en el desarrollo de nuevas formulaciones oftálmicas, presentan varias ventajas, como su alta eficiencia, rentabilidad, consistencia, reproducibilidad y la reducción en el uso de animales en experimentos. Sin embargo, también tienen desventajas, ya que no siempre replican todas las condiciones fisiológicas reales como el flujo lagrimal o la regeneración corneal (125).

Los estudios en las celdas de Franz son mediados por la difusión pasiva de un compuesto disuelto o disperso en un vehículo en la cámara donante, a través de una membrana biológica o artificial hacia un fluido en una cámara receptora, debidamente termostatado. Las celdas están compuestas por un compartimento receptor que tiene dos accesos: una para la colocación de la córnea y otra para el muestreo manual de la solución receptora. Las partes de una celda de Franz se observan en la Figura 8. El fluido de la cámara receptora se muestrea periódicamente para evaluar la concentración o la cantidad de compuesto (según se requiera), que penetra el tejido en función del tiempo (empleando para ello una metodología analítica validada). El medio receptor no debe interferir en la cuantificación o la integridad de la membrana (126).

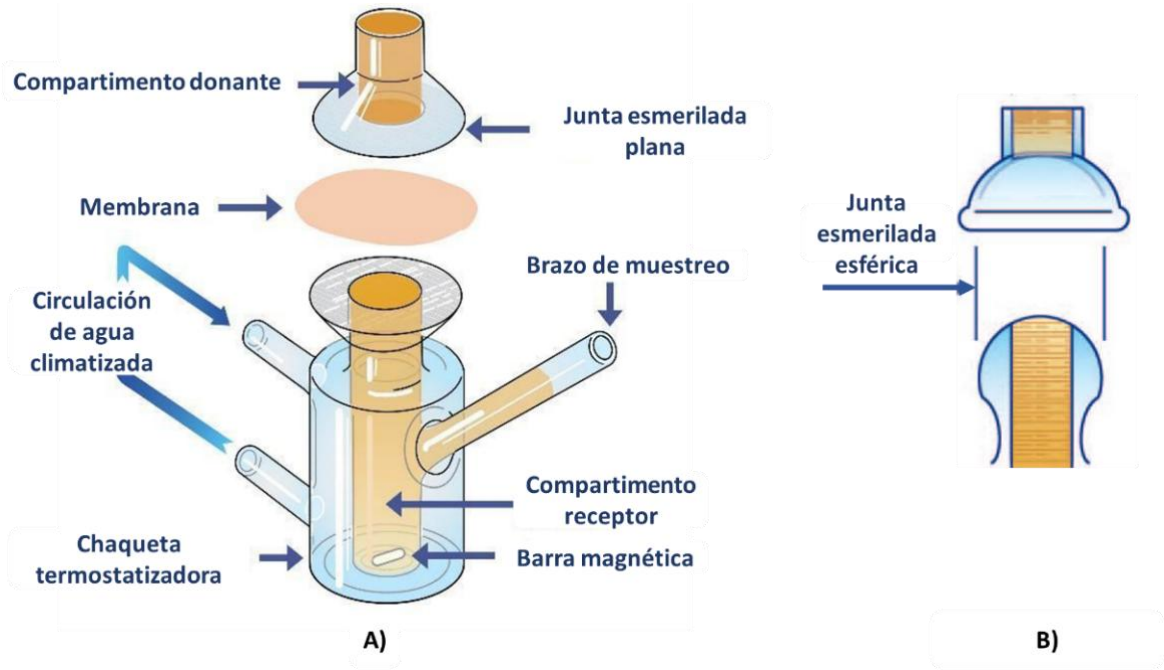

Figura 8. Esquema de celda de Franz. A) Celda de Franz utilizada para piel. B) Celda de Franz empleada para cornea. Fuente: (126).

Para estudios de permeación corneal, el medio receptor debe tener características similares al humor acuoso (para compuestos hidrófilos suelen emplearse solución salina amortiguada con fosfatos a pH 7,4). Este debe usarse desgasificado y mantenerse en agitación, además de contar con una solubilidad suficiente del fármaco de interés durante todo el estudio, lo que garantiza que no se limite la velocidad de difusión del fármaco. El medio receptor debe garantizar que se mantengan las condiciones s*ink* (se definen más adelante) sin afectar las propiedades de la membrana, y el volumen de las alícuotas muestreadas debe ser adecuado para mantener estas condiciones y evitar una alta dilución del compuesto (127).

El proceso de permeación del compuesto se establece bajo condiciones tales como la temperatura, la velocidad de agitación, el tipo y tamaño de agitador, la selección del medio, la duración del ensayo, la integridad de la membrana y las condiciones s*ink*. Estas condiciones se mantienen constantes para garantizar la reproducibilidad del ensayo. Actualmente existen diferentes tipos de celdas. Las más empleadas a nivel ocular son las celdas de Franz modificadas tipo vertical (53,71,73–97), con junta esmerilada esférica (77,79,95), esto debido a que son las ideales para evaluar permeación en córnea. La FDA y la OCDE, proponen un protocolo con el fin de estandarizar el uso de estas celdas. Sin embargo, estas pautas no son específicas para el uso de tejido corneal (24,127).

Las condiciones *sink* se refiere a la necesidad de establecer y mantener un gradiente de concentración entre los compartimentos donador y receptor durante el proceso de difusión. Para lograr esto, se requiere que la cantidad del compuesto en estudio que permea en el fluido receptor no supere el 10% de su límite de solubilidad, pero debe ser lo suficientemente elevada para ser detectada mediante el método analítico. Por ello, es fundamental mantener las condiciones *sink*, ya que, si no existe el gradiente de concentración, se afecta negativamente la velocidad de difusión y, por consiguiente, el flujo a través de la membrana (128).

Los estudios de permeación de fármacos tienen como principal objetivo obtener información sobre la magnitud del IFA que atraviesa una membrana, ya sea biológica o sintética, expresada normalmente como cantidad acumulada por unidad de área (Qn, $\mu g/cm^2$). Esta variable permite evaluar el comportamiento del compuesto en función del tiempo, independientemente del volumen del compartimento receptor, y facilita la comparación entre distintos ensayos. Dependiendo de los objetivos del estudio, la dosis

utilizada puede variar. Cuando se evalúa la penetración de un fármaco formulado (medicamento), se utiliza una dosis finita, simulando las condiciones reales de uso. Por otro lado, si el propósito es identificar los parámetros fisicoquímicos del IFA, se emplea una dosis infinita, es decir, una cantidad mayor de fármaco, próxima a su límite de solubilidad (127).

La cinética de permeación describe cómo un fármaco atraviesa una barrera biológica, como la córnea, lo que es fundamental para para comprender su biodisponibilidad ocular. Esta dinámica de permeación depende de varios factores, como ya se ha explicado. El estudio de la cinética de permeación permite predecir cómo puede variar la disponibilidad del fármaco en función del tiempo y de las condiciones del entorno (129).

En este contexto, también se han desarrollado modelos avanzados que integran factores fisiológicos complejos, como la permeabilidad efectiva y los principios de la ley de Fick. Estos modelos permiten estimar la velocidad de paso del fármaco según sus coeficientes de reparto y difusión, e incluso adaptarse a condiciones no estacionarias, en las que las concentraciones cambian a lo largo del tiempo y del espacio (129).

Los parámetros fisicoquímicos asociados al proceso de permeación, como son la permeabilidad aparente y el tiempo de latencia, se determinan una vez se ha alcanzado el estado estacionario. Este estado se caracteriza por un flujo constante y uniforme del paso del compuesto a través de la membrana una vez transcurrido un tiempo inicial que corresponde al tiempo de latencia mencionado. Este tiempo depende de factores como la permeabilidad del tejido y las propiedades fisicoquímicas del compuesto, entre otros. En este contexto, el transporte del compuesto se rige por la primera ley de difusión de Fick, la cual establece que el flujo de una sustancia a través de una barrera es directamente proporcional al gradiente de concentración y a la constante de difusión, e inversamente proporcional al espesor de la capa límite alrededor de la membrana (127,130).

Las celdas de Franz son un sistema versátil y reproducible que permite estudiar la difusión de compuestos en condiciones controladas, facilitando la recolección de datos cuantitativos. Kaluzhny y Klausner (2021) destacan que estos métodos no solo son menos costosos y más rápidos que los estudios *in vivo*, sino que además evitan problemas de extrapolación derivados de las diferencias anatómicas entre especies, al centrarse en tejidos aislados directamente representativos del ojo humano (31,101).

El uso de córneas porcinas y celdas de Franz también facilita la evaluación de parámetros experimentales en la permeación corneal, aportando información valiosa sobre la biodisponibilidad de los compuestos probados. Aunque la ausencia de dinámicas fisiológicas completas, como el lagrimeo y el flujo sanguíneo, puede ser una limitación, estas metodologías contribuyen al desarrollo de alternativas *ex vivo* que cumplen con regulaciones éticas, promoviendo el cumplimiento de los principios éticos de las 3R (31,101).

Irritación ocular

Los mecanismos de irritación e inflamación son procesos bioquímicos complejos que están influenciados por el tipo de agresión sufrida. Sustancias irritantes como el hipoclorito activan las neuronas sensoriales en los ojos y las vías respiratorias, provocando dolor e inflamación. La superficie ocular, al estar expuesta a partículas, líquidos, aerosoles y vapores, es susceptible a daños en ambientes laborales y domésticos. Estos daños pueden resultar en síntomas tales como picazón, secreción, hiperemia, fotofobia, entre otros (131).

A nivel celular, las toxinas ambientales y otras sustancias pueden inducir daño oxidativo, provocar apoptosis en las células corneales y conjuntivales, causar senescencia celular y alterar la motilidad (131). Los nociceptores, que son terminales nerviosas libres presentes en diversos tejidos, incluyendo el ojo, transmiten señales relacionadas con la presión, el calor y el dolor. Algunos nociceptores responden a estímulos químicos y la liberación de mediadores inflamatorios puede ser desencadenada por una estimulación eléctrica intensa de los nervios sensoriales, incluso a distancias de la zona afectada. Esto indica que un mecanismo neurogénico podría estar relacionado con la citotoxicidad, ya que la rápida destrucción celular puede liberar sustancias que actúan como desencadenantes del dolor al afectar las terminaciones nerviosas expuestas (132).

El sistema globalmente armonizado (SGA) define la irritación ocular como la aparición de lesiones oculares totalmente reversibles, como consecuencia de la exposición del ojo a una sustancia o mezcla. Las lesiones oculares graves se entienden como las lesiones de los tejidos oculares o la degradación severa de la visión, que no son totalmente reversibles, como consecuencia de la exposición del ojo a una sustancia. Los criterios de irritantes

oculares según la SGA se presentan en la Tabla 1, esta clasificación se basa en estudios hechos con animales (133).

Tabla 1. Criterios de irritantes oculares según la SGA.

Categoría	Criterios
Categoría 1 lesiones oculares graves/efectos irreversibles en los ojos	Una sustancia que produce: a) En al menos un animal, efectos sobre la córnea, iris o la conjuntiva que no se espera que reviertan o que no hayan revertido por completo en un periodo de observación normal de 21 días; y/o b) En al menos dos de tres animales sometidos a ensayo, una respuesta positiva de: i) Opacidad de la córnea ≥ 3 y/o ii) Iritis < 1,5 Con datos calculados como la media de los resultados obtenidos 24,48 y 72 h después de la instilación de la sustancia de ensayo.
Sustancias que pueden provocar irritación reversible en los ojos.	
Categoría 2/2A	Sustancias que producen una respuesta positiva en al menos dos de tres animales evaluados: a) Opacidad de la córnea ≥ 1; y/o b) Irritación del iris (iritis) ≥ 1; y/o c) Enrojecimiento de la conjuntiva ≥ 2; y/o d) Edema de la conjuntiva (quemosis) ≥ 2 Con datos calculados como la media de los resultados obtenidos 24,48 y 72 h después de la instilación de la sustancia de ensayo, y una respuesta totalmente reversible en un periodo de observación normal de 21 días.
Categoría 2B	En la categoría 2A un irritante ocular se considera moderadamente irritante para los ojos (categoría 2B) cuando los efectos indicados anteriormente sean totalmente reversibles en un periodo de observación de 7 días.

Fuente: (133).

Para determinar la categoría de una sustancia según el SGA, es fundamental llevar a cabo una serie de pruebas estandarizadas que evalúan la irritación ocular. Estas pruebas permiten obtener datos cuantitativos y cualitativos sobre la naturaleza y severidad de los efectos inducidos por la sustancia en cuestión. Dado que la irritación ocular puede variar significativamente dependiendo de diversos factores, como la concentración del agente irritante y el tiempo de exposición, es necesario llevar a cabo múltiples ensayos que abarquen diferentes condiciones de prueba. Esto asegura una evaluación completa de la sustancia y su clasificación adecuada de acuerdo con los criterios del SGA (133).

Las pruebas de toxicidad de nuevos compuestos son esenciales para el proceso de desarrollo de fármacos y medicamentos, debido a que estas revelan los efectos adversos o puntos finales específicos, como cáncer, cardiotoxicidad, irritación de piel y ojos, para determinar la seguridad de los productos antes de ser comercializados. Las pruebas preclínicas de toxicidad y de permeación también permiten el cálculo de la dosis del nivel sin efecto adverso observado (NOAEL, por sus siglas en inglés) necesario para iniciar la evaluación clínica de los productos en investigación. La toxicidad de las sustancias se puede observar por medio de exposiciones accidentales de una sustancia, o por medio de estudios *in vivo* o *in vitro* (44,134).

Las pruebas *in vivo* que evalúan la toxicidad ocular incluyen exámenes oftálmicos con ayuda de exámenes especiales como tomografía óptica de segmento anterior, electrorretinogramas, oftalmoscopia indirecta, biomicroscopia, angiografía con fluoresceína, entre otros. La información precedente sobre fármacos y los datos previos de estudios *in vivo* juegan un papel importante en la evaluación adecuada de los hallazgos patológicos en los exámenes de histología. Teniendo en cuenta que existe una poca orientación de la conferencia internacional de armonización (ICH) sobre los protocolos de la toxicidad no clínica preclínica, es por ello por lo que se hace hincapié en que la presente investigación puede ser útil para la valoración de la irritación ocular por medio de la histología del tejido, la cual está respaldada por guías de la OCDE (10,23,135,136).

La prueba de Draize está orientada a valorar la toxicidad aguda mediante una única exposición, de acuerdo con las guías oficiales. Por otro lado, los estudios *in vitro* están enfocados en la valoración de efectos agudos. Hasta el momento, no existen estudios *in vitro*, respaldados por guías oficiales internacionales, que evalúen los efectos a largo plazo (134).

En los estudios de irritación se utilizan tanto controles negativos como positivos para evaluar la efectividad del sistema de prueba. El control negativo es una muestra que incluye todos los componentes del sistema de prueba, pero no se expone a la sustancia química en estudio. Su función es identificar posibles interacciones del sistema con el disolvente o con otros factores (23). Ejemplos comunes de controles negativos son la solución de cloruro de sodio al 0,9 % o agua desionizada (23,102).

Por otro lado, el control positivo se trata con una sustancia que provoca una respuesta conocida y predecible en el sistema, asegurando que el sistema de prueba funcione correctamente y permita medir la variabilidad en la respuesta (23). Algunos ejemplos de controles positivos incluyen etanol al 99% o dimetilformamida al 100 % en pruebas como BCOP y ICE, en donde emplean el uso de evaluación histopatológica (23,102); o hidróxido de sodio (NaOH) en concentraciones que varían de 0,1 M a 2 % (90,111,124,137–142). En otros métodos, como el de exposición corta (STE), se utiliza lauril sulfato de sodio (SLS) al 0,01% como control positivo (143). Ambos controles son fundamentales para garantizar la validez y confiabilidad de los resultados en estudios de irritación ocular.

Las evaluaciones histológicas son particularmente valiosas para caracterizar sustancias que no producen cambios medibles en opacidad o permeabilidad, siendo utilizadas en el screening farmacológico de compuestos (140). En estudios como el ensayo BCOP, la histopatología ha demostrado ser una herramienta complementaria esencial, permitiendo observar cambios en el espesor corneal, el grado de daño y las lesiones, lo que contribuye a anticipar y clasificar la irritación ocular. De hecho, la evaluación histopatológica de lesiones epiteliales corneales permite explorar el pronóstico de lesiones oculares *in vivo* (114–116).

Asimismo, investigaciones han destacado la utilidad de la evaluación histopatológica para confirmar la seguridad de formulaciones oftálmicas y comprender los mecanismos de acción de compuestos (144). Por ejemplo, se ha demostrado que la mayoría de los surfactantes inducen la pérdida de capas epiteliales corneales, siendo la histología crucial para clasificar correctamente las muestras en función del grado, profundidad del daño, toxicidad ocular y la reversibilidad, aspectos fundamentales en la discriminación de categorías 1 y 2 según el GHS (145).

Anestésicos tópicos

Los anestésicos locales son agentes que bloquean de forma reversible la conducción nerviosa; estos se clasifican en aminoésteres y aminoamidas. Los anestésicos locales tienen efectos antiinflamatorios y antihiperalgésicos. El mecanismo de acción para bloquear la transmisión de los impulsos nerviosos es acceder a través de la superficie citoplasmática para obstruir los canales de sodio (146). La estructura molecular de todos los anestésicos locales consta de tres componentes: anillo aromático lipófilo, enlace de éster o amida intermedio, y una amina terciaria hidrófila; cada componente mencionado aporta a la actividad de estas moléculas. Por un lado, la potencia de anestesia está determinada por el anillo aromático y sus sustituciones, junto con las atribuidas a la amina terciaria; el metabolismo y la eliminación de la molécula dependen del enlace intermedio que a su vez proporciona la clasificación en aminoésteres y aminoamidas; esta amina terciaria es determinante de la duración de la acción y su toxicidad. Los anestésicos locales son bases débiles que poseen un valor de pKa variable, y están ionizados parcialmente a pH fisiológico (147).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del clorhidrato de tetracaína, clorhidrato de proparacaína y clorhidrato de lidocaína.

Propiedad fisicoquímica	Clorhidrato de tetracaína (CAS 136-47-0)	Clorhidrato de proparacaína (CAS 499-67-2)	Clorhidrato de lidocaína (CAS 137-58-6)
Solubilidad	Solubilidad en agua 0,555 mg/ml (148)	Temperatura ambiente: Unidades: mq/mL Agua: >50 Dimetilsulfóxido: 50 Cloroformo: 30 Etanol: 7 Benceno: < 0.1 Hexano: < 0.1 Acetato de etilo: < 0.1 Éter: < 0.1 (149)	Solubilidad acuosa en medio tampón a pH 7,4 >35.2 [ug/mL] (150)
pKa	pKa básico 8.5 (151)	pKa es 8,96 básico (148,152–154)	pKa básico 7.95 (151)
Peso molecular	264,36 g/mol (150)	294,39 g/mol (150)	234.34 g/mol (150)
Coeficiente de reparto octanol-agua (LogP)	3.65 (155)	2.5 (150)	2.44 (150)
Coeficiente de distribución octanol-agua (LogD pH 7,4)	2.73 (155)	2.05 (152)	2.26 (152)

Solubilidad intrínseca (logS)	-2.7 (148)	-2.3 (148)	-2.6 (148)
Permeabilidad corneal (cm/s)	$1.5x10^{-6}$ (155)	P_{app} de proparacaína en presencia de timolol: 21.58 ± 1.04 x 10^{-6} (156)	-
pH (solución oftálmica)	4.5-6.0 (45)	3.5-6.0 (45)	5.0-7.0 (45)
punto de fusión	41-45 °C (148)	182-183.3°C (148)	68.5 °C (148)

La anestesia ocular tópica es una técnica rápida y sencilla que proporciona anestesia superficial sin los efectos adversos que trae la administración invasiva, como la inyección retrobulbar, la cual tiene el potencial de provocar daños en el nervio óptico e incluso provocar defectos del campo visual o ceguera (157). Su empleo se limita a casos de baja complejidad como cirugías de oculoplástica, ya que no proporciona acinesia completa ni control de la presión intraocular (PIO).

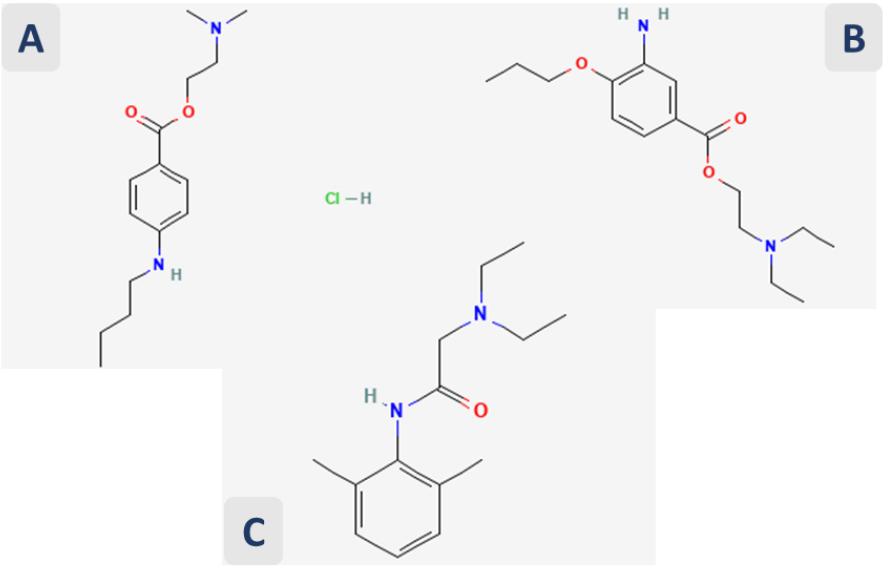

Figura 9. Estructura química del clorhidrato de tetracaína A), clorhidrato de proparacaína B) y clorhidrato de lidocaína C). Fuente:(150).

Los anestésicos tópicos más usados son colirios oftálmicos de clorhidrato de proparacaína al 0.5%, clorhidrato de tetracaína al 0.5% o gel de clorhidrato de lidocaína al 3.5%. La lidocaína se clasifica como una aminoamida; la proparacaína y tetracaína pertenecen al grupo de los aminoésteres (158,159). Las propiedades fisicoquímicas de estos fármacos se relacionan en la Tabla 2, y la estructura química en la Figura 9.

La toxicidad de los anestésicos tópicos, tanto a nivel local como sistémico, está relacionada con la dosis, la clasificación de la molécula, la farmacocinética y el tiempo de exposición, ya sea por contacto directo o accidental. La toxicidad sistémica ha aumentado debido al uso creciente de anestesia local, con efectos adversos que van desde reacciones alérgicas menores hasta alteraciones graves en el sistema nervioso central, respiratorio y cardiovascular, que pueden ser potencialmente mortales (160,161).

El mecanismo de toxicidad de los anestésicos tópicos sobre la córnea se relaciona con la inhibición de la migración de las células epiteliales, lo que retrasa la reepitelización. También se ha observado que estos anestésicos reducen la frecuencia del parpadeo y la producción de lágrimas reflejas, lo que puede desencadenar queratitis punteada superficial por ojo seco evaporativo. Además, los anestésicos pueden causar daño directo a las células epiteliales, afectando su motilidad y microvellosidades, lo que interfiere con la cicatrización y disminuye la adherencia de la película lagrimal. Así mismo, pueden afectar a los queratocitos del estroma y las células endoteliales, exacerbando la toxicidad a través del estrés desecante y la disminución del lagrimeo (162,163).

Otros mecanismos de toxicidad de los anestésicos tópicos incluyen la deposición de complejos antígeno-anticuerpo en el estroma y el daño por estrés oxidativo, particularmente en el uso de anestésicos intracamerales. Incluso en concentraciones bajas, los anestésicos tópicos pueden estar asociados con efectos tóxicos graves, sin necesidad de exposiciones prolongadas (162,163).

Estudios previos han descrito los efectos adversos de ciertos fármacos en el ojo. Los fármacos de mayor relevancia toxicológica son la cloroquina, esteroides, tamoxifeno, tacrolimus; estos se describen como precursores de distintas enfermedades como glaucoma, catarata, toxicidad macular, anomalías de células ganglionares de la retina, alteración del nervio óptico, entre otras. Entre los compuestos de aplicación tópica ocular que más generan alteraciones corneales, están anestésicos locales, solución limpiadora para lentes de contacto, 5-fluorouracilo, citarabina, amiodarona, toxina botulínica A, bloqueador H1, benzodiazepina, cloruro de benzalconio, entre otros (10,164).

Desde 1986, se han llevado a cabo investigaciones sobre la toxicidad y permeabilidad de algunos anestésicos, como el clorhidrato de proparacaína (165). La toxicidad ocular por anestésicos locales observada en contexto de abuso o uso inadecuado tiene efectos de

tipo citotóxico y proapoptótico en los queratocitos humanos, provocando efectos irreversibles como opacidades corneales, queratopatía tóxica, perforación corneal, queratitis punteada superficial, pannus corneal, infiltrados estromales/anulares, edema corneal, daño endotelial e inflamación ocular con posible hipopión, aumento de la presión intraocular e incluso enucleación ocular en distintas poblaciones (11–13,17,18,121,166). Además de la toxicidad mediada por las características propias de la molécula, se ha encontrado que los preservantes, como el cloruro de benzalconio, desempeñan un papel aditivo que contribuye a los efectos adversos (163).

En el estudio de Erdem et al., se incluyeron pacientes que habían utilizado solución oftálmica de clorhidrato de proparacaína al 0.5% (Alcaine). Un patrón común en los antecedentes clínicos fue que, con el tiempo, los pacientes aumentaron la frecuencia de uso del anestésico, pasando de usarlo 4 o 5 veces al día a aplicarlo cada 10 o 15 minutos. Todos los pacientes presentaron hiperemia conjuntival y grandes defectos epiteliales corneales, con un 91.6% de infiltrados estromales, de los cuales el 66.6% tenía opacidad en forma de anillo (Figura 10). También se observó edema palpebral en algunos casos. El tiempo promedio de uso fue de 14.8 ± 7.78 días (entre 1 y 30 días). Además, se observó una asociación entre el abuso de anestésicos tópicos y trastornos psiquiátricos, siendo necesario tratamiento psiquiátrico en el 50% de los pacientes (167).

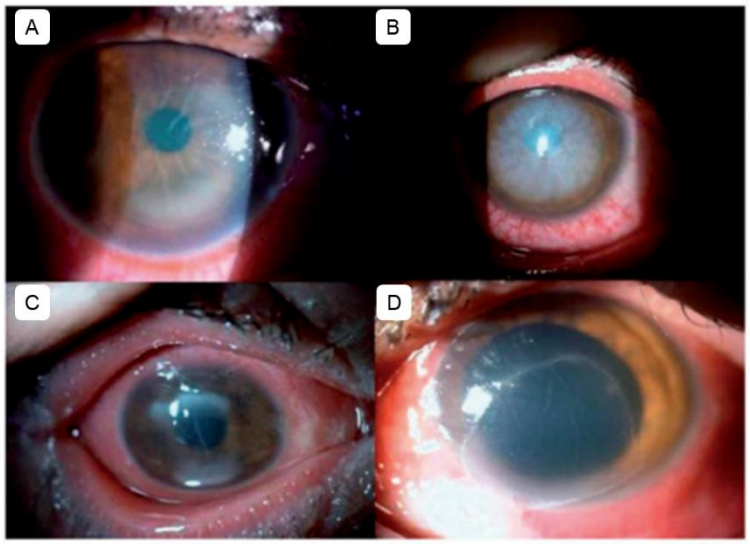

Figura 10. Hallazgos clínicos comunes por el uso de anestésicos tópicos. A) y C) queratitis estromal en forma de semianillo. B) opacidad central difusa, D) defecto epitelial central Fuente:(167).

Varios estudios compararon los anestésicos tópicos, concluyendo que el clorhidrato de proparacaína al 0,4% presenta una mayor toxicidad corneal (168–170). En un estudio incubaron queratocitos humanos cultivados con proparacaína y encontraron una disminución en la integridad celular con respecto a otros anestésicos tópicos (171). Por otro lado, se ha comprobado que la lidocaína presenta una menor toxicidad a diferencia de otros anestésicos tópicos; un estudio de un modelo *ex vivo* de globo ocular completo reporta menos lesiones corneales en el grupo expuesto a lidocaína (172).

Considerando que la proparacaína puede presentar una toxicidad corneal mayor que la de otros anestésicos y que sus posibles efectos adversos pueden llegar a ser de tipo sistémico, se encuentra relevante su evaluación en este estudio tanto para valorar su permeación corneal e identificar su posible potencial irritante a través de histología.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Equipos y reactivos

Los equipos empleados fueron: un espectrofotómetro UV 1800 Shimadzu® (Kyoto, Japón), ultrasonido Cole-Parmer® modelo 8891 (E.U.), balanza analítica sensibilidad de 0,0001 g marca Ohaus® serie Pioneer (E.U.), baño termostatado Lauda® (E.U.), plancha de agitación multipunto IKA® modelo RO 10 PS1 Werke (Alemania), celdas de Franz tipo vertical con junta esmerilada esférica marca PermeGear® (E.U.), micropipetas (10-100 µL y 100 1000 µL) marca Select BioProducts® (E.U.), termómetro Total-Range Traceable 4015CC (E.U.), microscopio óptico CX31 Olympus® (Tokio, Japón), microscopio óptico BX50 Olympus® (Tokio, Japón).

Los reactivos y producto oftálmico utilizados: clorhidrato de proparacaína grado del reactivo 99.1% (Tokio, Lote: YPAXN), solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.4 marca Microgen (Colombia, Lote: 0459-24), etanol 99.5%, marca ITW Reagents (PanReac AppliChem), (E.U. lote: 0001030968), Alcaine® 0.5% (5 mg/mL de clorhidrato de proparacaína), solución oftálmica estéril, Laboratorios Alcon (E.U., Lote: 12C91).

2.1.2 Material biológico

Para las pruebas de permeación e irritación se utilizaron córneas porcinas por sus características anatómicas y estructurales similares a las córneas humanas (53,84,93,173,174). Por otro lado, el uso de córneas de cerdo en métodos *ex vivo* son modelos que permiten superar las limitaciones asociadas a las pruebas *in vivo*, como el alto costo, la variabilidad biológica entre animales y las restricciones éticas cada vez más estrictas (31).

Las muestras, recolectadas en el Frigorífico Guadalupe (EFEGE), procedían de animales de la raza PIC®337 destinados a consumo humano, cuya edad promedio estaba entre los 6 y 8 meses y peso aproximado de 90 kg; se utilizó tejido sin ningún proceso o tratamiento, es decir tejido íntegro.

2.1.3 Consideraciones éticas

En Colombia la resolución 8430 de 1993 es la norma marco referencia para la investigación en salud, además de detallar los aspectos concernientes con la ética y las condiciones mínimas para el desarrollo de las investigaciones en salud (175). Por otro lado, la ley 84 de 1989 establece los parámetros para la investigación con animales (176). En este orden de ideas, el manejo de tejido biológico se realizó bajo las normas científicas, técnicas y administrativas, ya mencionadas. En cuanto al origen del tejido *ex vivo,* este se obtuvo de animales sacrificados humanitariamente con fines comerciales; para ello se consideró que este lugar estuviera aprobado y regulado por la autoridad sanitaria competente.

El procedimiento de sacrificio de cerdos en EFEGE comienza con la inducción eléctrica, que provoca aturdimiento y pérdida temporal de conciencia, reduciendo el dolor y el estrés para facilitar las labores propias del faenamiento, procedimiento que cumple con normativas de bienestar animal.

El uso de córneas de cerdo *ex vivo* en celdas de Franz es un enfoque más ético y eficiente, acoplado a los principios de las 3R, promoviendo métodos alternativos, reduciendo el uso y sufrimiento animal (8). Las pruebas reportadas en este estudio fueron aprobadas por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y fue avalado mediante el Acta N° 03 de 2024.

2.2 Métodos

Este estudio es de tipo experimental, de intervención no aleatorizada y enfoque cuantitativo. En este apartado se describen los procedimientos utilizados para los ensayos de permeación e irritación corneal. Por otro lado, la validación parcial de la metodología analítica empleada para la cuantificación del clorhidrato de proparacaína se presenta en el Anexo A.

El esquema metodológico resume las etapas clave del estudio, que incluyen la obtención y preparación de córneas porcinas, los ensayos de permeación en celdas de Franz, y el análisis de irritación corneal mediante estudios histológicos, la validación parcial del método analítico (Figura 11).

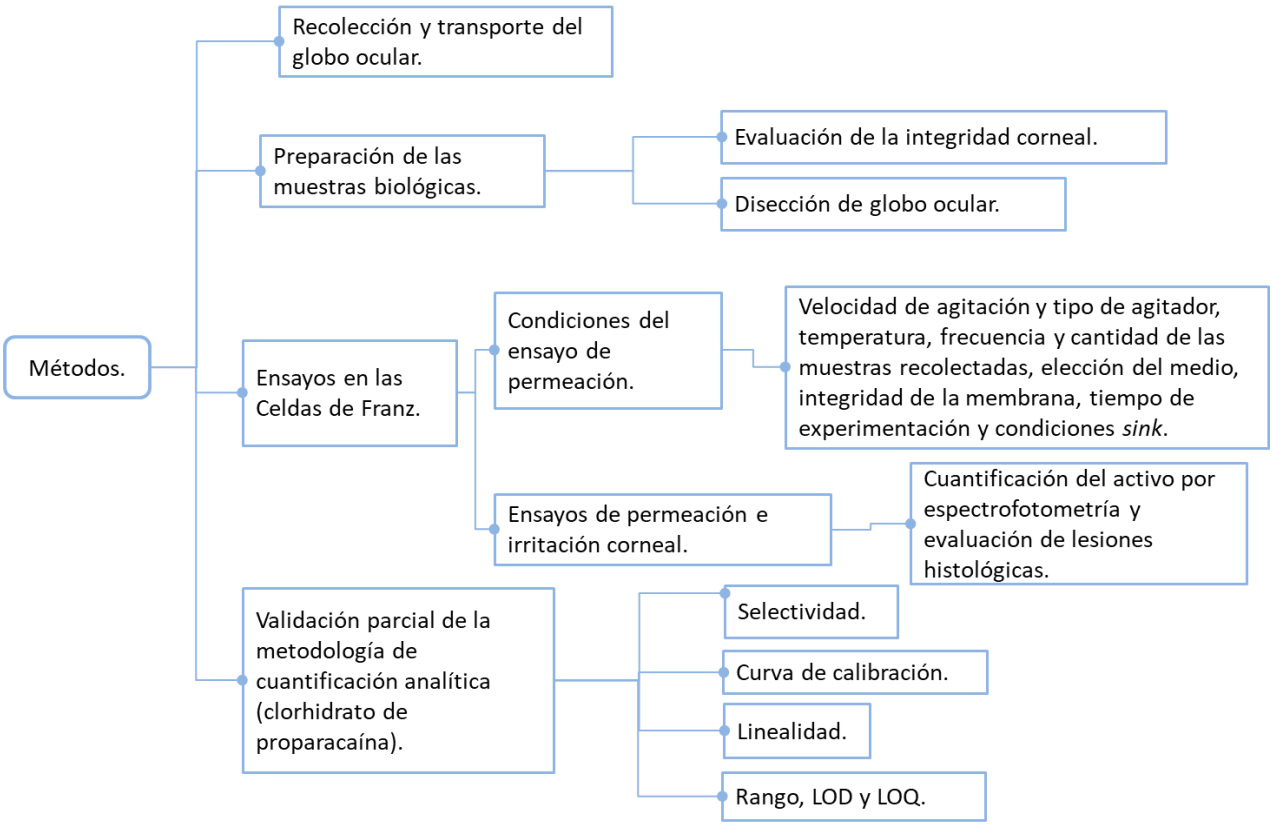

Figura 11. Esquema metodológico.

2.2.1 Recolección y transporte del globo ocular

La recolección y transporte del globo ocular hasta el laboratorio se llevó a cabo en las dos horas posteriores a la muerte del animal (53,82,173). Se tuvo acceso a los cerdos entre 15 y 30 minutos después de su sacrificio, y el proceso de recolección de las muestras tomó aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, los globos oculares fueron transportadas durante una hora en solución de PBS a una temperatura de 4°C. En total, el proceso completo de recolección y transporte tomó dos horas, asegurando la preservación de la integridad del tejido sin tratamientos adicionales (78,177–181).

El control riguroso de las condiciones de transporte y manipulación corneal es fundamental, ya que el desbridamiento epitelial mecánico puede incrementar significativamente la permeación de diversas moléculas (182,183). La integridad de la membrana se evaluó en dos momentos: primero en el frigorífico, tras la extracción, y posteriormente en el laboratorio, antes del montaje del ensayo. Este análisis se realizó macroscópicamente

mediante lupa e iluminación, complementado con la experiencia profesional en optometría, lo que permitió una evaluación objetiva de su estructura.

Durante la inspección en el frigorífico, se descartaron los ojos con cámara anterior colapsada, daño epitelial generalizado, como el desprendimiento completo del epitelio o signos de queratopatía en banda tras su pérdida, ya que estas alteraciones indicaban un compromiso severo de la córnea, haciéndolas inviables para los ensayos. Tras el transporte al laboratorio, se llevó a cabo una segunda inspección macroscópica para excluir córneas con queratitis u otras alteraciones no detectadas en la evaluación inicial. También se descartaron muestras con pérdida epitelial periférica o úlceras de menor tamaño posiblemente asociadas al transporte de los animales o al método de sacrificio.

En todos los casos, se evaluó la transparencia y la uniformidad estructural de las córneas para determinar su idoneidad en el estudio. La evaluación macroscópica y los estudios de integridad confirmaron que las córneas utilizadas estaban en condiciones óptimas para el análisis de permeación. Los hallazgos histológicos respaldan el uso de PBS como medio de transporte y un tiempo experimental de 4 horas, al demostrar que la integridad corneal se mantiene sin alteraciones significativas hasta por seis horas de exposición en celdas de Franz.

Disección del globo ocular

La disección del globo ocular se llevó a cabo siguiendo la metodología de Boice (184), con algunas modificaciones, la cual se ilustra en la Figura 12. Los globos oculares fueron sumergidos en una solución de PBS, y posteriormente se llevó a cabo la disección del tejido extraorbitario. Se retiraron los músculos extraoculares y la conjuntiva, dejando únicamente la córnea, esclera y el nervio óptico. Para ello, se utilizó un bisturí quirúrgico en condiciones estériles. A continuación, cada ojo se colocó sobre toallas Wypall saturada con PBS y, con un bisturí estéril, se realizó una incisión continua para separar el nervio óptico. Se retiró el humor vítreo, luego se realizaron varios cortes en la esclera, asegurando conservar aproximadamente 4 mm de tejido circundante alrededor de la córnea. El cristalino y el iris fueron cuidadosamente extraídos desde su base mediante el uso de pinzas de disección, exponiendo progresivamente la malla trabecular, también se retiró la coroides. Al finalizar el procedimiento, se conservó únicamente la estructura integrada por

la córnea y la esclerótica. Finalmente, los ojos fueron conservados en PBS fresco a 4 °C hasta reunir la cantidad requerida para la experimentación.

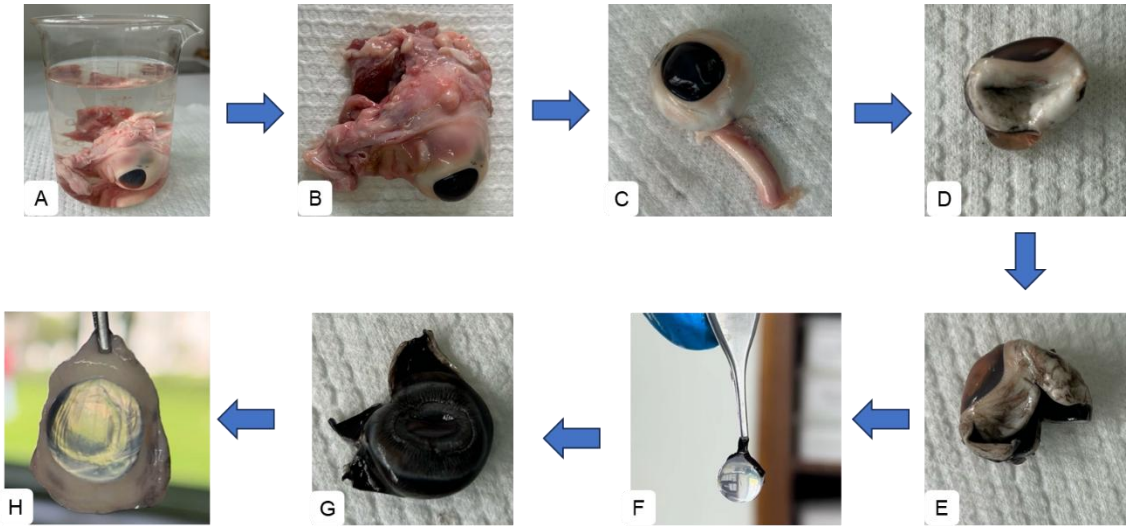

Figura 12. Proceso de disección del globo ocular. Se utilizó un ojo con más de 24 horas *post mortem* únicamente con fines ilustrativos. (A) Globo ocular recién extraído, sumergido en solución de PBS. (B) Ojo completo con estructuras extraorbitarias (músculos y conjuntiva). (C) Eliminación de los músculos extraoculares y la conjuntiva, exponiendo la esclera, córnea y nervio óptico. (D) Sección posterior del ojo tras la separación del nervio óptico. (E) Retiro del humor vítreo mediante incisión en la esclera. (F) Extracción cuidadosa del cristalino e iris con pinzas de disección. (G) Vista de la córnea con 4 mm de esclera circundante. (H) Preparación final compuesta por córnea y esclera, conservada en PBS a 4 °C hasta su uso experimental. Fuente: autor.

2.2.3 Condiciones que afectan la permeabilidad corneal en un modelo *ex vivo* utilizando celdas de Franz

Velocidad de agitación y tipo de agitador

La velocidad de agitación se estableció considerando la revisión de la literatura y las condiciones fisiológicas para garantizar una mezcla homogénea sin afectar la integridad de la membrana corneal. Se utilizó una plancha de agitación multipunto (IKA® modelo RO 10 PS1), asegurando que la velocidad fuera suficiente para mantener una adecuada distribución del medio en el compartimento receptor sin generar turbulencias que pudieran alterar la permeación.

Temperatura

Para establecer la temperatura óptima, se ajustó el baño termostatado comenzando en 32°C y aumentando gradualmente ±1°C hasta alcanzar la temperatura deseada en la córnea montada en la celda de Franz según el procedimiento que se describe más adelante (sección 2.2.4).

Una vez determinada la temperatura ideal en el baño termostatado, se realizó un nuevo montaje y se procedió a medir la temperatura de la córnea y los demás componentes, incluyendo la córnea, los medios receptor y donante utilizando un termómetro Total-Range Traceable 4015CC, con una precisión de ±1°C. Las mediciones se tomaron en distintos intervalos de tiempo (0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 0,75; 0,875; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 y 6 h). Se registró el tiempo necesario para que la membrana corneal alcanzara y estabilizara una temperatura de 37°C. El ensayo se realizó por triplicado, utilizando agua destilada como medio en los compartimentos receptor y donante (185).

Frecuencia de muestreo, volumen de recolección, selección del medio de difusión y duración del experimento

La frecuencia de muestreo, el volumen de recolección, la selección del medio de difusión y la duración del experimento se determinaron con base en la revisión de la literatura y los protocolos establecidos por PermeGear. No obstante, para garantizar reproducibilidad y precisión, se estandarizaron tanto las cánulas como las jeringas utilizadas en la extracción de muestras, asegurando un muestreo uniforme y minimizando posibles alteraciones en el proceso de permeación (126).

Integridad corneal

La integridad corneal se evaluó a través de análisis histológico fijando las córneas en formalina tamponada al 10%, procesándolas por medio de técnicas de rutina y empleando tinción de H&E. Bajo diferentes condiciones experimentales se determinó el efecto del PBS y la duración del ensayo en la integridad del tejido. Se analizaron córneas recolectadas una hora después del sacrificio del animal sin exponerlas a PBS, córneas transportadas hasta el laboratorio en PBS a 4°C (2 horas de tiempo *post mortem*) y córneas montadas e incubadas en las celdas de Franz bajo las condiciones definidas para el ensayo durante 2, 4 y 6 horas. Este procedimiento permitió evaluar la influencia del medio, el tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta iniciar el ensayo y el tiempo de

experimentación en la integridad del tejido, asegurando que las condiciones seleccionadas no afectaran su integridad.

Solubilidad del clorhidrato de proparacaína

Debido a la amplia variabilidad en los valores de solubilidad de la proparacaína reportados en la literatura, donde se observa una clara influencia del pH (149), se consideró imprescindible realizar una prueba confirmatoria para verificar la solubilidad del clorhidrato de proparacaína en PBS. Para ello, se incorporaron iterativamente alícuotas de aproximadamente 10 mg de clorhidrato de proparacaína en 1 mL de PBS fresco a temperatura ambiente (20°C ± 0.5, pH 7,4), la cual fue medida con un termómetro Total-Range Traceable 4015CC, manteniendo agitación continua hasta la observación de sólido en exceso sin disolver.

En un estudio se reporta que la proparacaína y sus impurezas se mantuvieron estables en solución a temperatura ambiente durante ocho horas, sin la aparición de productos de degradación y con una variabilidad menor al 5 % en las áreas de los picos cromatográficos (186). En ese orden de ideas, la solución se dejó en agitación durante el tiempo necesario para asegurar la saturación, considerando las condiciones de tiempo mencionadas para asegurar la estabilidad del IFA.

Posteriormente, se tomó 1 mL del sobrenadante y se realizaron diluciones sucesivas para su cuantificación. Inicialmente, se tomó una alícuota de 0.1 mL y se diluyó en 10 mL de PBS. Luego, se tomó 0.05 mL de esta solución y se diluyó en 2 mL de PBS. Finalmente, se tomó 0.5 mL de esta última dilución y se mezcló con 1 mL de PBS. La absorbancia de la solución final se midió mediante un espectrofotómetro UV-Vis (UV 1800 Shimadzu®, Kyoto, Japón). Finalmente, se utilizó la curva de calibración para interpolar la concentración de clorhidrato de proparacaína en la solución original y determinar su solubilidad (Anexo A) (112,187).

Condiciones s*ink*

Inicialmente, para el cálculo de las concentraciones a utilizar, se tomó como referencia el dato de solubilidad en agua reportado en la literatura, el cual es >50 mg/mL según Whigan (149). Con base en esta información, se estimó preliminarmente que las condiciones s*ink* se cumplirían si la concentración en el compartimento receptor se mantenía por debajo del

10% de la solubilidad del fármaco (112,128,187). Posteriormente, con el resultado de la solubilidad del clorhidrato de proparacaína, determinada bajo las condiciones anteriormente especificadas, se calcularon las concentraciones definitivas a emplear en el estudio, que garantizaran las condiciones de no saturabilidad del medio (condiciones s*ink*).

2.2.4 Evaluación de la permeación del clorhidrato de proparacaína

Configuración del montaje y evaluación del ensayo de permeación corneal en un modelo *ex vivo* utilizando celdas de Franz

Para el montaje del ensayo de permeación corneal, se siguió la metodología establecida por PermeGear y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Se utilizaron celdas de Franz tipo vertical con junta esmerilada esférica marca PermeGear®, con un área de difusión de 0.64 cm² y un volumen de 5 mL en el compartimento receptor. La elección de celdas con junta esférica se realizó debido a la anatomía y la forma cóncava de la córnea, lo que permitió un mejor ajuste y contacto homogéneo entre el tejido y el medio de difusión, evitando posibles fugas o áreas de distribución irregular del fármaco. Se prepararon y limpiaron los equipos, incluyendo barras de agitación, compartimento donante y jeringas de muestreo, enjuagándolos con etanol y agua desionizada (45,126).

El sistema de difusión estuvo compuesto por una placa de agitación magnética, una base de soporte para las celdas y un sistema de circulación de agua conectado a un termostato para el control de temperatura (Figura 13). La regulación térmica se realizó mediante un baño termostatado, el cual tenía una bomba sumergida que impulsaba el agua a las celdas, a la temperatura definida, a través de mangueras. Para garantizar un flujo eficiente y uniforme, el agua ingresaba por el brazo inferior de la chaqueta térmica y salía por el superior, permitiendo una distribución homogénea del calor. Antes de iniciar el ensayo, se eliminaron posibles burbujas de aire en la chaqueta térmica y en el compartimento receptor, mediante inclinación del sistema o succión con una cánula, asegurando así la estabilidad térmica y la correcta difusión del fármaco (126).

Las celdas fueron aseguradas en una plancha de agitación multipunto para garantizar estabilidad durante el ensayo. Las barras de agitación magnética se colocaron en el compartimento receptor. Se fijó la velocidad de agitación a la velocidad definida en los ensayos previos. Se monitoreó la temperatura de las celdas hasta que el sistema alcanzara la temperatura deseada, utilizando un termómetro Total-Range Traceable 4015CC. La

colocación de la córnea se realizó en el compartimento donante con el epitelio orientado hacia dicho compartimento. Es crucial que la membrana cubra completamente el orificio y se disponga de manera que minimice la formación de pliegues, ya que una colocación incorrecta podría resultar en la fuga del activo (25).

Para minimizar la evaporación o posibles fugas, se recubrió el extremo del brazo de muestreo, la parte superior del compartimento donante y la junta de la jeringa con la cánula utilizando tres capas de Parafilm®. Se adicionó el PBS, desgasificado (durante 5 min). Se ajustó el compartimento donante con la córnea, evitando la formación de burbujas y garantizando un sellado adecuado con una abrazadera o pinza. Se añadió 500 µL de PBS al compartimento donante para equilibrar las córneas durante 15 minutos. Tras el equilibrio, se retiró el medio de la cámara donante, eliminando cualquier residuo antes de agregar la dosis específica de la sustancia de interés (77,79).

El muestreo se realizó en distintos intervalos de tiempo, asegurando la reposición con medio fresco. La cuantificación del clorhidrato de proparacaína se realizó mediante una metodología espectrofotométrica UV-Vis, tras la dilución adecuada del volumen muestreado cuando fue necesario, a una longitud de onda de 231 nm (Anexo A). En dicho anexo, se presentan los parámetros validados para esta metodología, incluyendo la evaluación espectrofotométrica, el control de interferencias, la determinación de la longitud de onda máxima, la selectividad, la curva de calibración, los límites de detección y cuantificación, así como la linealidad del método. Para eliminar las interferencias provenientes de la membrana, se usó como blanco el PBS que había permeado en las mismas condiciones del ensayo. Este procedimiento consistió en colocar PBS en el compartimento donante, realizar los muestreos periódicos, y las demás condiciones establecidas, al final, recolectar el PBS permeado del compartimento receptor. Así, este se utilizó para establecer la línea base y el auto cero en el espectrofotómetro. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

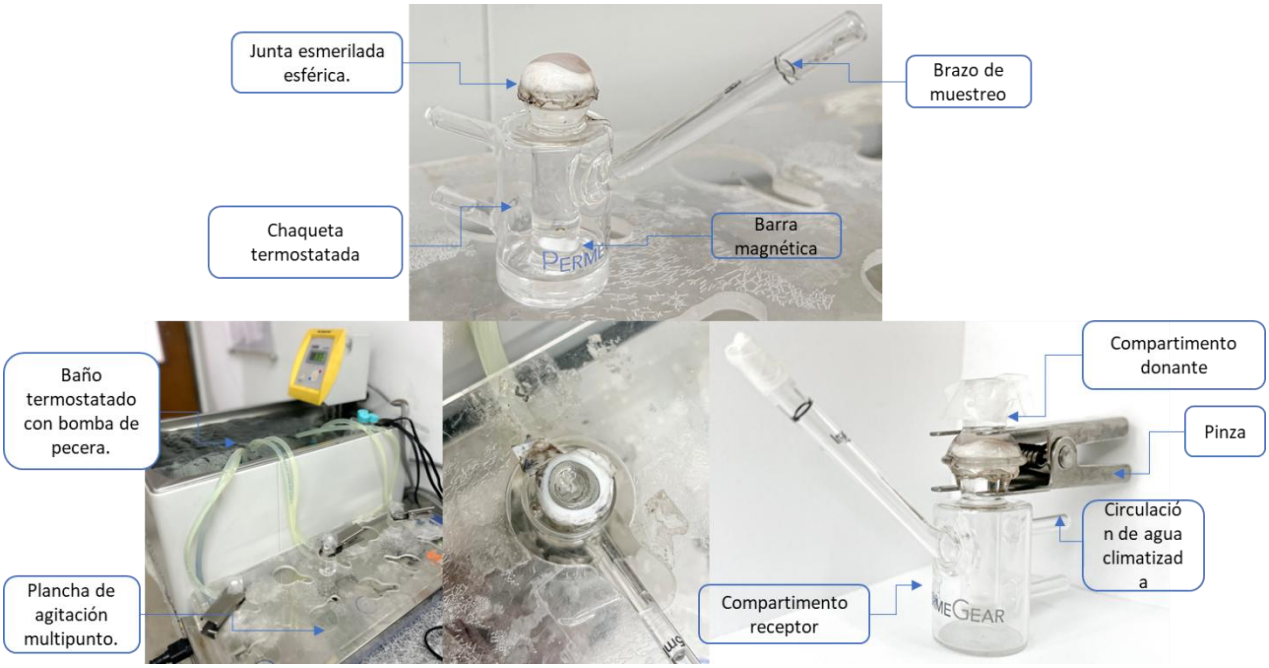

Figura 13. Imágenes fotográficas del montaje con el sistema de difusión y las celdas de Franz de articulación esférica utilizadas para los estudios de permeación corneal. Fuente: autor.

Condiciones de permeación: dosis finita, infinita y de abuso

En los estudios de permeación, la elección entre dosis finita e infinita depende del objetivo del análisis. La dosis finita se emplea cuando se busca simular el uso clínico del fármaco, proporcionando datos representativos de su administración real. En contraste, la dosis infinita se utiliza para estudiar las propiedades fisicoquímicas del compuesto, asegurando una concentración constante en el compartimento donante al mantener el fármaco cercano a su límite de solubilidad (127).

En este estudio, se emplearon distintas concentraciones y volúmenes en el compartimento donante, garantizando en todos los casos el cumplimiento de las condiciones s*ink*. La solución oftálmica de proparacaína al 0.5% (producto comercial), contiene (considerando lo que compone la mayoría de las soluciones oftálmicas): cloruro de benzalconio (CB) al 0.01% como conservante, ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio (NaOH), un sistema buffer para el control del pH, un viscosante y un isotonizante, en una base de agua purificada y estéril (188).

Para la solución oftálmica Alcaine® (0.5% de clorhidrato de proparacaína), se realizaron estudios preliminares para definir la dosis finita (2.25 mg/mL), en los cuales se verificó que una concentración de proparacaína generara una señal cuantificable en el espectrofotómetro desde los primeros 30 minutos de ensayo. Se evaluaron también otras concentraciones acordes a la posología (189), pero la seleccionada fue la que ofreció mejores condiciones de detección.

Dado que en los estudios clínicos y reportes de casos revisados no se ha establecido una dosis estándar de abuso para la proparacaína, se optó por utilizar el doble de la concentración habitual del producto comercial (4.5 mg/mL) como dosis representativa en condiciones de abuso. Esta decisión se fundamentó en literatura donde se describen los efectos citotóxicos y proapoptóticos del uso repetido e indiscriminado de anestésicos tópicos como la proparacaína, incluyendo daño irreversible a los queratocitos y opacidades corneales persistentes (11–13,17,18,121,166).

Adicionalmente, se empleó clorhidrato de proparacaína como reactivo analítico a una concentración de 4.5 mg/mL, así como una dosis infinita de 53.152 mg/mL correspondiente a la concentración de la solución saturada del fármaco.

2.2.5 Ensayo del potencial de irritación ocular

La irritación ocular se evaluó mediante el análisis de las lesiones histológicas observadas en las córneas expuestas utilizando el mismo modelo del bioensayo de permeación. Para ello, se compararon las alteraciones presentes en las córneas tratadas con PBS (control negativo) frente a aquellas expuestas a clorhidrato de proparacaína en dosis infinita (53.152 mg/mL, activo), finita (2.25 mg/mL, producto), de abuso (4.5 mg/mL, producto), 4.5 mg/mL (Activo) y etanol al 99,5% (control positivo), realizando todos los ensayos por triplicado.

La elección del etanol como control positivo se fundamentó en su capacidad para inducir daño ocular reproducible sin generar necrosis total del tejido, lo que lo hace adecuado para ensayos histológicos *ex vivo*. Esta decisión se alinea con metodologías oficiales como el BCOP, en donde también se utiliza etanol como agente irritante estándar (102). En contraste, métodos como el HET-CAM emplean hidróxido de sodio (NaOH), cuya

agresividad extrema puede provocar lesiones irreversibles, siendo por tanto inadecuado para estudios comparativos en tejidos completos (119).

Una vez terminada la exposición en las celdas de Franz, las córneas se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 % (NBF, sigla en inglés) a temperatura ambiente durante un mínimo de 24 horas. La fijación endurece el tejido, lo que permite cortar secciones finas sin inducir artefactos mecánicos (23).

Teniendo en cuenta que los tejidos oculares tienen un 75% de agua, estos deben deshidratarse, esto se realizará con etanol 60-70% durante una hora, seguida de una limpieza con xileno debido a que los alcoholes no se mezclan con la cera de parafina. Después de la limpieza, el tejido debe ser incrustado en cera de parafina (mezcla policristalina de hidrocarburos sólidos), y con un microtomo se divide en dos mitades para obtener secciones histológicas simétricas de la córnea. Para garantizar que las secciones de los tejidos se adhieran a los portaobjetos, el vidrio debe estar cubierto por poli-L-lisina, seguida de una tinción con hematoxilina - eosina. La evaluación histológica se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico CX31 Olympus® (Tokio, Japón), mientras que la captura de imágenes se realizó con un microscopio óptico BX50 Olympus® (Tokio, Japón) (23).

Las lesiones histológicas que se visualizaron fueron descritas para el epitelio, el estroma y el endotelio corneal y adicionalmente, fueron graduadas de acuerdo con su severidad y extensión (Tabla 3). Las lesiones fueron visualizadas en cuatro campos con una magnificación de 20X.

Tabla 3. Lesiones histológicas y su gradación numérica.

Lesión	Severidad (conteo celular)	Gradación numérica
	1.Epitelio	
Edema intraepitelial (Ep Ed)	1-5 células/campo	0
	6-10 células/campo	1
	11-15 células/campo	2
	16-20 células/campo	3
	>20 células/campo	4
Espongiosis (Ep Es)	1-5 células/campo	0
	6-10 células/campo	1

	11-15 células/campo	2
	16-20 células/campo	3
	>20 células/campo	4
Descamación (Ep Ds)	Pérdida de 1 a 5 células/campo	0
	Pérdida de 6 a 10 células/campo	1
	Pérdida de 11 a 15 células/campo	2
	Pérdida de 16 a 20 células/campo	3
	Pérdida de más de 20 células/campo	4
Condensación de cromatina (Ep Cn)	1-5 células/campo	0
	6-10 células/campo	1
	11-15 células/campo	2
	16-20 células/campo	3
	>20 células/campo	4
	2. Estroma	
Edema (Es Ed)	Normal. Presencia de hasta 9 espacios interlamelares (EIL)/campo	0
	Leve focal Entre 9 y 20 EIL/campo	1
	Moderado focal. Entre 20 y 30 EIL/campo	2
	Severo focal. Entre 30 y 40 EIL/campo	3
	Generalizado > 40 EIL/campo	4
3. Endotelio Edema (En Ps)		
	Presente	0
	Ausente	1

Los hallazgos histológicos se observan en aumento de 20X.

Fuente: Leguizamón y Lozano en proceso de publicación.

Dado el nivel de detalle requerido para interpretar adecuadamente estas alteraciones, distintos autores han propuesto protocolos que orientan la manera de clasificarlas en el ensayo BCOP (102,106,115,116). Todos ellos presentan resultados cualitativos en los que reportan alteraciones ausentes (grado 0), leves (grado 1), moderadas (grado 2) o severas

(grado 3) en diferentes porciones corneales. Estudios previos no publicados desarrollados en el Departamento de Farmacia han demostrado la posibilidad de cuantificar estas lesiones en córneas empleadas en BCOP de acuerdo con el número de células (o capas) afectadas en cada campo microscópico, como se describe en la Tabla 3. Esta forma de expresar los resultados permite obtener datos cuantitativos, y no solo cualitativos, susceptibles de análisis estadístico que podrían contribuir a diferenciar irritantes leves, moderados o severos. En esta investigación se aplicó dicha clasificación a las córneas porcinas empleadas, considerando que las estructuras tisulares se conservan entre especies (31).

Para garantizar una adecuada interpretación de los hallazgos histológicos, especialmente en lo referente al edema estromal caracterizado morfológicamente por la aclaración del tejido, separación de la matriz extracelular y leve tumefacción celular (190), se definieron criterios específicos que permitieran diferenciar esta lesión de los espacios interlamelares fisiológicos y de artefactos histológicos.

El estroma corneal normal está conformado por lamelas de colágeno organizadas y separadas por una matriz rica en proteoglicanos, lo que mantiene la transparencia corneal y permite la difusión de nutrientes, sin que ello implique la presencia de edema. Sin embargo, durante el procesamiento histológico pueden generarse artefactos como retracción del tejido y espacios artificiales debido a la fijación, inclusión o corte.

A diferencia de estos cambios artificiales, el edema estromal implica una acumulación anormal de líquido, que se manifiesta como un incremento marcado de los espacios interlamelares, desorganización de las fibras de colágeno y pérdida de transparencia (191). Además, al interpretar los resultados debe considerarse la variabilidad histológica entre especies; por ejemplo, la córnea porcina presenta menor cantidad de espacios interlamelares que la humana.

La principal estrategia para diferenciar la separación de las lamelas ocurrida por artefactos y el verdadero edema estromal, radicó en la homogeneidad y alineación de las fibras de colágeno, ya que el edema altera su disposición de manera irregular y extensa, mientras que los espacios fisiológicos son parte de la estructura normal del tejido. En la Figura 14 se comparan imágenes de córneas con edema estromal y artefactos histológicos, permitiendo evidenciar sus diferencias morfológicas. Teniendo en cuenta estas

consideraciones se contempló como normal la presencia de hasta 9 espacios interlamelares por campo, que correspondería a la gradación 0, tal como se aprecia en la Tabla 3.

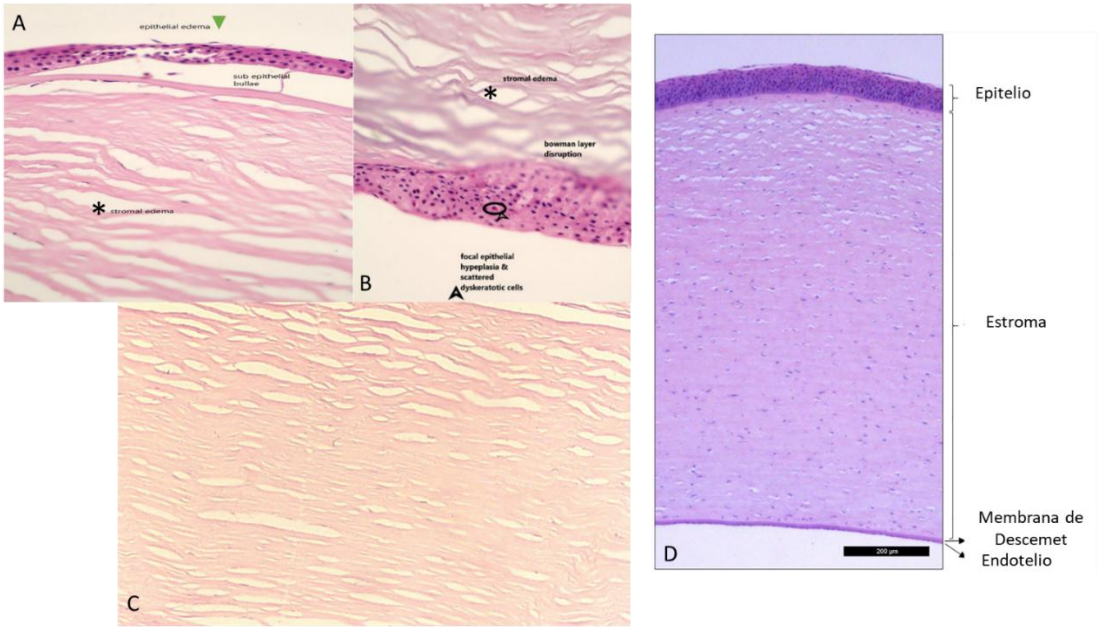

Figura 14. (A, B) Córnea humana con edema estromal (*) y edema intraepitelial (triángulo verde) debido a queratopatía retardada por gas mostaza (x400). (C) Córnea humana con tinción PAS (x400). (D) Análisis histológico de córnea porcina. Se observan artefactos en el estroma, presentes en C y D. Fuente: (192–194).

2.2.6 Análisis estadístico

A partir de los resultados de los ensayos de permeación, el análisis de los datos implicó graficar la cantidad acumulada de fármaco permeado en función del tiempo. Para calcular la cantidad acumulada (Qn, µg/cm^2) se considera la cantidad de fármaco que ha permeado a través del tejido en función de la superficie expuesta, en este caso del clorhidrato de proparacaína en distintos intervalos de tiempo. Para ello, se empleó la Ecuación 1, donde V_0 es el volumen del compartimento receptor, A es el área de difusión (0.64 cm²), V es el volumen de muestreo, C_n es la concentración de clorhidrato de proparacaína en la cámara receptora en diferentes intervalos de tiempo, y C_i es la concentración de clorhidrato de proparacaína en la cámara receptora antes de la determinación (78).

Ecuación 1. Cantidad acumulada permeada.

$$Qn = \frac{V_0}{A}\left(C_n + \frac{V}{V_0}\sum_{i=1}^{n-1} C_i\right)$$

La velocidad de permeación del clorhidrato de proparacaína en condiciones infinitas se determinó mediante el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}, cm/s) y el flujo en estado estacionario (J_{SS}, µg/h/cm^2) usando las Ecuaciones 2 y 3.

En las Ecuaciones 2 y 3, *ΔQ/Δt* (µg/min) representa la pendiente la zona lineal correspondiente al estado estacionario de la gráfica de la cantidad acumulada de clorhidrato de proparacaína en función del tiempo. El valor de C_0 es la concentración inicial de clorhidrato de proparacaína en la cámara donadora, *A* es el área de difusión (0.64 cm^2), y el factor 60 se utiliza para convertir el tiempo de minutos a segundos (75,78,79,81,86,95,195,196). El tiempo de latencia (T_L, h) se calculó como el intercepto en el eje *x* de la función lineal (112,187).

Ecuación 2. Coeficiente de permeabilidad aparente.

$$Papp = \frac{\Delta Q}{\Delta t\ x\ C_0 x\ A\ x\ 60}$$

Ecuación 3. El flujo en estado estacionario.

$$Jss = P_{app} x\ C_0$$

Por otro lado, el flujo (J) del clorhidrato de proparacaína bajo condiciones de dosis finita se calculó a partir de la cantidad acumulada del compuesto que atravesó la membrana en un intervalo de tiempo determinado, en relación con el área de difusión (Ecuación 4). Este método permite determinar el flujo en términos de masa permeada por unidad de área y tiempo (µg/cm^2/min) (126).

Ecuación 4. Flujo.

$$J = \frac{Q}{t\ x\ A}$$

Mientras que el flujo puede calcularse en cualquier momento, incluyendo la fase de inducción, el flujo en estado estacionario se mide exclusivamente una vez alcanzado este estado (126). En términos de uso, J se emplea para una evaluación general de la permeación en cualquier punto del experimento, mientras que J_{SS} es más útil para describir

la permeación en condiciones estacionarias, siendo más relevante para comparar sistemas o formulaciones.

Una vez realizada la cuantificación del clorhidrato de proparacaína a partir del producto y como activo, se graficó la cantidad acumulada de fármaco permeado frente al tiempo. Para el activo en dosis infinita, se calcularon parámetros clave como la cantidad acumulada permeada (Qn), el P_{app} y el flujo en el estado estacionario (J_{SS}). Para el producto en dosis finita, en condiciones de abuso y el activo a una concentración de 4.5 mg/mL, se determinaron la cantidad acumulada permeada (Qn) y el flujo a las cuatro horas (J4), a partir de las mediciones realizadas.

Con los resultados obtenidos de estos cálculos, junto con los datos derivados de la evaluación histopatológica de las muestras, se realizaron análisis estadísticos para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los controles y cada una de las condiciones evaluadas.

Para los resultados de permeación, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías con medidas repetidas, complementado con comparaciones post-hoc, para evaluar las diferencias medias en los parámetros estudiados. Se consideraron significativas aquellas diferencias con un valor de $p < 0.05$. Estos análisis, detallados en el Anexo B, permitieron identificar el impacto del tiempo, la dosis y su interacción en la cantidad acumulada permeada.

En los resultados de irritación se evaluaron seis tratamientos: 53.15 mg/mL (dosis infinita del compuesto activo), 4.5 mg/mL (producto, dosis de abuso), 4.5 mg/mL (activo), 2.25 mg/mL (producto, dosis finita), PBS (control negativo) y etanol al 99.5% (control positivo). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y las lesiones histológicas fueron evaluadas mediante microscopía óptica en cuatro campos, según lo indicado en la Tabla 3, con su respectiva gradación.

Se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Dado que estos supuestos no se cumplieron, el análisis de las lesiones corneales y su gradación se llevó a cabo utilizando pruebas estadísticas no paramétricas (Kruskal-Wallis), con un nivel de significancia de 0.05, evidenciando diferencias significativas entre tratamientos. Para identificar las diferencias

específicas entre los tratamientos de irritación, se aplicó la prueba de Dunn los resultados se representaron en un mapa de calor y para visualizar estas diferencias, se utilizó un *box plot*.

Dado que los datos de irritación no presentaron una distribución normal, mientras que los datos de permeación sí mostraron un comportamiento acorde con la normalidad, se empleó la prueba de correlación de Spearman, adecuada para variables no paramétricas. El análisis se realizó utilizando exclusivamente los valores individuales de permeación a las 4 horas (Q_4), sin aplicar promedios, correlacionando directamente las tres réplicas experimentales de permeación con las 3 réplicas y cuatro repeticiones correspondientes a los datos de irritación, para los siguientes tratamientos: 53.15 mg/mL (dosis infinita del compuesto activo), 4.5 mg/mL (producto, dosis de abuso), 4.5 mg/mL (compuesto activo) y 2.25 mg/mL (producto, dosis finita). Este enfoque permitió determinar relación entre la permeabilidad corneal y la respuesta de irritación inducida por cada concentración.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el software R (versión 4.4.2) y Microsoft Excel (Office 365), asegurando la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Capítulo 3. Resultados y discusión

Para la realización de los ensayos de permeación e irritación corneal, se trabajó con 18 córneas, manejadas bajo las condiciones descritas en la metodología. Se establecieron parámetros experimentales clave para garantizar la reproducibilidad de los resultados, incluyendo la selección del medio de difusión, la temperatura, la velocidad de agitación y la frecuencia de muestreo, entre otros. Además, se verificó la integridad de la membrana corneal antes y después de los experimentos, asegurando que la exposición a las diferentes condiciones no comprometiera su estructura.

A continuación, se presentan los resultados de los ensayos de permeación e irritación, resaltando las diferencias en la respuesta corneal frente a las distintas concentraciones de clorhidrato de proparacaína y su formulación comercial. Se analiza el comportamiento de permeación, la influencia de los excipientes en la absorción del fármaco y las alteraciones estructurales del tejido corneal.

3.1 Definición de las condiciones del ensayo de permeación corneal

En este estudio, se evaluaron diversos parámetros experimentales que pueden influir en la reproducibilidad de los resultados de permeación. Se analizaron la velocidad de agitación y el tipo de agitador, así como la temperatura para simular condiciones fisiológicas. También se consideraron la frecuencia y cantidad de muestras recolectadas, la elección del medio para definir el perfil de permeación. Además, se verificó la integridad de la membrana para descartar alteraciones estructurales y el tiempo de experimentación. Finalmente, se aseguraron condiciones s*ink* para mantener una difusión continua del activo.

Configuración del montaje

Los estudios preliminares comenzaron con el establecimiento del montaje experimental (Figura 13), definiendo condiciones clave como la temperatura, la velocidad de agitación y otras variables críticas. Esta configuración permitió un control preciso de los parámetros experimentales.

Velocidad de agitación y tipo de agitador

La velocidad de agitación es fundamental para estandarizar el ensayo, ya que afecta parámetros clave como el mantenimiento del equilibrio de la temperatura en la celda de Franz. Además, la eficiencia de la agitación determina la uniformidad en la distribución del fármaco en la cámara receptora, asegurando condiciones homogéneas que favorecen la reproducibilidad y exactitud de los resultados. El peso y el tamaño del agitador también desempeñan un papel en la eficiencia de mezcla; a mayor tamaño y peso, se mejora la uniformidad en el compartimento receptor, pero también aumenta el riesgo de formación de vórtices, especialmente a velocidades más altas (185,197). La formación de vórtices puede interrumpir las condiciones s*ink* al crear zonas de alta concentración o variabilidad en la mezcla, lo que a su vez afecta la capa límite y altera la difusión establecida bajo las condiciones de la ley de difusión de Fick (126,185).

La agitación en el compartimento receptor influye en la velocidad de difusión del fármaco al evitar la acumulación del fármaco cerca de la membrana, lo que ralentizaría el proceso, asegurando así una difusión continua y uniforme del fármaco a través de la córnea (197). En el contexto de estudios de permeación, se observa que el rango adecuado de

velocidades puede variar considerablemente, pero el control de este parámetro es esencial para minimizar la variabilidad (185,197).

La velocidad de agitación utilizada en los ensayos de permeación reportados en diversos estudios está entre 100-200 rpm (80,89,90,92,94,112,187,198,199). Además, considerando los objetivos de esta investigación en simular condiciones *in vivo*, es crucial tomar en cuenta también la información disponible en la literatura científica como lo son los parámetros fisiológicos relevantes (45).

La tasa promedio de producción de humor acuoso (HA) es de 2,0 a 2,5 µl/min y la tasa de renovación del volumen del humor acuoso es aproximadamente del 1 % por minuto, es decir que en 100 minutos se produce su recambio total (200). Resulta fundamental extrapolar esta información para definir una velocidad de agitación que se asemeje más a las condiciones fisiológicas. Considerando todos los parámetros relevantes y tras estudios preliminares, se seleccionó una velocidad de 240 rpm utilizando un agitador de dimensiones 8x3 mm, asegurando que no se afectara la integridad de la membrana ni se generaran vórtices que pudieran interferir con el proceso de permeación.

Temperatura

Durante el proceso de muestreo en los estudios de permeación, pueden ocurrir fluctuaciones de temperatura, lo cual motivó la realización de estudios preliminares para monitorear y detectar estos cambios (185). La literatura indica que la temperatura de la córnea humana central suele ser de aproximadamente 34-35 °C, y se ve influenciada por el ambiente, el cuerpo y el volumen de lágrimas (201). Sin embargo, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y otros estudios establecen una temperatura promedio de 32°C ± 0.5 para la superficie corneal *in vivo* (102,112,187).

La temperatura es crucial para las funciones biológicas, ya que influye en la velocidad de los procesos metabólicos; temperaturas elevadas pueden desnaturalizar proteínas, mientras que temperaturas bajas pueden comprometer la integridad de los tejidos (202). Ensayos preliminares demostraron que, en el caso de las córneas, la exposición a bajas temperaturas junto con la solución de clorhidrato de proparacaína y sus excipientes, afectaba el epitelio y aumentaba la permeabilidad cuando el tejido no se dejaba estabilizar térmicamente antes del ensayo (203). En este contexto, y considerando que el transporte del globo ocular se realizó a bajas temperaturas, era fundamental que las córneas

alcanzaran un equilibrio térmico adecuado antes de iniciar el ensayo para preservar su integridad estructural.

Para evaluar cualitativamente las condiciones del ensayo, como la temperatura y la velocidad de agitación, se realizaron estudios preliminares con fluoresceína sódica y agua destilada como medio de difusión. Esto permitió observar visualmente los cambios de color en el compartimento receptor sin necesidad de cuantificación. La intensidad de la coloración en el receptor se utilizó como indicador visual de la permeabilidad, y se observó que esta aumentaba con mayores temperaturas y velocidades de agitación (Figura 15). En este contexto, se seleccionó una temperatura de 32°C en la córnea, para simular las condiciones fisiológicas de la córnea.

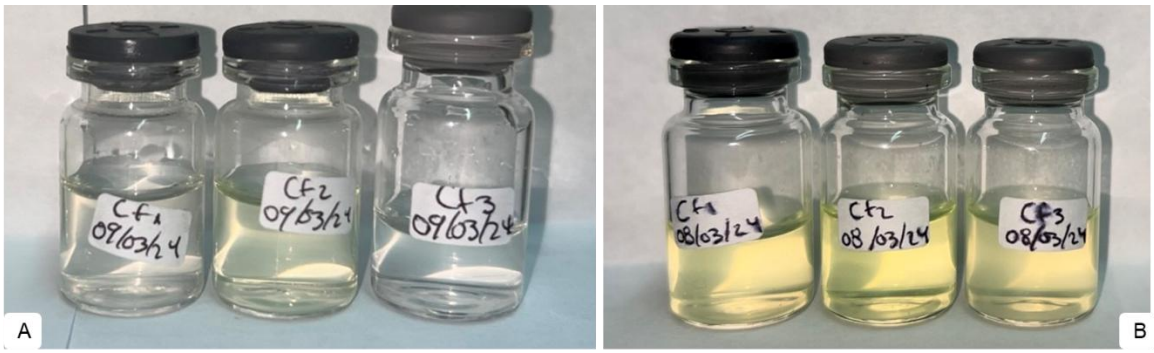

Figura 15. Imágenes fotográficas de muestras de ensayos preliminares de permeación corneal con fluoresceína sódica: A) velocidad de 240 rpm y temperatura de 32°C, y B) velocidad de 480 rpm y temperatura de 34°C. Fuente: autor.

Frecuencia de muestreo, volumen de recolección y selección del medio de difusión

Se recolectaron volúmenes de 500 µL en los tiempos de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 4 horas, asegurando no exceder el volumen total de muestreo de 500 µL según PermeGear, para evitar la formación de burbujas que pudieran afectar la difusión (126). El volumen de muestreo fue pequeño para no perturbar significativamente el volumen del compartimento receptor, y lo suficientemente grande para permitir una cuantificación exacta del fármaco; además se comprobó que esta cantidad evitaba el ingreso de burbujas al medio que impidieran la difusión (45,126). Estos intervalos fueron seleccionados para capturar con precisión la dinámica de permeación del compuesto a través de la córnea.

Es fundamental mantener constante el efecto de dilución en el compartimento receptor para preservar las condiciones s*ink* y garantizar una permeación adecuada. Estas condiciones no solo cumplen con los estándares internacionales, sino que también optimizan la precisión en los cálculos de permeabilidad aparente (P_{app}) y flujo estacionario (J_{SS}), contribuyendo a la validez general de los datos obtenidos. Por ello, tras cada muestreo, el volumen extraído se repuso inmediatamente con medio receptor fresco a la misma temperatura, manteniendo así el equilibrio en el sistema (45,126).

Para el medio de difusión, se seleccionó PBS por su capacidad para mantener un pH 7.4 igual al fisiológico y su compatibilidad con el tejido corneal, lo que permite replicar condiciones similares a las del entorno fisiológico (210).

Evaluación histológica de la integridad corneal y definición del tiempo de experimentación

Los hallazgos histológicos del estudio de integridad corneal muestran que la córnea control, sin exposición a PBS y sumergida en formol lo más rápido posible tras el sacrificio del animal, presenta una estructura intacta, con epitelio continuo y endotelio sin alteraciones. El estroma exhibe fibras colágenas organizadas con espacios interlamelares normales, los cuales forman parte de la arquitectura fisiológica del tejido y no deben confundirse con edema (Figura 16-A).

En este estudio, se tuvo acceso a los cerdos 30 minutos después de su muerte, extrayendo cada ojo en un tiempo aproximado de 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron transportadas al laboratorio en una hora. Todo el procedimiento se llevó a cabo con la mayor rapidez posible para minimizar los cambios *post mortem.*

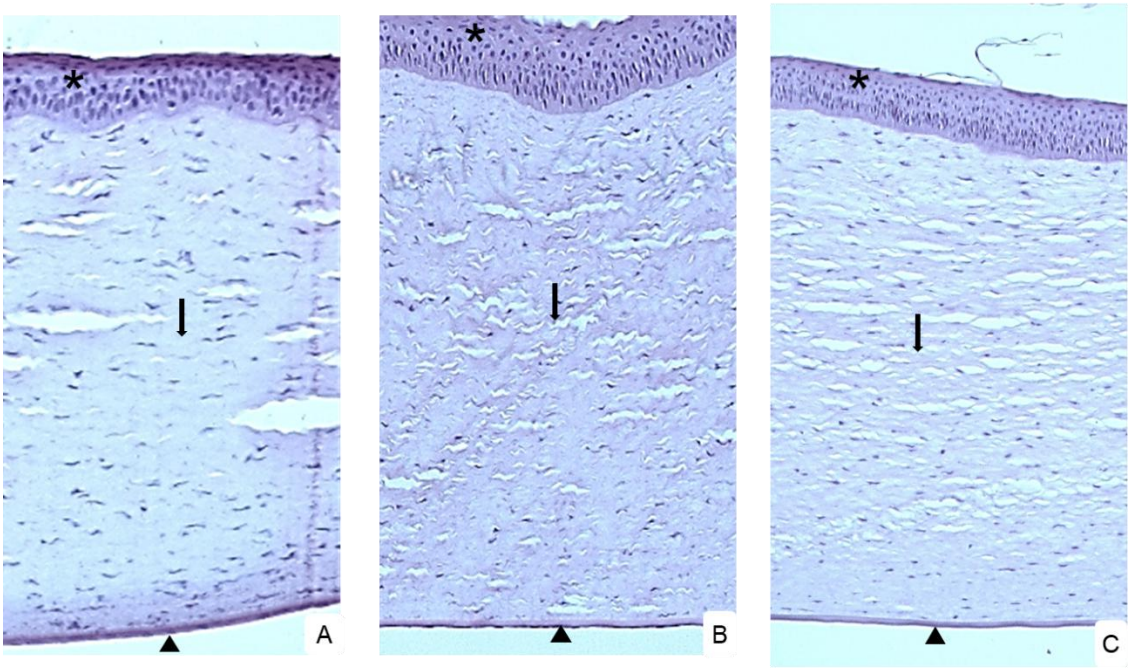

Figura 16. Comparación histológica de córneas sometidas a diferentes condiciones. Tinción H&E. Se observa continuidad del epitelio (estrella), estroma (flecha) y del endotelio (triángulo). (A) Córnea antes del montaje en la celda de Franz y sin exposición a PBS (30 min *post mortem*, 5 minutos de extracción). (B) Córnea transportada en PBS con características similares a (A) (35 min *post mortem*, 5 minutos de extracción, 1 hora de transporte antes de la fijación en formol). (C) Córnea expuesta a PBS e incubada en celdas de Franz por 6 horas bajo las condiciones del ensayo (40 min *post mortem*, 5 min de extracción, 1 hora de transporte y 6 horas en las celdas antes de fijarla al formol). Los espacios interlamelares observados en el estroma se consideran normales. Fuente: autor.

En la córnea transportada al laboratorio en solución de PBS bajo condiciones de refrigeración y sin montaje en celdas de Franz, se observaron características similares a las del control, sin descamación ni cambios estructurales significativos. Esto sugiere que el contacto con PBS y/o el tiempo transcurrido desde la extracción hasta el inicio del ensayo no afectaron de manera relevante la integridad corneal (Figura 16-B).

Después de 6 horas de permeación en celdas de Franz, se identifica un epitelio con espongiosis leve, especialmente en la región basal, y pérdida de continuidad en algunas zonas de endotelio (no señalado en la Figura). En el estroma se observan focos con leve separación de las fibras colágenas (Figura 16-C).

Es importante destacar que algunos de los espacios observados en el estroma pueden corresponder a artefactos histológicos derivados del procesamiento del tejido, así como a

la manipulación durante el montaje en la celda de Franz o la incisión del tejido, en lugar de cambios estructurales reales. Además, la descamación epitelial observada en algunas muestras podría estar relacionada con estos factores.

Para una correcta interpretación, es fundamental diferenciar estos hallazgos de los cambios asociados al edema corneal, el cual se caracteriza por la desorganización de las fibras colágenas en el estroma y el aumento de los espacios interlamelares debido a la acumulación de fluido.

Dado que no se observaron cambios significativos en el epitelio y el estroma en relación con el tiempo y el medio de transporte, estas zonas se definieron como las de mayor relevancia para evaluar modificaciones atribuibles a la irritación. En general, los resultados histológicos sugieren que la integridad corneal se mantiene hasta las seis horas de exposición en celdas de Franz con PBS como medio de difusión, sin comprometer significativamente su estructura.

Además, se observó que, tras 4 horas de exposición, los cambios histológicos eran similares a los observados a las 6 horas, pero de menor intensidad. Esto respalda el uso de PBS como medio de transporte en estudios de permeación e irritación durante 4 horas, garantizando la integridad del tejido bajo estas condiciones.

La duración total del experimento se estableció en cuatro horas, basado en lo explicado previamente, y en investigaciones que utilizaron las celdas de Franz con junta esmerilada esférica, que emplearon un tiempo de 4h en el experimento (77,79). Además, se tuvo en cuenta la estabilidad de la proparacaína, reportada en solución a temperatura ambiente durante 8 horas (186), lo que asegura que el fármaco no sufra una degradación significativa durante el ensayo.

Solubilidad del clorhidrato de proparacaína

La solubilidad del clorhidrato de proparacaína en PBS fue determinada experimentalmente en 53.152 mg/mL, bajo las condiciones descritas en la metodología. Este valor permitió definir las concentraciones del fármaco a utilizar en el estudio, asegurando el cumplimiento de las condiciones *sink* (aspecto que se abordará más adelante). Los valores de solubilidad reportados en la literatura son altamente variables, lo que puede atribuirse a diferencias en las condiciones experimentales, las cuales en muchos casos no se especifican.

El PBS favorece la solubilidad del clorhidrato de proparacaína debido a la relación entre su pH (7.4) y el valor de pKa del fármaco (8.96), lo que determina un alto grado de ionización (aproximadamente 97.3%) del compuesto en este medio (148,152–154). Dado que la forma ionizada es más hidrofílica, el fármaco presenta una mayor solubilidad en agua en comparación con solventes más apolares. Esto explica por qué su solubilidad en PBS (53.152 mg/mL) es considerablemente superior a la registrada en solventes orgánicos como etanol (7 mg/mL) o acetato de etilo (<0.1 mg/mL) (149).

Aunque la solubilidad del clorhidrato de proparacaína en PBS se determinó a temperatura ambiente (menor que la empleada en los ensayos de permeación, donde se usaron 32°C en la córnea), este aspecto no influye negativamente en la decisión tomada respecto a garantizar las condiciones sink, considerando que para este activo la solubilidad aumenta con la temperatura. Adicionalmente, bajo estas condiciones el PBS ha demostrado ser un vehículo eficiente para la disolución del compuesto, respaldando su empleo en ensayos de permeación corneal y su amplia aceptación en la literatura científica revisada (73,76,77,80,84,92,95,195,199,204–206).

Condiciones s*ink*

De acuerdo con lo explicado en la metodología, para el cálculo de las concentraciones a emplear en los estudios de permeación se tomó como referencia el resultado de solubilidad encontrado experimentalmente, 53,152 mg/mL. Con base en esta información, se estimó que las condiciones s*ink* se cumplirían si la concentración en el compartimento receptor se mantenía por debajo del 10% de este valor de solubilidad. De esta manera se verificaron que las concentraciones de fármaco a emplear en el estudio, bajo las condiciones de medio definidas, garantizaran las condiciones de no saturabilidad (condiciones s*ink*).

En el experimento de permeación con dosis infinita de proparacaína, la cantidad promedio permeada a las cuatro horas fue de 338.76 ± 22.28 µg/cm², valor que no supera el límite para mantener las condiciones s*ink* en el compartimento receptor (el 10% corresponde a 5,3 mg/mL), asegurando un gradiente de concentración constante y evitando la saturación del medio receptor durante todo el ensayo (112,128,187).

Mantener estas condiciones asegura que el flujo de permeación observado refleje una difusión pasiva y constante a lo largo del experimento. Esto no solo garantiza la confiabilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos, sino que también facilita futuras

correlaciones *in vitro-in vivo* y extrapolaciones, permitiendo hacer predicciones útiles de biodisponibilidad ocular en aplicaciones clínicas.

3.2 Evaluación de permeación del clorhidrato de proparacaína

Los ensayos realizados en celdas de Franz permitieron caracterizar el comportamiento de permeación del clorhidrato de proparacaína, tanto en su forma de reactivo analítico (activo) como en su formulación comercial (producto). El perfil de permeación en dosis infinita, representado en la Figura 17, evidencia una acumulación progresiva del fármaco en función del tiempo, alcanzando un valor máximo de 338.76 ± 22.28 µg/cm^2 a los 240 minutos.

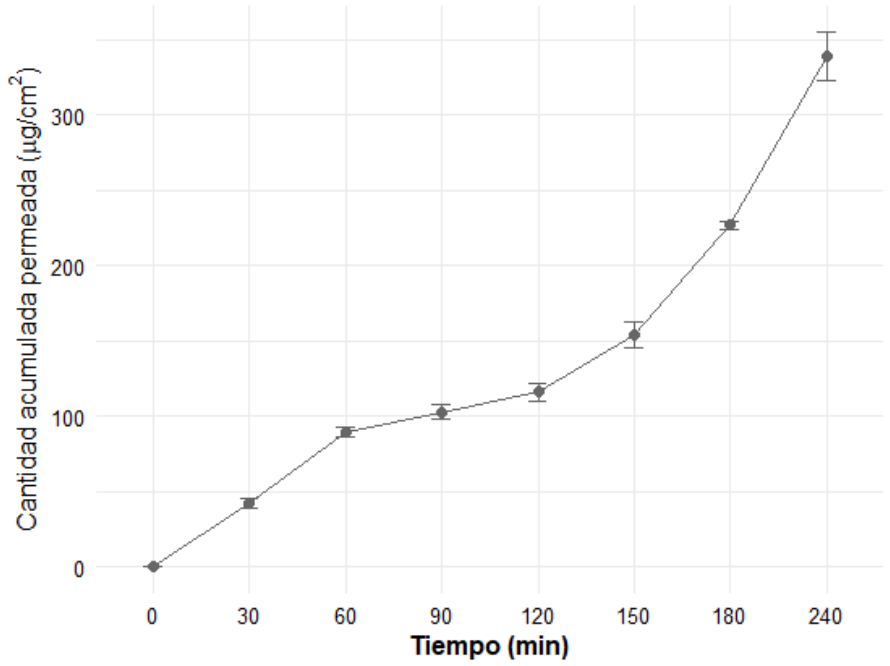

Figura 17. Perfil de permeación clorhidrato de proparacaína en dosis infinita (activo).

Estos resultados están en concordancia con los hallazgos del ANOVA de medidas repetidas (Anexo B), que identificó cambios significativos en la cantidad acumulada permeada a lo largo del tiempo. Aunque el perfil sugiere inicialmente un incremento constante en la cantidad acumulada, la permeación no sigue estrictamente una cinética lineal. Factores como la difusión del fármaco, el establecimiento gradual del flujo

estacionario, y el tiempo de latencia (T_L), determinado por la interacción del compuesto con la membrana, influyen en la dinámica observada. Estos elementos resaltan la importancia de evaluar no solo los efectos individuales, sino también las interacciones entre las variables estudiadas, como se analizó en el ANOVA de tres vías (Anexo B).

La Figura 18 presenta los perfiles de permeación del clorhidrato de proparacaína a través de la córnea porcina, comparando tres condiciones experimentales: el principio activo a 4.5 mg/mL (A-4.5 mg/mL), el producto comercial a 2.25 mg/mL (P-2.25 mg/mL) y el producto comercial en condiciones de abuso a 4.5 mg/mL (P-4.5 mg/mL). Las curvas permiten visualizar la influencia de la concentración sobre la permeabilidad corneal del fármaco.

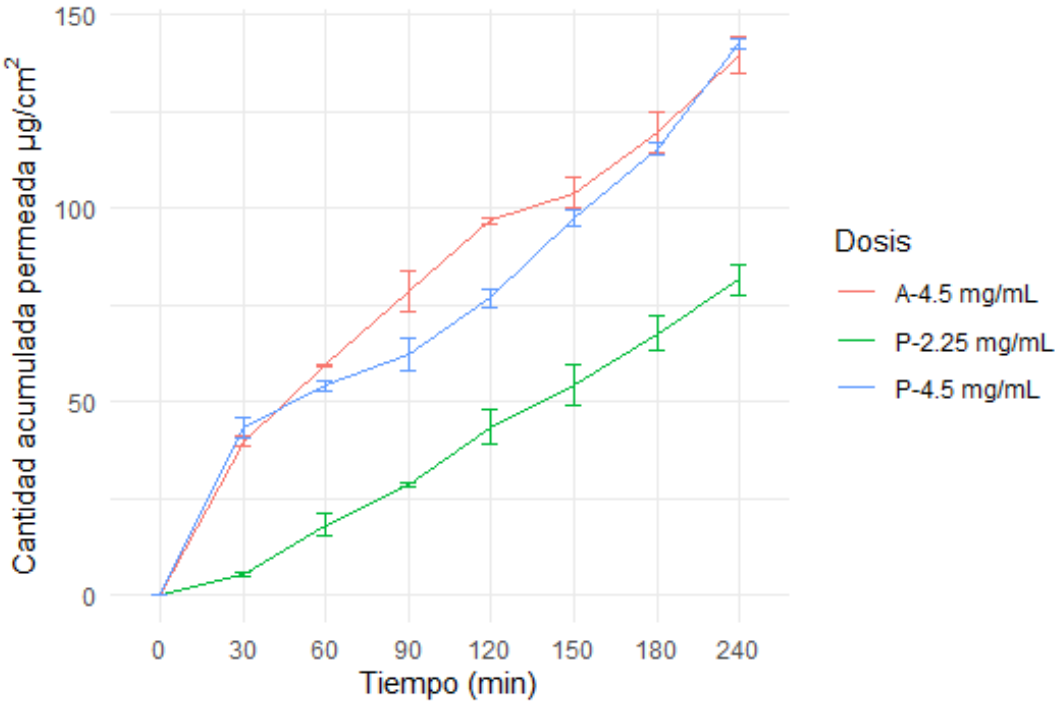

Figura 18. Perfiles de permeación del clorhidrato de proparacaína a dos niveles de concentración (2,25 y 4,5 mg/mL), a partir del producto (P) y empleando al activo solo (A).

Como se observa en la figura 18, las tres curvas presentan un incremento progresivo en la cantidad permeada a lo largo del tiempo, lo que sugiere una posible tendencia lineal. Sin embargo, para confirmar el tipo de cinética involucrada, es necesario ajustar los datos a modelos matemáticos específicos. Al comparar las concentraciones más bajas, se evidencia una diferencia notable en la cantidad acumulada de fármaco permeado entre la

formulación comercial a 4.5 mg/mL (dosis de abuso) y la de 2.25 mg/mL (dosis de uso clínico o dosis finita). Esta diferencia puede atribuirse al mayor gradiente de concentración generado por la dosis más alta, lo que incrementa la velocidad de difusión del fármaco a través de la córnea, en concordancia con lo descrito en estudios previos sobre permeación de fármacos oftálmicos (155).

En investigaciones sobre la difusión de fármacos semisólidos, como el aciclovir en ungüentos oftálmicos, han reportado una relación directa entre la concentración en el compartimento donador y la cantidad acumulada de fármaco permeado, resaltando la importancia del gradiente de concentración en la difusión pasiva (77). Asimismo, estudios con formulaciones oftálmicas como las de loteprednol etabonato han demostrado que la permeabilidad corneal se ajusta a modelos de cinética de orden cero cuando la concentración en el compartimento donador es suficientemente alta para mantener un flujo constante del fármaco (79).

Por otro lado, en la dosis finita de 2.25 mg/mL, la cantidad acumulada permeada fue significativamente menor, alcanzando solo 81.49 µg/cm² a las 4 horas. Estos resultados están en concordancia con los hallazgos del ANOVA de tres vías (Anexo B), el cual confirmó que tanto la concentración inicial como el tiempo tienen un efecto significativo en la permeación del fármaco. Sin embargo, al comparar el producto con el activo a la misma concentración, no se evidenciaron diferencias significativas a las cuatro horas, lo que indica que la velocidad de permeación en este punto está más influenciada por el gradiente de concentración que por la composición del producto.

En este contexto, los resultados de las comparaciones post-hoc (Anexo B) respaldan que los excipientes presentes en la formulación no tienen un impacto significativo en la permeación a corto plazo. Al comparar el producto comercial en su dosis de abuso con el clorhidrato de proparacaína como activo, no se observaron diferencias significativas entre el activo a 4.5 mg/mL y el producto a 4.5 mg/mL ($p=0.7785$), lo que sugiere que la composición de la formulación no modifica sustancialmente la permeación en esta concentración.

Por otro lado, las comparaciones entre el activo a 4.5 mg/mL y el producto a 2.25 mg/mL ($p<0.0001$), así como entre el producto a 2.25 mg/mL y el producto a 4.5 mg/mL ($p=0.0002$), mostraron diferencias significativas en la cantidad acumulada permeada. Sin

embargo, estas diferencias pueden atribuirse al gradiente de concentración más que a la formulación, ya que al comparar las muestras a la misma concentración no se evidencian cambios relevantes en la permeabilidad del fármaco.

Para complementar este análisis, se realizó un cálculo del factor de similitud (f2) entre el activo y el producto a 4.5 mg/mL, con el objetivo de comparar los perfiles de permeación en toda la curva, obteniéndose un valor de 50.4. Este resultado indica que los perfiles de permeación entre el producto comercial y el activo a la misma concentración pueden considerarse similares. La comparación mediante f2 es un criterio adoptado por varias guías de la FDA para evaluar la similitud entre perfiles de disolución, estableciendo que un valor de f2 ≥ 50 sugiere similitud entre los perfiles analizados (207). En consecuencia, bajo las condiciones evaluadas en este estudio, la formulación no parece alterar significativamente la cinética de permeación del fármaco.

Lo anterior refuerza la conclusión de que la permeabilidad está determinada principalmente por el gradiente de concentración y no por la composición de la formulación. En consecuencia, bajo las condiciones evaluadas en este estudio, la formulación no parece alterar significativamente la cinética de permeación del fármaco.

Los resultados presentados en la Tabla 4 muestran los valores de parámetros clave, como el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}), el flujo en estado estacionario (J_{SS}) y el tiempo de latencia (T_L), determinados a partir de los perfiles de permeación, cuyo procedimiento para el cálculo se describió en la metodología.

Se obtuvo un valor de P_{app} de 9.33 x10^{-7} ± 0.04 cm/s, dentro del rango de 10^{-7} a 10^{-5} cm/s reportado para la baja permeabilidad de la córnea (28). El P_{app} de la proparacaína podría estar en concordancia con los valores reportados para moléculas que cuentan con una lipofilia moderada para atravesar las capas corneales, considerando sus similitudes estructurales con otros anestésicos locales de peso molecular y coeficiente de reparto comparables, los cuales también muestran una fuerte dependencia del epitelio como barrera limitante (155). Se realizó una revisión de la literatura sin hallar un valor específico de P_{app} para el clorhidrato de proparacaína en sistemas de difusión con celdas de Franz y en condiciones experimentales equivalentes. Sin embargo, en condiciones de coadministración con timolol, se encontró un P_{app} para la proparacaína de 21.58 ± 1.04 x

10-6 (156) lo cual indicaría que el timolol estaría actuando como un potenciador de permeación, reduciendo la resistencia de las capas corneales y permitiendo una permeabilidad más eficiente.

Tabla 4. Parámetros de permeación.

Concentración (mg/mL)	P_{app} (cm/s)	J_{SS} (µg/h/cm^2)	J4 (µg/cm^2/min)	T_L (h)	Q4 (µg/cm^2)
53.152 (dosis infinita -activo)	9.33 x10^{-7} ± 0.04	1.78 x10^{+2} ± 0.00023	-	1.5	338.76 ± 22.28
4.5 (dosis de abuso - activo)	-	-	0.90 ± 0.04	-	139.61 ± 6.37
4.5 (dosis abuso-producto)	-	-	0.92 ± 0.01	-	142.69 ± 1.88
2.25 (dosis finita-producto)	-	-	0.53 ± 0.03	-	81.49 ± 5.88

Datos presentados como promedio, ± σ y n=3.Tiempo de latencia (T_L), el flujo en estado estacionario (J_{SS}), J4 representa el flujo en esas condiciones y no un valor constante (J4) y cantidad acumulada permeada (Q4) obtenidos de las 4 horas del ensayo de permeación.

En un estudio comparable al realizado en esta investigación, la tetracaína mostró un P_{app} de 1.5 x10^{-6} cm/s en córnea de conejo bajo condiciones de ensayo que incluyeron concentraciones de 0.25%, 0.5% y 1% en lágrimas artificiales ajustadas a un pH de 7.15. La permeación se favoreció mediante agitación constante a 35°C, y la evaluación se realizó en una cámara de metacrilato, con recolección de muestras en intervalos de hasta 60 minutos (122). Las diferencias en la configuración experimental, especialmente en la temperatura, pueden explicar en parte el mayor P_{app} observado para la tetracaína en comparación con la proparacaína. Sin embargo, también es importante considerar que la tetracaína posee propiedades fisicoquímicas favorables, equilibrio hidrofílico-lipofílico distinto, asi como un pKa más cercano al fisiológico (8.5) y un log D de 2.73, que en conjunto podrían contribuir a una mayor fracción no ionizada y a una mayor lipofilia a pH 7.4, favoreciendo su difusión a través de la barrera lipídica corneal.

Por otro lado, los estudios publicados de permeabilidad de la proparacaína muestran una marcada variabilidad en las condiciones experimentales, lo que dificulta la comparación directa de los resultados. Por ejemplo, Dincel et al. en 2007, midieron la concentración de proparacaína en humor acuoso humano utilizando HPLC-UV, obteniendo valores entre 80,21 y 459,00 ng/mL, tras la aplicación tópica del colirio Alcaine 0,5 % (208). Por otro lado, Latreille et al. en 2015, emplearon un método LC-MS/MS para analizar matrices oculares de conejo y detectaron concentraciones en niveles subnanomolares, reflejando las limitaciones de penetración de la córnea debido a su barrera fisiológica (209). Estas diferencias metodológicas *in vivo-ex vivo*, distintas especies y técnicas de cuantificación, evidencian la necesidad de estandarizar los protocolos para obtener datos comparables.

Los anestésicos locales son bases débiles con valores de pKa entre 7.6 y 9.2 (153). El pKa determina la proporción de moléculas ionizadas y no ionizadas a un pH dado. La forma no ionizada (base conjugada) es la que puede atravesar las membranas lipídicas, mientras que la forma ionizada se une al canal de sodio para ejercer su efecto (210). La proparacaína es un anestésico local del tipo éster con un pKa de 8.96, considerablemente más alto que el pH fisiológico del ojo (7.4). Esta diferencia provoca que, en condiciones fisiológicas, el 97.32% de la molécula se encuentre en su forma ionizada (hidrofílica), mientras que solo el 2.68% permanece en su forma no ionizada (lipofílica), que es la fracción capaz de atravesar la barrera lipídica del epitelio corneal por difusión pasiva (153,210). Dado que solo la forma no ionizada puede difundirse eficazmente a través de membranas celulares, y a pesar de que este equilibrio de disociación es dinámico, este bajo porcentaje podría sugerir una permeación limitada.

Este comportamiento se ve reflejado en los resultados experimentales obtenidos, donde la proparacaína mostró una P_{app} de 9.33 $x10^{-7}$ cm/s. Este valor, en comparación con otras moléculas más lipofílicas o con pKa más cercanos al pH fisiológico, confirma que la fracción no ionizada, aunque pequeña, es farmacológicamente significativa en el contexto ocular. Fármacos con un pKa más próximo a 7.4 presentan una mayor fracción no ionizada y, por ende, una permeación más rápida, como ocurre con lidocaína (pKa 7.8) (152).

Además del pKa, otro factor determinante en la permeabilidad corneal es la lipofilia del fármaco, expresada a través del log D a pH 7.4, ya que este parámetro considera tanto la distribución lipídica del fármaco como su grado de ionización a ese pH. Se ha establecido

que un log D entre 2 y 3 representa el rango óptimo para favorecer un equilibrio entre solubilidad en la fase acuosa y difusión a través del epitelio corneal (28). En este contexto, la tetracaína presenta un log D de 2.73, la lidocaína de 2.26 y la proparacaína de 2.05 a pH 7.4, lo que indica que las tres se encuentran dentro del rango ideal de lipofilia para permeación corneal. No obstante, los compuestos con log D más alto, pueden mostrar una mayor retención en las capas lipofílicas del epitelio corneal, dificultando su paso hacia el medio hidrofílico del estroma, lo cual puede reducir su permeabilidad a través de toda la córnea (211,212).

En este contexto, la permeabilidad corneal de la proparacaína y la tetracaína está influenciada por el equilibrio entre sus formas ionizadas y no ionizadas a pH fisiológico, lo cual se refleja en su log D y en su P_{app}. La tetracaína, con un log D de 2.73 y un pKa de 8.5, presenta una mayor lipofilia y una fracción no ionizada de aproximadamente 7.35% a pH 7.4, lo que favorece su difusión pasiva a través de las membranas lipídicas del epitelio corneal. En consecuencia, la tetracaína muestra una P_{app} de 1.5×10^{-6} cm/s (155), superior a la de la proparacaína, cuya log D es de 2.05 y su pKa de 8.96 implica una fracción no ionizada significativamente menor, de tan solo 2.68%, bajo el mismo pH.

La absorción corneal de los anestésicos locales depende tanto de su lipofilia como de su grado de ionización a pH fisiológico, ya que estos factores determinan la fracción disponible para atravesar la barrera epitelial. Aunque se busca una rápida penetración corneal para un inicio de acción eficaz, también es importante que parte del fármaco permanezca retenido en la córnea para prolongar su efecto. Por ello, un equilibrio en la lipofilia es esencial, valores extremos pueden limitar la solubilidad en la lágrima o la permeación epitelial (152). Además, excipientes, potenciadores de permeación y la formulación también influyen en la absorción ocular (37).

Por otro lado, el flujo en estado estacionario de permeación (J_{SS}) obtenido para el clorhidrato de proparacaína ($1.78 \times 10^{+2}$ µg/h/cm^2), representa la capacidad intrínseca del compuesto para atravesar la membrana en condiciones de equilibrio dinámico, una vez alcanzado el estado estacionario. Como se establece en estudios de difusión, J_{SS} se mantiene constante tras la fase de inducción, por lo que es un parámetro clave para comparar sistemas de permeación en condiciones estacionarias.

En ausencia de valores de referencia específicos para J_{SS} y P_{app}, los datos obtenidos pueden servir como base para futuros estudios, comparando con otros principios activos, sus aplicaciones en formulaciones oftálmicas, e incluso para establecer correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas del fármaco y su permeación corneal. Asimismo, estos resultados destacan la necesidad de realizar análisis complementarios que validen su relevancia biológica y predictiva.

En condiciones de dosis finita, el flujo de permeación no es constante y depende de la concentración remanente en el compartimento donador. En este caso, el flujo calculado a los 240 minutos (J4) refleja la cantidad acumulada de fármaco que ha permeado hasta ese momento, pero no representa un estado estacionario. Según los resultados obtenidos (Tabla 4), una mayor concentración inicial favoreció una mayor permeación total, debido a la relación directa entre el gradiente de concentración y la difusión. En contraste, la dosis finita del producto a 2.25 mg/mL presentó un J4 menor, lo que se explica por la reducción del gradiente de concentración con el tiempo, disminuyendo progresivamente la cantidad permeada en etapas avanzadas del ensayo.

Por otro lado, el T_L obtenido en condiciones de dosis infinita (1.5 h) representa el tiempo requerido para alcanzar J_{SS}. Este retraso puede atribuirse a la interacción inicial del fármaco con las capas lipofílicas del epitelio corneal, donde se genera una barrera selectiva basada en la lipofilia y el equilibrio de disociación del compuesto. En esta zona, la proparacaína al estar en su mayoría en forma ionizada a pH fisiológico, requiere alcanzar un equilibrio local que favorezca la fracción no ionizada capaz de difundir pasivamente. Posteriormente, al atravesar el estroma hidrofílico, ocurre un nuevo ajuste en el equilibrio de disociación, favoreciendo la forma ionizada. Este proceso escalonado de reequilibrio entre formas ionizada y no ionizada en función del pH y la naturaleza de cada capa corneal (epitelio, estroma y endotelio) podría contribuir al retraso observado en el establecimiento de J_{SS}. Por tanto, un T_L prolongado sugiere no solo una interacción significativa con la membrana epitelial, sino también un proceso dinámico de redistribución y disociación del fármaco a lo largo del tejido, en coherencia con su dependencia de la lipofilia y del pKa.

Este comportamiento está estrechamente relacionado con la estructura anfifílica de la proparacaína, compuesta por un anillo aromático lipofílico, un enlace éster y una amina terciaria hidrofílica, que le permite interactuar tanto con zonas lipídicas (epitelio y endotelio) como con el estroma hidrofílico de la córnea (158,159). Esta característica es común en

muchos compuestos anfifílicos, cuya interacción con las membranas celulares depende del balance hidrófilo-lipofílico (HLB) y de la separación espacial de sus fracciones polares y apolares, que determinan su comportamiento en medios biológicos (213).

Además, debido a la naturaleza del tejido corneal y las características del fármaco en condiciones de dosis infinita, es posible que la permeación se vea afectada por factores adicionales, como la saturación local en el tejido o la resistencia de las capas internas. Esta hipótesis puede verificarse mediante un método de extracción del fármaco retenido en la membrana corneal. En investigaciones previas, se ha empleado un procedimiento que implica la limpieza superficial del tejido, seguido de perforación y homogeneización, para luego extraer el fármaco con PBS bajo sonicación; permitiendo determinar la cantidad de fármaco retenida en las distintas capas corneales y evaluar así la permeación efectiva y acumulación del compuesto en el tejido, lo que proporciona una estimación precisa del comportamiento del fármaco en el tejido (112,187).

El estudio de Toffoletto et al. subraya la importancia de evaluar la permeabilidad y acumulación de fármacos en estudios *ex vivo*. La acumulación de un fármaco en la córnea puede prolongar su efecto terapéutico, ya que la córnea actúa como un reservorio que permite la liberación gradual del fármaco. Esta retención depende de la estructura asimétrica de la córnea, donde las capas externas (epitelio) y las internas (endotelio) presentan diferentes permeabilidades y funciones, influyendo en cómo el fármaco se almacena y se difunde. Este estudio también destaca la importancia de evaluar la acumulación de fármacos en los tejidos oculares, dado que una mayor retención en la córnea puede traducirse en una mayor duración del efecto, lo cual es especialmente relevante en el diseño de sistemas de liberación controlada (214).

3.3 Lesiones histológicas asociadas al potencial irritante ocular del clorhidrato de proparacaína

Los modelos *in vivo* que han sido empleados para valorar el potencial de irritación ocular de las sustancias químicas determinan lesiones sobre tres tejidos oculares: conjuntiva, iris y córnea fueron evaluados, otorgando una mayor ponderación a esta última en la determinación de los índices de irritación. De un máximo de 110 puntos posibles, 80 corresponden a alteraciones en la córnea. Por lo tanto, evaluar las lesiones que ocurren

sobre córneas *ex vivo* puede ser un indicativo fiable de la irritación ocular. Además, existen ensayos validados que emplean córneas bovinas (TG 437 OCDE) o células corneales humanas reconstituidas (TG 492B OCDE) para evaluar la irritación ocular (98,102,108). De esta manera, analizar detalladamente las lesiones histológicas en córneas porcinas, tal como se hizo en esta investigación, es una aproximación confiable para evaluar este punto final.

Cabe destacar que, si bien existen estudios *in vitro* que evidencian citotoxicidad y efectos apoptóticos de la proparacaína sobre células corneales, no se han identificado reportes específicos que evalúen su potencial de irritación ocular primaria en modelos *ex vivo* o *in vivo* validados. Esta ausencia de evidencia limita la caracterización toxicológica ocular del compuesto, especialmente en condiciones de uso clínico controlado, lo que justifica la realización del presente bioensayo.

Para evaluar el potencial de irritación ocular, se analizaron diversas lesiones histológicas sobre las capas celulares que conforman la córnea (epitelio, estroma y endotelio) y que fueron expuestas a PBS (control negativo), etanol (control positivo) y las diferentes concentraciones de proparacaína estudiadas en permeación. Las alteraciones epiteliales evaluadas incluyeron edema intraepitelial, caracterizado por la acumulación de líquido dentro de las células epiteliales, lo que provoca su hinchazón; descamación, definida como la pérdida de células epiteliales en la superficie corneal; espongiosis, que se refiere a la separación intercelular causada por la acumulación de fluido en el epitelio; y condensación de cromatina, un proceso en el que el material genético en el núcleo celular se compacta, indicando daño celular o apoptosis. En el estroma, se evaluó la presencia de edema caracterizado por la acumulación de líquido entre las lamelas de colágeno, lo que puede comprometer la transparencia y la integridad estructural de la córnea. Finalmente, en el endotelio se valoró si esta capa de células se encontraba presente o ausente. Las imágenes de las lesiones sobre el epitelio, determinantes para valorar la irritación, se presentan en la Figura 19 (215–217).

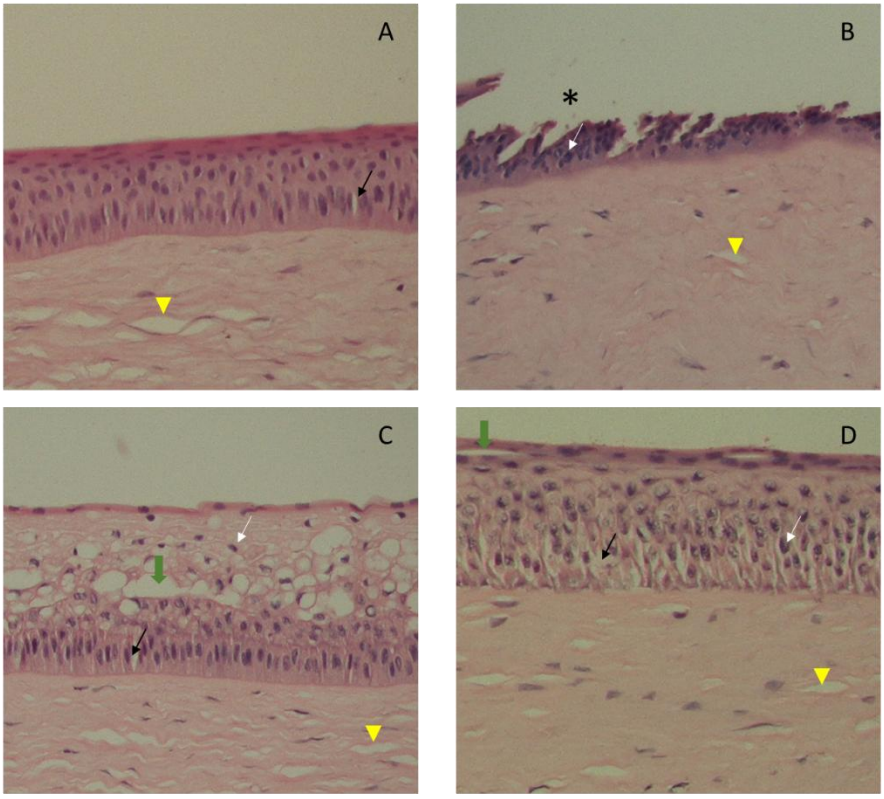

Figura 19. Lesiones en córnea de porcinos expuestas a diferentes sustancias. Tinción H&E Aumento 20X. (a) PBS, (b) dosis infinita, (c) producto 4.5 mg/mL (dosis de abuso), (d) Etanol. Los principales hallazgos en el epitelio son espongiosis (flecha negra), descamación (*), condensación de la cromatina (flecha blanca), edema (flecha verde). En todas las imágenes, los espacios dentro del estroma son artefactos de procesamiento (triángulo amarillo). Fuente: autor.

Los espacios en el estroma (triángulo amarillo) observados en la Figura 19 corresponden a espacios interlamelares normales o artefactos del procesamiento histológico, por lo que no deben confundirse con edema, ya que la disposición de las fibras colágenas se mantiene organizada y sin signos de descomposición estructural. Para confirmar la ausencia de edema estromal y evaluar posibles alteraciones en la hidratación del tejido, sería recomendable el uso de microscopía confocal para analizar cambios en la refringencia del estroma, tinciones específicas como Tricrómico de Masson para evaluar la distribución del colágeno y medición del grosor corneal, dado que el edema suele asociarse con un aumento significativo en el espesor del tejido (218,219).

En la Figura 20-A, en la córnea con PBS se observan espacios interlamelares normales, lo que indica una organización estructural conservada del estroma corneal, con una

adecuada hidratación y distribución de la matriz extracelular. En contraste, en la Figura 20-B, la córnea en condiciones de dosis infinita, se observa un estroma compacto, sin espacios evidentes entre las lamelas de colágeno, lo que sugiere una alteración significativa en la composición de la matriz extracelular.

Este hallazgo podría explicar la ausencia de edema estromal en los otros tratamientos, ya que, en lugar de una acumulación anormal de líquido en el estroma, parece haber una pérdida de proteoglicanos, componentes clave para mantener la hidratación y la organización del tejido. La reducción de estos elementos estructurales podría provocar una compactación del colágeno, limitando la retención de agua y evitando la expansión del estroma (216).

Además, este efecto podría estar relacionado con un componente osmótico, ya que la alta concentración del principio activo en forma salina puede generar un gradiente osmótico que promueva la salida de agua desde el interior de las células hacia el exterior, en un intento por equilibrar las concentraciones a ambos lados de la membrana celular. Es importante aclarar que la condición de dosis infinita fue utilizada con fines experimentales, específicamente para la obtención de parámetros fisicoquímicos como el coeficiente de permeabilidad aparente. No se pretende simular una situación clínica real, ya que estas concentraciones no corresponden a ninguna formulación comercial ni a una dosis de abuso habitual.

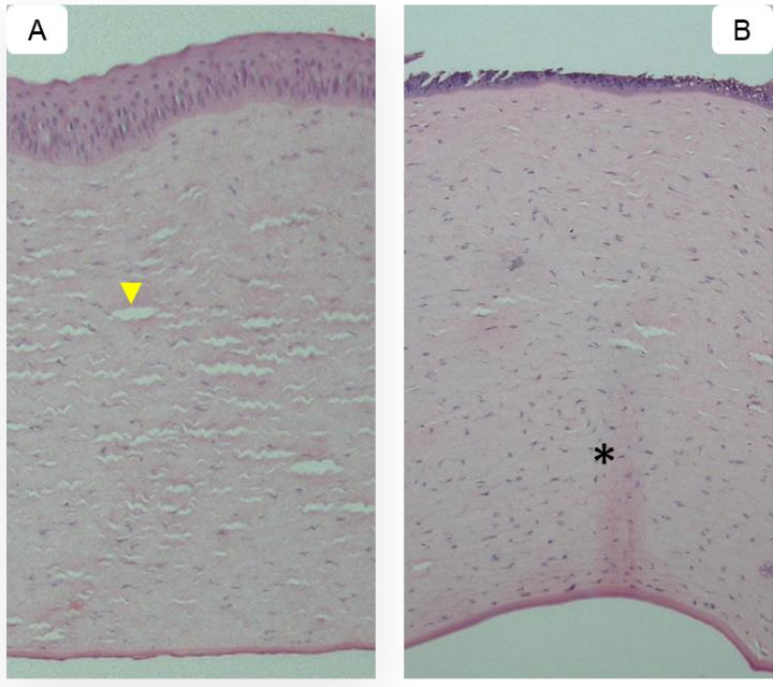

Figura 20. Comparación del estroma corneal en porcinos con PBS y dosis infinita (H&E, 10X). (A) Córnea en PBS, utilizada como control, se observan espacios interlamelares normales (EIL) (triángulo amarillo). (B) Córnea expuesta a dosis infinita, con estroma compacto y reducción EIL, sin apreciarse separación entre las lamelas de colágeno (*). Fuente: autor.

Para profundizar la valoración de los cambios observados en el estroma a DI, sería necesario complementar el análisis con tinciones específicas como Tricrómico de Masson para evaluar la distribución del colágeno, microscopía confocal para detectar cambios en la refringencia del tejido y medición del grosor corneal, ya que la pérdida de proteoglicanos podría estar asociada con una disminución del volumen estromal en lugar de edema (218,219).

Por el contrario, el edema estromal observado exclusivamente en las córneas expuestas a etanol puede atribuirse a las propiedades disolventes de este compuesto, que afectan la integridad del epitelio corneal (Figura 21). El etanol puede desestabilizar las membranas celulares epiteliales, facilitando la infiltración de fluido en el estroma y provocando edema. Además, el etanol puede inducir apoptosis y reducir la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración, afectando la integridad del epitelio corneal y generando inflamación. Estos efectos pueden comprometer la función de barrera del epitelio, permitiendo la acumulación de líquido en el estroma y la aparición de edema (220).

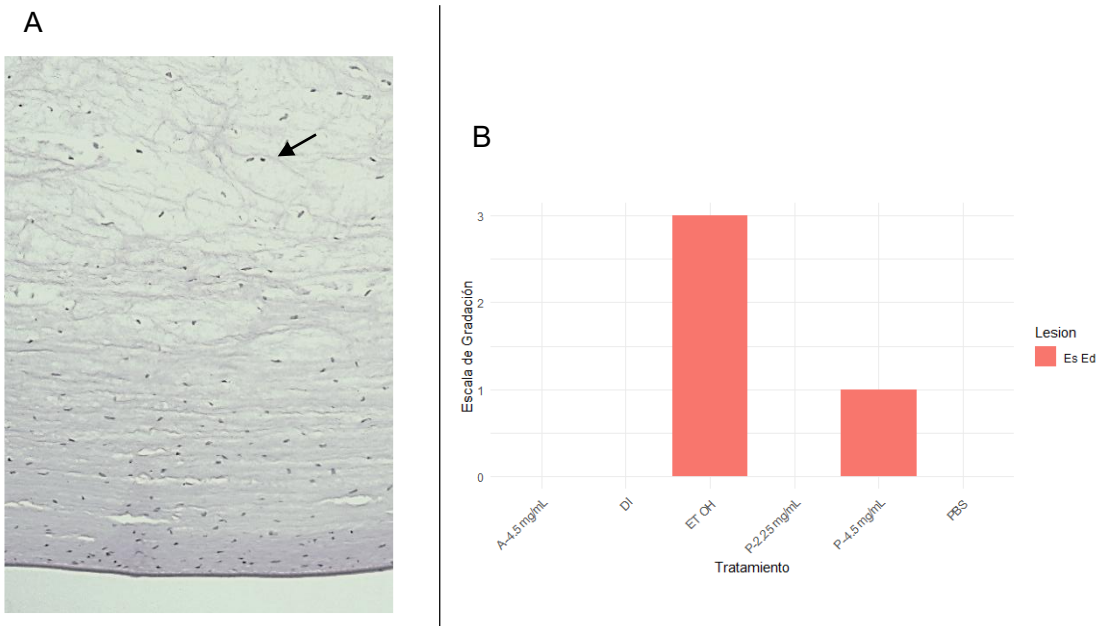

Figura 21. A. Córnea expuesta a etanol en donde se aprecia severo edema estromal (flecha)**. B.** Gráfico de barras de la escala de gradación según tratamiento y lesión: edema de estroma.

Con respecto al endotelio, en este estudio se observó pérdida total en la mayoría de los tratamientos y perdida focal en algunas zonas en el control negativo (PBS). La ausencia de endotelio en casi todas las muestras resalta la fragilidad de estas células, lo que podría indicar la necesidad de evaluar en estudios futuros el uso de medios enriquecidos con antioxidantes, antibióticos y aminoácidos, como los empleados en el transporte de órganos para trasplantes. Medios de preservación y almacenamiento, como el McCarey-Kaufman, proporcionan una viabilidad celular de cuatro días, así como el Optisol-GS y el Life 4°C, que permiten hasta 14 días de almacenamiento; sin embargo, algunos autores reportan hallazgos de defectos epiteliales en córneas contenidas en estos medios (177–181,221). En este estudio se optó por utilizar PBS, si bien, es un medio más simple y con menor capacidad de preservación en comparación con los mencionados, ha sido empleado en diversas investigaciones y fue seleccionado para evitar posibles interferencias en la cuantificación de la proparacaína, asegurando que las condiciones experimentales reflejaran únicamente los efectos de los tratamientos evaluados.

De las tres capas corneales, el epitelio brinda más información y posibilidad de análisis que el estroma y el endotelio. El conteo de las lesiones epiteliales se presenta en la Figura

22. Se observa que los tratamientos con dosis infinita y etanol (EtOH) presentan los conteos celulares más elevados, aunque con diferencias en el tipo de lesión predominante. En dosis infinita, la lesión más destacada es el edema intraepitelial, mientras que en EtOH, el aumento del conteo celular está asociado principalmente con la espongiosis epitelial.

En la Figura 22, se observa que los tratamientos con dosis infinita y etanol (EtOH) presentan los conteos celulares más elevados, aunque con diferencias en el tipo de lesión predominante. En dosis infinita, la lesión más destacada es la edema intraepitelial, mientras que en EtOH, el aumento del conteo celular está asociado principalmente con espongiosis.

Por el contrario, los tratamientos con PBS (control negativo), A-4.5 mg/mL (Activo) y 2.25 mg/mL (Producto) mostraron los conteos más bajos en todas las lesiones evaluadas. En estos casos, las alteraciones epiteliales, incluyendo edema intraepitelial, espongiosis, descamación y condensación de la cromatina, se clasificaron en grados 1 y 0, con menos de 10 células afectadas. Estos resultados refuerzan la influencia del tratamiento sobre la severidad de las alteraciones celulares, evidenciando que DI y EtOH generan un mayor impacto en la histología corneal en comparación con los demás tratamientos, mientras que PBS, A-4.5 mg/mL y 2.25 mg/mL presentan un menor potencial de irritación.

A partir de los conteos celulares en epitelio (Figura 22) se obtuvo el grado para cada lesión el cual se representa en la Figura 23; se observa una variación en los valores de lesión según el tratamiento aplicado. Específicamente, el tratamiento con dosis infinita (53.152 mg/mL de proparacaína) provocó un daño severo en el epitelio corneal, evidenciado por una marcada desorganización celular, espongiosis y edema intraepitelial (grado 4), condensación de la cromatina (grado 3) y descamación (grado 2), lesiones que pueden estar asociadas con una mayor irritación. De manera similar, el etanol (control positivo) generó un daño equiparable al de la dosis infinita, caracterizado por desorganización celular, espongiosis y edema intraepitelial (grado 4), condensación de la cromatina (grado 3), pero sin descamación (grado 0). Por otro lado, en el tratamiento con P-4.5 mg/mL de proparacaína (dosis de abuso), el epitelio conservó su estratificación, aunque se observaron signos de condensación de la cromatina, edema intraepitelial y espongiosis (grado 3), sin descamación significativa (grado 0).

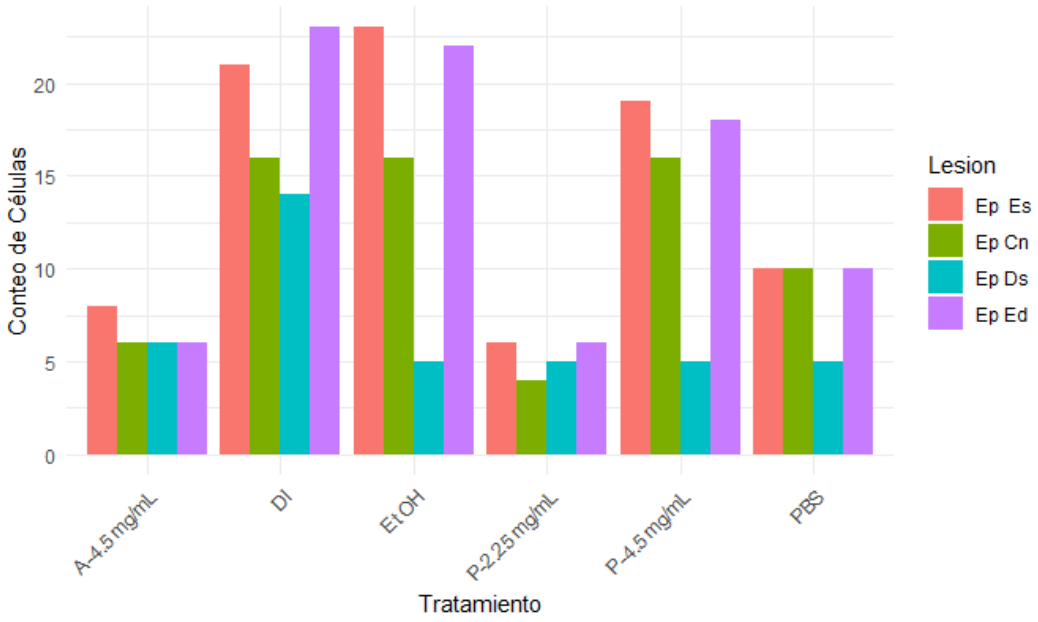

Figura 22. Gráfico de barras de conteo de células según tratamiento y lesión. Lesiones epiteliales: Ep Ed (Edema intraepitelial), Ep Es (Espongiosis), Ep Ds (Descamación), Ep Cn (Condensación de cromatina). Tratamientos: DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo), 2.25 mg/mL (Producto), EtOH (Etanol) y PBS (Control negativo). El conteo celular para cada lesión corresponde al promedio de las tres réplicas; para cada réplica se promedió la lectura hecha en los 4 campos observados.

En conjunto, estos resultados indican que tanto la dosis infinita de proparacaína como el etanol provocan un daño severo y similar en el epitelio corneal, mientras que la dosis de abuso de proparacaína genera alteraciones menos pronunciadas y con menor compromiso estructural.

Debido a la preponderancia de las lesiones epiteliales sobre las estromales y endoteliales en las córneas expuestas, se realizó un análisis estadístico exclusivamente para éstas. El análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis mostró la existencia de diferencias significativas en las variables escala de gradación y el conteo de células en función tanto del tratamiento como del tipo de lesión.

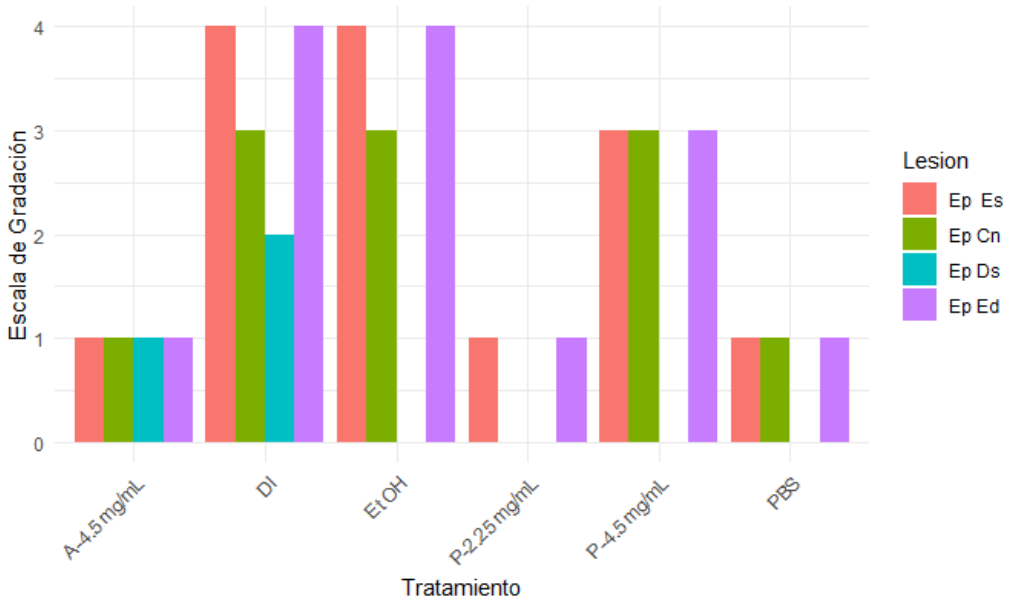

Figura 23. Gráfico de barras de la escala de gradación según tratamiento y lesión. Lesiones epiteliales: Ep Ed (Edema intraepitelial), Ep Es (Espongiosis), Ep Ds (Descamación), Ep Cn (Condensación de cromatina). Tratamientos: DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo), 2.25 mg/mL (Producto), EtOH (Etanol) y PBS (Control negativo). El grado se estimó según se indica en materiales y métodos (Tabla 3) a partir del promedio del conteo celular para cada lesión en cada tratamiento (n=3 con cuatro réplicas o campos por córnea).

En cuanto a los tratamientos, se encontraron diferencias significativas en la escala de gradación ($\chi^2 = 134.83$, gl = 17, $p < 2.2 \times 10^{-16}$) y en el conteo de células ($\chi^2 = 57.179$, gl = 17, $p < 2.2 \times 10^{-16}$). De manera similar, los tipos de lesión también presentaron diferencias significativas en la escala de gradación ($\chi^2 = 138.92$, gl = 3, $p < 2.35 \times 10^{-12}$) y en el conteo de células ($\chi^2 = 46.163$, gl = 3, $p < 5.23 \times 10^{-10}$). Estos resultados evidencian que tanto el tratamiento aplicado como el tipo de lesión tienen un impacto significativo sobre las variables dependientes, lo que subraya la necesidad de considerar ambas variables independientes en el análisis para obtener una interpretación más precisa de los datos. En este sentido, se puede afirmar con certeza que los tratamientos generan un efecto significativo en la respuesta biológica.

Para visualizar mejor las diferencias entre tratamientos, se realizaron *box plots*, los cuales reflejan comportamientos diferenciados en términos de escala de gradación y conteo celular, evidenciando diferencias entre el control positivo (EtOH) y el control negativo (PBS) para todas las lesiones excepto la descamación en la que ambas sustancias se comportaron de manera similar (conteo celular menor a 6) (Figuras 24). En la escala de

gradación, EtOH y dosis infinita (DI) presentan valores consistentemente altos en todas las lesiones, confirmando su fuerte efecto irritante, tanto el etanol como la proparacaína se clasifican en categoría 2 (pueden generar reacción grave en los ojos) (150,222,223). Por otro lado, PBS muestra valores más bajos, reafirmando su clasificación como menos irritante (222).

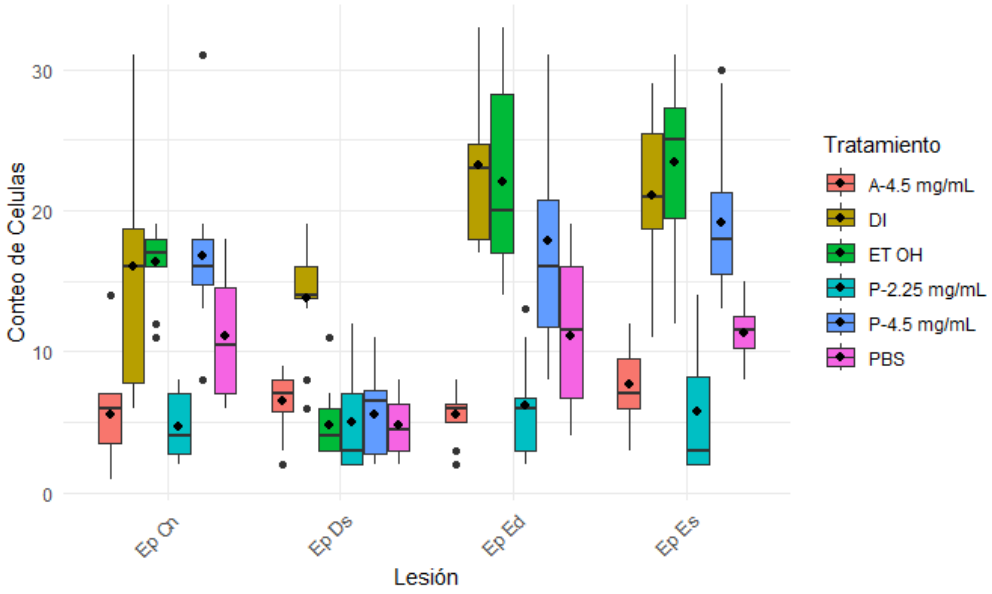

Figura 24. *Box plot* del conteo de células según tipo de lesión y tratamiento. Lesiones epiteliales: Ep Ed (Edema intraepitelial), Ep Es (Espongiosis), Ep Ds (Descamación), Ep Cn (Condensación de cromatina). Tratamientos: DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo), 2.25 mg/mL (Producto), EtOH (Etanol) y PBS (Control). Los datos representan los valores individuales obtenidos en cuatro campos de análisis por réplica, considerando el triplicado de cada tratamiento, sin promediarlos.

Es importante señalar que, en este estudio, la proparacaína como activo en todas sus concentraciones fue disuelta en PBS. La diferencia principal entre A-4.5 y P-4.5 radica en el vehículo: mientras que A-4.5 utiliza PBS, P-4.5 contiene los excipientes de la formulación comercial, incluyendo CB, lo que podría influir en las respuestas observadas.

Los valores atípicos, representados como puntos individuales fuera de los bigotes en los gráficos, indican la variabilidad en la respuesta tisular entre las diferentes muestras. En particular, en la Figura 24 y 25, se identifican valores extremos especialmente en los tratamientos con P-4.5 mg/mL y EtOH, lo que sugiere una mayor heterogeneidad en la respuesta irritante en estos casos.

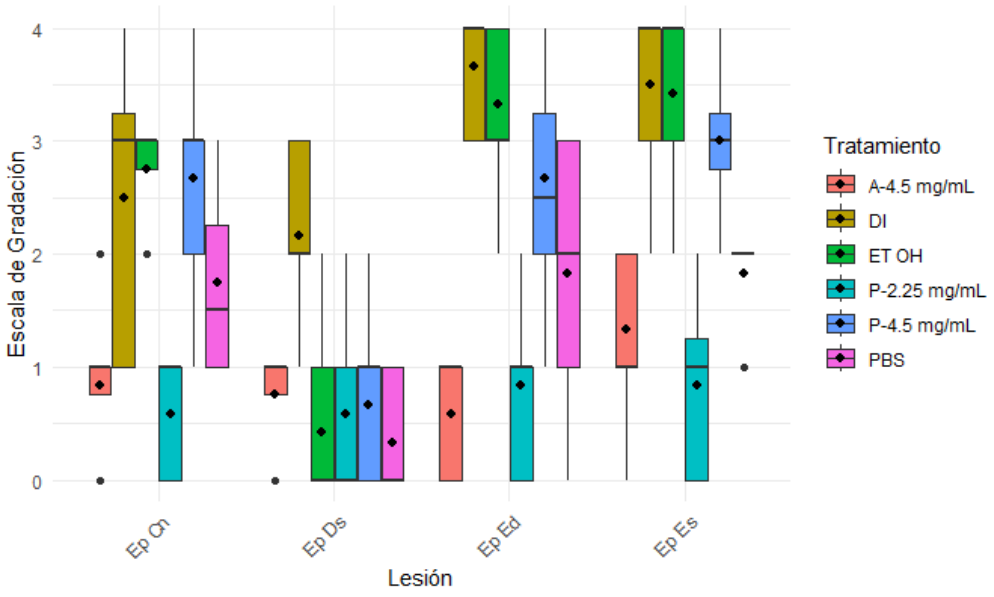

Figura 25. *Box plot* de la escala de gradación según tipo de lesión epitelial y tratamiento. Lesiones epiteliales: Ep Ed (Edema intraepitelial), Ep Es (Espongiosis), Ep Ds (Descamación), Ep Cn (Condensación de cromatina). Tratamientos: DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo), 2.25 mg/mL (Producto), EtOH (Etanol) y PBS (Control). Los datos representan los valores individuales obtenidos en cuatro campos de análisis por réplica, considerando el triplicado de cada tratamiento, sin promediarlos.

En general, las Figuras 24 y 25, muestran que los tratamientos con mayor efecto irritante presentan una mayor dispersión en los datos, reflejando una respuesta tisular menos uniforme. Los tratamientos A-4.5 mg/mL y P-2.25 mg/mL, aunque generan cierto nivel de irritación, exhiben distribuciones más controladas y valores más bajos en comparación con el control positivo. La presencia de valores atípicos en varios tratamientos y lesiones sugiere que factores como la respuesta biológica individual podrían influir en la heterogeneidad de los resultados, destacando la importancia de un análisis estadístico detallado para interpretar el impacto real de cada tratamiento.

Para evaluar las diferencias entre tratamientos en el conteo de células y la escala de gradación, se aplicó la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni. Esta prueba se utilizó porque el análisis de Kruskal-Wallis indicó diferencias globales significativas, pero no especifica entre qué tratamientos ocurren dichas diferencias. Los resultados muestran que no todos los tratamientos presentan diferencias significativas entre sí (Figura 26). Sin embargo, los tratamientos DI A y P-2.25 mg/mL C, así como DI A y A-4.5 mg/mL C,

destacan por tener las mayores diferencias, lo que sugiere un impacto notable de estos tratamientos en las variables evaluadas.

En contraste, los controles negativos (PBS A, PBS B y PBS C) muestran pocas o ninguna diferencia significativa con otros tratamientos, lo que confirma su estabilidad y coherencia como grupo de referencia. Por otro lado, los tratamientos con etanol (EtOH A, EtOH B y EtOH C), utilizados como control positivo, presentan diferencias más marcadas con respecto a algunos tratamientos, lo que demuestra su efectividad en inducir cambios celulares y de gradación esperados. Estos resultados validan la adecuada elección de los controles utilizados.

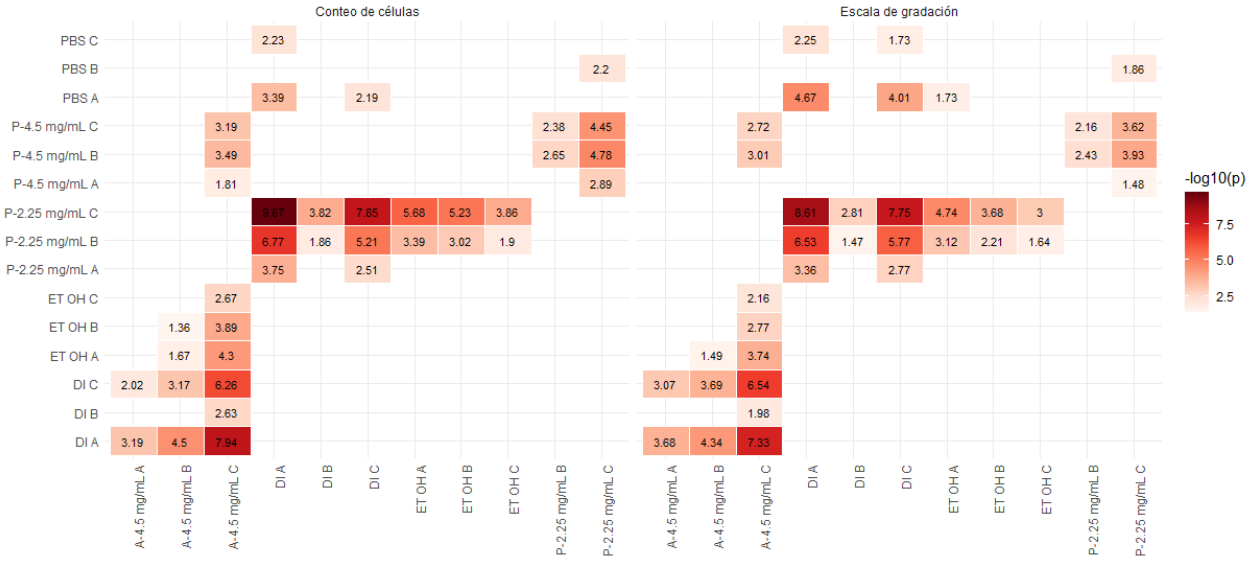

Figura 26. Mapa de calor: resultados de la prueba de Dunn para diferencias significativas entre tratamientos en el conteo de células y la escala de gradación. Los valores representan -log10(P Ajustado), donde colores más oscuros indican diferencias más significativas. Cada valor corresponde a las lecturas hechas en cada una de las córneas y representa el promedio de lectura en cuatro campos microscópicos.

Por otro lado, el CB, un compuesto de amonio cuaternario comúnmente usado como conservante en colirios, es conocido por sus efectos tóxicos en la superficie ocular, causando inflamación, daño nervioso y citotoxicidad. Estudios han reportado que el CB induce alteraciones morfológicas, apoptosis, estrés oxidativo, liberación de ATP y una mayor expresión de los genes CCL2 e IL6, así como una mayor liberación de CCL2, IL-6 y MIF en células epiteliales corneales humanas (HCE) (203). Estos efectos podrían contribuir al perfil irritante observado en los tratamientos P-2.5 mg/mL y P-4.5 mg/mL. Cabe

señalar que las lesiones epiteliales de espongiosis, condensación de cromatina y edema intraepitelial se incrementan en la concentración de abuso (P-4.5 mg/mL) 2.0 veces más que con la concentración de la formulación terapéutica (P-2.5 mg/mL).

Además, predicciones *in silico* de toxicidad ocular para la proparacaína y sus productos de degradación indican que, la proparacaína no presenta potencial de causar irritación ocular severa (EI) ni corrosión ocular (EC) (223). Esto sugiere que el comportamiento de los tratamientos podría estar influenciado tanto por la presencia de CB como por posibles productos de degradación de la proparacaína, modulando la respuesta dependiendo de la concentración y el tipo de lesión evaluada.

A partir del grado obtenido para cada lesión por tratamiento, considerando únicamente los datos promediados de las lesiones epiteliales, se propone calcular el índice de irritación relativo. Para ello, se aplica la normalización min-max, escalando los valores en un rango de 0 a 1, donde el control negativo (PBS) representa el mínimo nivel de irritación y el control positivo (EtOH) el máximo (Ecuación 5). Finalmente, los valores obtenidos se multiplicaron por 100 para expresarlos en porcentaje (224). Cabe señalar que este cálculo se realizó exclusivamente para las lesiones epiteliales, sin incluir alteraciones en el estroma ni el endotelio

Ecuación 5. Índice de irritación relativo (224).

$$IIR = \frac{tratamiento - PBS}{EtOH - PBS} * 100$$

Este método permitió comparar los efectos irritantes de cada tratamiento en distintas lesiones histológicas. Los valores más altos se observaron en la dosis infinita (DI) y el etanol (EtOH), ambos con un 100% de irritación en la mayoría de las lesiones, lo que confirma su fuerte efecto irritante ocular.

El P-4.5 mg/mL (dosis de abuso) presentó un índice intermedio, alcanzando 67% en la mayoría de las lesiones epiteliales, lo que sugiere una irritación significativa pero menor que la dosis infinita. Finalmente, el P-2.25 mg/mL (producto) y A-4.5 mg/mL (activo) tuvo un índice de 0 % en todas las lesiones similar al PBS, reflejando un potencial de irritación mínimo.

Diversos estudios emplean la histología al final de sus ensayos para evaluar la integridad del tejido, aportando evidencia que complementa y valida los resultados obtenidos mediante otros métodos (74,79,94,109,112,114,115,118,144,204,225–230). Se ha reportado, por ejemplo, que los cambios histopatológicos observados coinciden estrechamente con los resultados del análisis de citotoxicidad, representando un punto final secundario útil para determinar los efectos de materiales sobre células epiteliales corneales humanas (HCE), según parámetros como la viabilidad relativa evaluada mediante el ensayo MTT (225).

No obstante, aunque los hallazgos histológicos permiten identificar el potencial irritante de una sustancia pueden no ser suficientes por sí solos para categorizar formalmente un agente químico según el SGA, ya que no siempre los estudios *ex vivo* se diseñan para proporcionar datos funcionales relacionados con la reversibilidad o recuperación del daño (23,115,133). Por este motivo, los hallazgos histológicos deben complementarse con pruebas adicionales, como el método de la membrana corneal reconstituida (RhCE), análisis bioquímicos o, en casos justificados, modelos *in vivo*, para cumplir con los criterios establecidos por el SGA (133).

Aunque la proparacaína está formulada para uso tópico ocular, puede absorberse sistémicamente a través de la mucosa nasal y faríngea cuando existe un drenaje no controlado desde el saco lagrimal. Si bien se considera segura en dosis terapéuticas, el uso excesivo o inadecuado puede elevar su concentración plasmática y, en casos extremos, desencadenar efectos adversos sistémicos como estimulación seguida de depresión del sistema nervioso central (temblores, convulsiones, somnolencia), así como alteraciones cardiovasculares (bradicardia, arritmias e incluso paro cardíaco) (160,161). De hecho, se ha reportado un caso clínico de convulsión tónico-clónica tras la administración de solo dos gotas de proparacaína al 0.5%, lo que evidencia que incluso dosis mínimas pueden provocar reacciones graves en individuos susceptibles (231).

En cuanto a la toxicidad local, la sobredosificación de proparacaína puede inducir efectos citotóxicos y proapoptóticos en los queratocitos, provocando daños irreversibles como opacidades corneales, queratopatía tóxica, perforación, inflamación ocular e incluso enucleación (11–13,17,18,121,166). La exposición repetida al anestésico, en la dosis de abuso propuesta en este estudio, podría favorecer la progresión de las alteraciones

celulares observadas, y estos resultados pueden extrapolarse a los hallazgos clínicos descritos en la literatura.

Yang et al., también identificaron impurezas derivadas del proceso de síntesis de la proparacaína, incluyendo metabolitos y subproductos como ácidos y ésteres, que podrían alterar la tolerancia del tejido ocular y aumentar el riesgo de irritación (186). Esto refuerza la necesidad de implementar controles estrictos durante la fabricación y almacenamiento del medicamento para evitar la presencia de compuestos irritantes que puedan comprometer su seguridad y eficacia.

Además, desde 1993 se ha documentado la citotoxicidad de la proparacaína en cultivos de células epiteliales corneales, asociándose con resultados similares a los obtenidos en este estudio, donde se observa un daño significativo en la estructura de la córnea en condiciones de abuso del medicamento, corroborando su potencial citotóxico en comparación con otros anestésicos como la bupivacaína (169,232).

Considerando estos antecedentes sobre los posibles efectos adversos sistémicos y con el propósito de estimar la biodisponibilidad ocular y sistémica de la dosis de abuso propuesta de clorhidrato de proparacaína, se administró 1 mL de solución a una concentración de 4.5 mg/mL (equivalente a 4500 µg) en el compartimento donador de una celda de difusión con un área de 0.64 cm^2. A las 4 horas, se cuantificó una absorción de 139.61 $\mu g/cm^2$, correspondiente a 89.35 µg (1.99%), mientras que la fracción retenida en la córnea o que permaneció en el compartimento donador fue de 4410.65 µg, es decir, el 98.01% de la dosis.

Considerando que aproximadamente el 10% de lo absorbido por la superficie ocular podría alcanzar la circulación sistémica, la cantidad estimada que llegaría a sangre sería 8.94 µg (3,32,36,37). Suponiendo un volumen de distribución de 3 L en adultos, la concentración plasmática resultante sería de 0.00298 µg/mL.

Aunque no se cuenta con un umbral tóxico específico para la proparacaína, este valor se comparó con la concentración mínima toxica establecido para la lidocaína (6–7 µg/mL) (233). La concentración plasmática estimada es notablemente inferior a dicho rango, lo que sugiere que, incluso con una dosis de abuso propuesta de 4.5 mg/mL, la

biodisponibilidad sistémica sería limitada y el riesgo de toxicidad sistémica permanecería bajo, siempre que se mantengan condiciones similares a las del modelo experimental.

Por otro lado, el ensayo clínico NCT00620997 incluyó el uso de proparacaína al 0.5% en un contexto terapéutico, este estudio no reporta resultados y, por tanto, no permite confirmar su perfil de seguridad. Además, no existen ensayos clínicos controlados que respalden el uso de concentraciones mayores. Dado que las dosis de abuso se han relacionado con múltiples hallazgos clínicos de toxicidad ocular y sistémica, su uso como manejo del dolor sin supervisión médica resulta inapropiado.

Finalmente se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman para evaluar la relación entre la cantidad acumulada permeada (Q) y la escala de gradación y conteo de células de irritación a los 240 minutos en los tratamientos DI (Dosis infinita, activo), P-4.5 mg/mL (Producto), A-4.5 mg/mL (Activo) y 2.25 mg/mL (Producto). El coeficiente de correlación de Spearman (ρ) obtenido fue 0.5449, lo que indica una correlación positiva entre ambas variables. El valor p de 3.027×10^{-16} confirma que esta relación es altamente significativa. Estos hallazgos sugieren que, a mayor cantidad permeada, se observa un mayor grado de irritación. Es muy probable que la lesión celular inducida contribuya al aumento de la permeabilidad corneal. De hecho, varios ensayos alternativos al uso de animales, diseñados para evaluar la irritación ocular, incorporan la medición de la permeabilidad del tejido corneal (TG 437, OCDE)) o de líneas celulares (TG 460, OCDE)) como un criterio clave para determinar el grado de irritación, el cual tiende a ser mayor a medida que aumenta la permeabilidad del modelo (102,234).

Por último, la literatura evidencia una notable flexibilidad en las condiciones experimentales empleadas en estudios de permeación ocular en celdas de Franz, las cuales no están unificadas ni reguladas o estandarizadas por directrices (53,71,73–97). Los resultados obtenidos en este estudio tienen el potencial de respaldar aplicaciones regulatorias y fomentar la estandarización global de las pruebas de permeación e irritación ocular en celdas de Franz. Estos avances son fundamentales para ampliar la base de datos global sobre permeación ocular, mejorando la capacidad predictiva en términos de biodisponibilidad y seguridad de los fármacos oftálmicos. De esta manera, el presente estudio contribuye significativamente al fortalecimiento del marco científico y regulatorio en la evaluación de medicamentos oftálmicos seguros y eficaces.

Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Los resultados de este estudio permitieron establecer condiciones metodológicas estandarizadas para evaluar la permeación e irritación corneal del clorhidrato de proparacaína en celdas de Franz. Parámetros como la velocidad de agitación (240 rpm), la temperatura (32 °C), el medio receptor (PBS), el volumen de muestreo (500 µL) y la duración del experimento (4 horas) fueron definidos para garantizar reproducibilidad y representatividad fisiológica. Se implementaron estrategias para mantener la integridad de las córneas durante el proceso experimental, asegurando resultados confiables sin afectar la estructura corneal en el tiempo definido.

Los ensayos de permeación evidenciaron que la proparacaína presenta baja permeabilidad corneal, con un coeficiente de permeabilidad aparente de 9.33 $x10^{-7}$ cm/s, dentro del rango reportado para moléculas de similares características, atribuida a su estructura anfifílica, que favorece su retención en el epitelio y limita su difusión al estroma. Se determinó que la concentración inicial y el tiempo influyen significativamente en la cantidad acumulada permeada, resaltando la importancia de la retención corneal en la permeación. El gradiente de concentración fue un factor determinante en la difusión del fármaco, sin que la formulación comercial mostrara diferencias significativas respecto al activo puro.

Los resultados obtenidos en el análisis histológico permitieron determinar el potencial de irritación tanto del clorhidrato de proparacaína puro como de su formulación. Se identificaron diferencias significativas en la respuesta tisular según la concentración evaluada. Las córneas expuestas a concentraciones elevadas de proparacaína mostraron niveles de daño similares a los del etanol (control positivo) que se considera un irritante severo. La formulación comercial presentó un mayor potencial irritante en comparación con el activo puro, lo que sugiere que ciertos excipientes pueden influir en la respuesta corneal. Además, se confirmó la importancia del uso de la histología como herramienta para evaluar el potencial de irritación, permitiendo una observación detallada de los cambios tisulares y facilitando la comprensión de los efectos a nivel celular y morfológico.

La proparacaína, aunque segura en dosis terapéuticas, puede causar alteraciones corneales y efectos sistémicos si se usa en exceso. En este estudio, la dosis de abuso (4.5 mg/mL) mostró potencial citotóxico significativo, compatible con reportes clínicos de queratopatía tóxica. A nivel sistémico, aunque no se realizó una evaluación directa, se estimó una absorción mínima y una concentración plasmática muy por debajo del umbral tóxico establecido para anestésicos similares. Estos cálculos sugieren un riesgo sistémico bajo en condiciones controladas. No obstante, el uso inadecuado, la susceptibilidad individual o la presencia de impurezas podrían aumentar significativamente su toxicidad, lo que refuerza la necesidad de un uso responsable y de estrictos controles en su prescripción y manejo.

El análisis de correlación de Spearman ($\rho = 0.5449$, $p = 3.027 \times 10^{-16}$) evidenció una relación positiva y significativa entre la cantidad acumulada permeada y el grado de irritación, sugiriendo que mayores niveles de permeación están asociados con un mayor potencial de irritación.

Este estudio respalda el uso de córneas porcinas en celdas de Franz como un modelo *ex vivo* eficiente, reproducible y éticamente viable para evaluar la permeación y el potencial de irritación de sustancias de uso oftálmico, reduciendo la necesidad de ensayos *in vivo,* promoviendo el cumplimiento de los principios éticos de las 3R. Asimismo, resalta la importancia de estandarizar los protocolos experimentales según el tipo de tejido, ya que la córnea, al ser una barrera biológica más especializada que la piel, presenta propiedades únicas que influyen en la absorción y en la respuesta a los compuestos aplicados. Estas consideraciones son fundamentales para garantizar resultados consistentes y extrapolables a condiciones clínicas reales.

4.2 Recomendaciones

La información derivada de estudios como este se puede implementar en modelos matemáticos y simulaciones para predecir la difusión y distribución del fármaco y correlacionar los datos experimentales con parámetros fisiológicos relevantes. Para confirmar la ausencia de edema estromal y evaluar posibles alteraciones en la hidratación del tejido, se recomienda para futuros estudios el uso de microscopía confocal para

analizar cambios en la refringencia del estroma, así como tinciones específicas, como el Tricrómico de Masson, para evaluar la distribución del colágeno.

También sería relevante medir el grosor corneal, dado que el edema suele asociarse con un aumento significativo en el espesor del tejido. Adicionalmente, se sugiere llevar a cabo estudios de retención en las distintas capas de la córnea, correlacionando la acumulación del fármaco con su duración terapéutica y toxicidad.

Las lesiones celulares en explantes de córnea pueden constituir una herramienta útil y viable para valorar la irritación ocular; este modelo podría tener menores costos que otras alternativas de reemplazo empleadas actualmente. Es necesario valorar y cuantificar los hallazgos histológicos en el epitelio corneal en un mayor número de muestras sometidas a diferentes tipos de sustancias con riesgo de exposición ocular; de esta manera podría ofrecerse una alternativa de menor costo a la industria nacional que esté interesada en conocer los riesgos de irritación que puedan representar sus productos.

Se recomienda avanzar en estudios de extrapolación *in vitro-in vivo*, que permitan correlacionar los valores de permeación *ex vivo* obtenidos en este estudio con las concentraciones alcanzadas en tejidos oculares humanos. No obstante, persiste una notable deficiencia en la disponibilidad de datos experimentales de acceso libre sobre la permeabilidad, de muchos fármacos oftálmicos. Esta limitación dificulta la validación de simulaciones *in silico*. Por tanto, se hace necesario impulsar más estudios experimentales con distintos fármacos, que proporcionen información confiable y complementen los modelos predictivos. Esta integración permitiría realizar proyecciones más precisas de la biodisponibilidad ocular, facilitando la predicción de la eficacia clínica y la optimización de formulaciones.

Anexo A: Validación parcial de la metodología analítica para la cuantificación del clorhidrato de proparacaína

Métodos:

Para cuantificar el clorhidrato de proparacaína en el ensayo de solubilidad y en el estudio de permeación, se empleó la técnica de espectrofotometría UV-Vis, seleccionada con base en estudios previos y en las directrices de la USP para la cuantificación de anestésicos locales (45,235–237). Entre los diversos métodos de determinación de fármacos, la espectrofotometría se destaca por su simplicidad, rapidez, reproducibilidad, sensibilidad, precisión y bajo costo (237,238). Sin embargo, debido a la naturaleza de los ensayos de permeación, que implican el uso de una matriz biológica como la córnea de cerdo, la validación parcial de la metodología se realizó conforme a las pautas de la ICH (239,240), evaluando parámetros como selectividad, linealidad, curva de calibración, y rango (incluyendo el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)).

Evaluación espectrofotométrica y control de interferencias en la cuantificación de proparacaína

La presencia de cualquier compuesto físico o químico que absorba en la misma región que el analito de interés puede causar errores en la medida de absorbancia. Por esta razón, se realizó un barrido exploratorio a todas las concentraciones y en todos los puntos de muestreo, con el fin de evaluar la presencia de puntos isosbésticos, alteraciones en la absorbancia debidas a variaciones espectrales o absorciones amplias de la matriz, posiblemente causadas por interferencias de la membrana biológica (241).

Además, debido a que las concentraciones en dosis finita del anestésico pueden variar según el tipo de procedimiento quirúrgico, se realizaron análisis preliminares para determinar la cantidad adecuada del medicamento que incluye la proparacaina, variando de esta manera la concentración del fármaco requerida para el ensayo. Se evaluaron distintas concentraciones, seleccionando aquella que mostró el mejor perfil de absorbancia, incluyendo la lectura en el tiempo inicial de 30 minutos, con el propósito de

verificar tanto la absorción como las posibles interferencias de los excipientes en el pico de interés.

La solución oftálmica de proparacaína al 0.5% está formulada con cloruro de benzalconio (CB) al 0.01% como conservante, junto con excipientes como glicerina y ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio (NaOH) para el ajuste del pH, en una base de agua estéril derivada de agua purificada (188). Para el análisis espectrofotométrico, CB muestra absorción en la región UV a 257 nm, 262 nm y 268 nm (242), mientras que NaOH presenta un aumento lineal de absorbancia a 191 nm (243). La proparacaína exhibe picos característicos a 225 nm, 270 nm y 300 nm en diferentes disolventes (149). Experimentalmente, se determinó que en PBS, la máxima absorción de la proparacaína es 231 nm sin interferencias de los excipientes, lo cual asegura la precisión en la cuantificación del analito bajo estas condiciones de ensayo. No fue necesario el uso de técnicas de corrección para eliminar o reducir los errores de interferencia como isoabsorbancia, espectroscopía derivada, corrección de tres puntos, modelar el fondo, entre otras (241,244).

Determinación de la longitud de onda de máxima

Se realizaron análisis preliminares para determinar la longitud de onda óptima mediante un barrido de espectro, ya que tomar una medida en una única longitud de onda puede limitar la precisión y exactitud de los resultados obtenidos. Para mejorar la calidad de los datos y detectar posibles errores, es recomendable realizar mediciones en múltiples longitudes de onda o, idealmente, obtener espectros completos (241).

Durante la cuantificación de muestras, la intensidad de la absorbancia puede verse afectada por factores como el disolvente, la concentración, el pH y la temperatura, lo cual resalta la importancia de controlar estas variables (244). Para minimizar cambios en la absorbancia aparente y garantizar la exactitud de los resultados cuantitativos, es necesario permitir que las muestras alcancen la temperatura ambiente antes de las mediciones (241).

Se realizó un barrido espectral de 200 a 600 nm para identificar la región de máxima absorción de la proparacaína, seleccionando 231 nm como la longitud de onda óptima. PBS fue utilizado como blanco para garantizar que la absorbancia registrada en esta longitud de onda fuera adecuada y estable para el clorhidrato de proparacaína (244). Se utilizaron celdas de cuarzo, adecuadas para mediciones en la región no visible. Para evitar interferencias, las celdas se manipularon con cuidado, limpiándose con agua destilada y

alcohol, y dejándolas secar cinco minutos antes de eliminar impurezas externas con un paño especializado (241).

Selectividad

La selectividad de un método analítico es la capacidad para identificar y medir el analito de interés en presencia de componentes de la matriz biológica que pudieran interferir en la medición. Para evaluar esta propiedad, el método debe ser capaz de diferenciar la señal del analito de otras señales potenciales, asegurando resultados precisos y libres de interferencias (239,240).

En este contexto, se evaluó la selectividad mediante el análisis de muestras en blanco de la matriz biológica, empleando PBS de tres especímenes porcinos como referencia en distintos tiempos de muestreo. Se realizaron barridos en el espectro UV-Vis para comparar estos perfiles con los obtenidos para las diferentes concentraciones de clorhidrato de proparacaína (Figura 27). La selectividad fue aceptada al demostrar visualmente que no existían interferencias en los perfiles de absorbancia del analito, asegurando así la confiabilidad de las mediciones en las condiciones establecidas.

Curva de calibración

La calibración analítica se realiza preparando estándares con concentraciones conocidas del analito y midiendo la respuesta del instrumento para cada uno. Esta relación establece una curva de calibración que muestra cómo varía la respuesta con la concentración. Según la ICH, es recomendable incluir al menos seis niveles de concentración, desde el LLOQ (límite inferior de cuantificación) hasta el ULOQ (límite superior de cuantificación), junto con una muestra en blanco y replicaciones (dos o más) para reducir errores y aumentar la precisión. Los niveles deben cubrir un rango de trabajo uniformemente distribuidos o equidistantes en el que se espera el contenido habitual de muestras reales. La curva debe ser construida utilizando un modelo de regresión adecuado (239,245).

Para construir la curva de calibración, se prepararon muestras utilizando estándares recién enriquecidos en el medio receptor. Los niveles se seleccionaron experimentalmente, teniendo en cuenta reportes de estudios previos (208,209,223,246). El procedimiento de preparación de las muestras se realizó conforme a las indicaciones de la USP, utilizando balanza y materiales adecuados para asegurar la precisión y exactitud en las mediciones

(45). Las soluciones de calibración se realizaron a partir de una solución madre de clorhidrato de proparacaína en PBS, pesando 20 mg en un matraz de 100 mL (0,2 mg/mL). Posteriormente, se preparó una segunda dilución de 0,04 mg/mL, a partir de la cual se tomaron alícuotas, con tres repeticiones por nivel, diluidas en PBS en matraces de 2 mL (Tabla 5).

Tabla 5 Niveles de la curva de calibración preparados a partir de una solución madre de concentración de 0.04 mg/mL.

Nivel	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Concentración (µg/mL)	0,6	2	4	5,6	7	9,2	10,8	12,8
Alícuota (µL)	30	100	200	280	350	460	540	640

Rango, límite de detección y cuantificación

El rango de un método analítico es el intervalo entre la concentración mínima y máxima del analito (incluyendo LOD y LOQ) en el que el método demuestra precisión, exactitud y linealidad. El LOD representa la cantidad mínima de analito que puede ser detectada, aunque no cuantificada con exactitud, mientras que el LOQ es la concentración mínima que permite una cuantificación precisa y exacta. Estos valores se determinaron mediante las ecuaciones 6 y 7 (240).

Ecuación 6. Límite de detección (LOD) (240).

$$LOD = \frac{3.3\ x\ \sigma}{S}$$

Ecuación 7. Límite de cuantificación (LOQ) (240).

$$LOQ = \frac{10\ x\ \sigma}{S}$$

Donde σ es la desviación estándar del intercepto y S es la pendiente de la curva de calibración.

Linealidad

La linealidad en un método analítico se refiere a su capacidad de producir resultados proporcionales a la concentración del analito en un rango definido (240). Para verificar la

linealidad, se elaboró una curva de calibración, como se explicó anteriormente, en el rango de 0.6 a 12.8 µg/mL (incluyendo el LOQ). Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t de Student y análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Aunque el coeficiente de correlación es útil, no es suficiente para evaluar la linealidad de las curvas de calibración, ya que un valor alto de este coeficiente indica solo una relación fuerte entre las variables, pero no garantiza que sea lineal (247). Por esta razón, fue fundamental complementar el análisis con gráficos de los residuos y de probabilidad normal. La evaluación de estos gráficos permite identificar patrones o tendencias que puedan indicar desviaciones de la linealidad, también ayudan a identificar valores atípicos (248).

Resultados:

Selectividad

El espectro UV-Vis del clorhidrato de proparacaína, presentado en la Figura 27, evidencia la selectividad del método al demostrar la ausencia de interferencias significativas en los perfiles de absorbancia del analito bajo las condiciones establecidas. El uso de PBS como blanco (E), fue crucial para establecer la línea base y confirmar que no existían interferencias provenientes de la membrana.

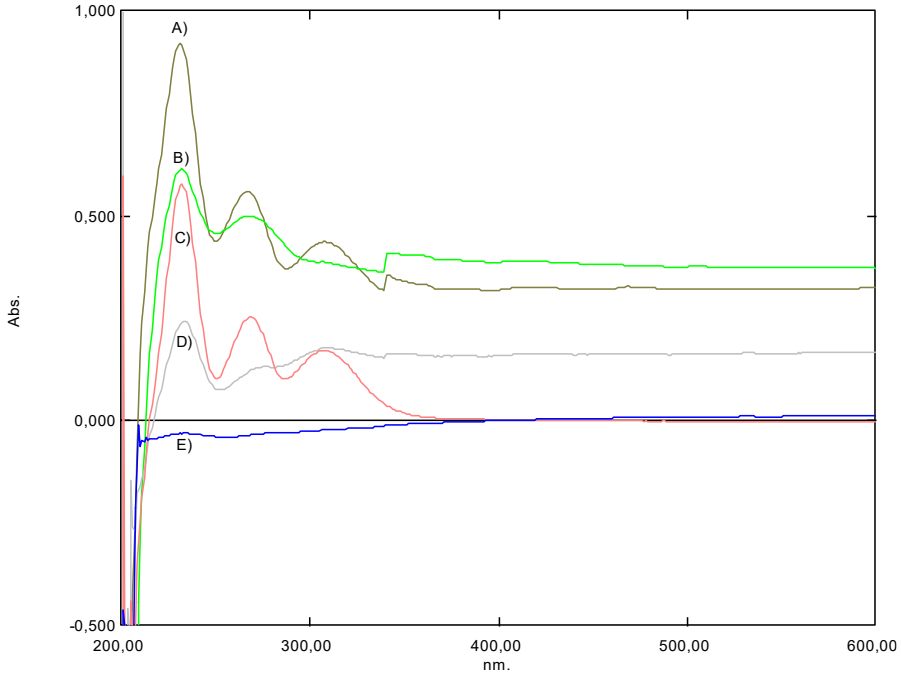

Figura 27 Espectro UV-Vis del clorhidrato de proparacaína a 1 hora de permeación. A) Dosis infinita (activo); B) 4.5 mg/mL (producto); C) 4.5 mg/mL (activo); D) 2.25 mg/mL (producto) y E) PBS.

Los picos característicos a longitudes de onda UV de aproximadamente 225, 270 y 300 nm son coherentes con las propiedades de absorción del clorhidrato de proparacaína, las cuales pueden variar en función del pH del medio (149). En este estudio, se determinó 231 nm como la longitud de onda máxima para la cuantificación del analito, lo que garantizó una detección confiable en todas las muestras evaluadas. Además, se observaron diferencias en los valores de absorbancia según la concentración y la matriz empleada (activo o producto), lo que resalta la influencia del pH y la composición del medio en las propiedades de absorción del analito.

Linealidad

Se evaluó la respuesta instrumental de ocho puntos equidistantes en el rango de concentración de 0,6 a 12,8 µg/mL, definido considerando los ensayos experimentales realizados y con base en reportes previos sobre permeación corneal (208,209,223,246). En la Figura 28 se presentan los resultados de absorbancia correspondientes a cada concentración, calculados a partir de tres réplicas independientes por punto. Los datos obtenidos se procesaron mediante el método de mínimos cuadrados (Tabla 6), generando la regresión lineal que se observa en la Figura 28. Esta curva muestra un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9970, lo cual es aceptado como evidencia de una relación sólida y confiable entre la concentración del analito y la respuesta instrumental.

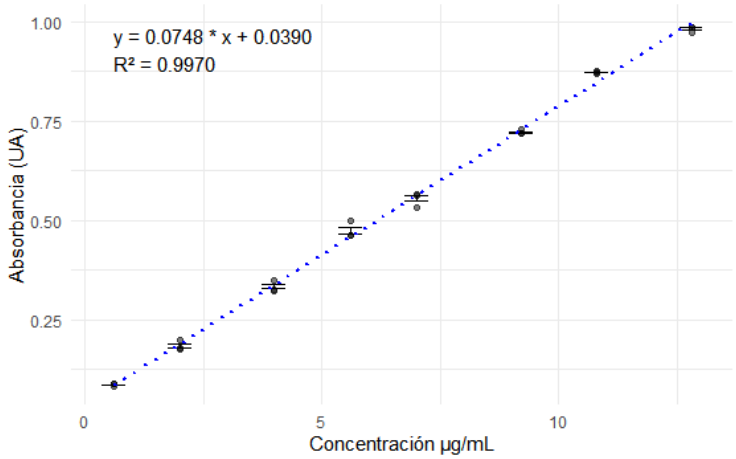

Figura 28 Curva de calibración clorhidrato de proparacaína en PBS.

Tabla 6. Datos para elaborar la curva de calibración del método

Concentración µg/mL	Absorbancia (UA)		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3
12,8	0,986	0,985	0,973
10,8	0,869	0,874	0,871
9,2	0,717	0,718	0,728
7	0,563	0,566	0,532
5,6	0,498	0,463	0,461
4	0,325	0,348	0,323
2	0,200	0,177	0,175
0,6	0,081	0,087	0,088

En relación con los límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD) (Tabla 7), estos parámetros garantizan una detección precisa y confiable dentro del rango; este rango permite la cuantificación exacta incluso de las concentraciones más bajas del clorhidrato de proparacaína, lo que asegura la reproducibilidad del método empleado para evaluar la permeabilidad corneal.

Tabla 7. Datos para el cálculo del límite de detección y cuantificación

Parámetro	Resultado
σ (desviación estándar del intercepto)	0,0066
S (pendiente de la curva de calibración)	0,0748
LOD (µg/mL)	0,292
LOQ (µg/mL)	0,886

LOD: Límite de detección, LOQ: Límite de cuantificación.

Se realizó una regresión lineal para evaluar la relación entre la concentración y la absorbancia, y un análisis del ANOVA para determinar la linealidad del método. El análisis presentado en la Tabla 8 demuestra que existe una fuerte correlación entre las variables, como lo indica el valor de t calculado (86,11), que supera ampliamente el t crítico (1,71), lo cual permite rechazar la hipótesis nula (H_0) de que no existe relación entre las variables.

Tabla 8. Prueba de significancia t Student para evaluar la linealidad.

Parámetro	Resultado	*t* calculado	*t* critico	Interpretación

Pendiente		86,11	1,71	Se rechaza H_0, la variable *x* se correlaciona con la variable *y*.
Intercepto		5,88		Se rechaza H_0, el intercepto es significativamente diferente de cero.
P value	$2,55247 \times 10^{-29}$			Se rechaza H_0, la variable *x* se correlaciona con la variable *y*.
F	7416,08			
F critico	248,57			

El análisis de los residuos, representado en la Figura 29, muestra una distribución homocedástica, lo que indica que la varianza de los errores es constante a lo largo del rango de concentración evaluado. Asimismo, la Figura 30, que evalúa la probabilidad normal, revela que los residuos siguen una distribución normal, lo cual valida uno de los supuestos fundamentales del modelo lineal.

Por último, el estadístico F (7416,08), significativamente superior al valor de F crítico (248,57), refuerza la conclusión de que el modelo es adecuado para describir la relación entre las variables. En conjunto, estos resultados confirman que el método analítico es lineal y apropiado para cuantificar el clorhidrato de proparacaína en los estudios de permeación corneal.

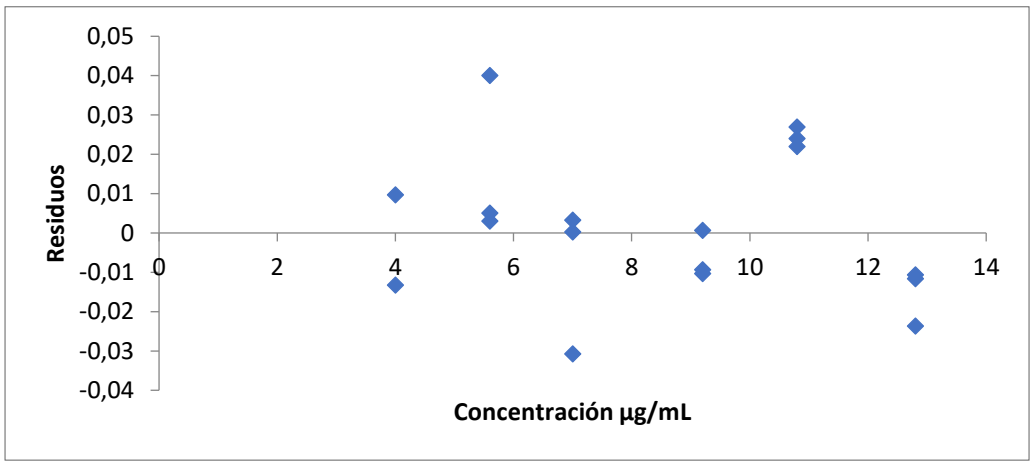

Figura 29. Gráfico de los residuos.

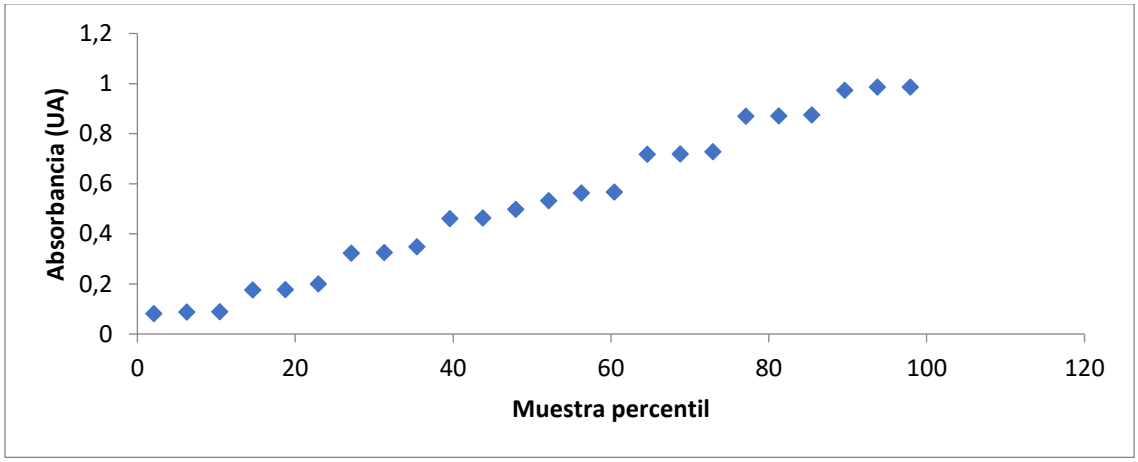

Figura 30. Probabilidad normal.

Anexo B: Análisis estadístico

Ensayo de permeación

Para complementar los hallazgos principales del estudio, en esta sección se presentan los análisis estadísticos realizados mediante ANOVA de medidas repetidas y ANOVA de tres vías. Estos análisis permitieron evaluar el impacto del tiempo y la dosis en la cantidad acumulada permeada, así como la interacción entre ambos factores. A continuación, se describen los resultados obtenidos y las comparaciones post-hoc realizadas para identificar diferencias significativas entre las condiciones evaluadas.

Con base en los resultados del ANOVA de medidas repetidas presentados en la Tabla 9, se identificaron cambios significativos en la variable dependiente cantidad acumulada permeada a lo largo del tiempo para todas las dosis evaluadas. Este análisis inicial permitió identificar cómo el tiempo afecta significativamente la permeación de manera individual para cada dosis, destacando variaciones en función del tiempo y sugiriendo diferencias en el comportamiento entre las concentraciones evaluadas.

Tabla 9. Resultados del ANOVA de medidas repetidas para la evaluación de la variable cantidad acumulada permeada en diferentes dosis.

Dosis (mg/mL)	Efecto	F	p	Significancia (p<0.05)
2.25 (dosis finita-producto)	Tiempo	78.24	6.42×10^{-9}	*
4.5 (dosis abuso-producto)		671.23	1.91×10^{-14}	*
4.5 (activo)		86.53	3.57×10^{-9}	*
53.152 (dosis infinita -activo)		201.35	2.49×10^{-11}	*

Posteriormente, se llevó a cabo un ANOVA de tres vías para analizar de manera más integral el impacto combinado de las variables tiempo y dosis. En este análisis, se excluyeron los datos correspondientes a la dosis infinita, dado que sus condiciones experimentales diferían significativamente de las demás dosis (Tabla 10). Este análisis confirmó que tanto las dosis como el tiempo tienen un efecto significativo sobre la cantidad

acumulada permeada ($p<0.05$), y destacó una interacción dosis-tiempo significativa. Esto último sugiere que los efectos del tiempo sobre la cantidad acumulada permeada dependen de la dosis utilizada, lo que resalta la complejidad de las interacciones entre ambos factores.

Tabla 10. Resultados del ANOVA de tres vías para la evaluación de la cantidad acumulada permeada en función del tiempo (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 4 horas) y las distintas condiciones de dosificación (dosis finita, condiciones de abuso y activo a 4.5 mg/mL).

Efecto	F	p	Significancia ($p<0.05$)
Intercepto	4531.10	7.23×10^{-10}	*
dosis	196.19	3.41×10^{-6}	*
Tiempo	373.70	6.95×10^{-31}	*
Dosis: tiempo	4.82	1.14×10^{-4}	*

Datos no incluyen dosis infinita.

Se llevaron a cabo comparaciones post-hoc mediante el método de Tukey para identificar diferencias específicas entre las dosis (excluyendo la dosis infinita) y los tiempos evaluados, con el objetivo de complementar y detallar los resultados obtenidos en el ANOVA. En el caso de las dosis, se identificaron diferencias significativas entre activo 4.5 mg/mL y producto 2.5 mg/mL ($p<0.0001$), así como entre producto 2.5 mg/mL y producto 4.5 mg/mL ($p=0.0002$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre activo 4.5 mg/mL y producto 4.5 mg/mL ($p=0.7785$).

En cuanto a los tiempos, se encontraron diferencias significativas al comparar intervalos iniciales (30 minutos) con intervalos más prolongados, destacándose particularmente el cambio entre tiempo 30 y 150 minutos ($p=0.0001$), con una diferencia estimada de -56.0 unidades en la cantidad acumulada permeada. Además, las diferencias se intensifican en intervalos superiores a los 150 minutos, como lo demuestran las comparaciones entre tiempo 30 y 180 ($p<0.0001$) y tiempo 30 y 240 min ($p<0.0001$), con incrementos mayores a 71.6 unidades en la cantidad acumulada permeada. Estas diferencias reflejan un incremento sustancial en la cantidad permeada a medida que avanza el tiempo, especialmente en intervalos superiores a los 150 minutos.

Ensayo de irritación

El análisis histológico de las córneas tratadas incluyó un modelo lineal mixto con tratamiento y lesión como efectos fijos, y réplica y repetición como efectos aleatorios. El ANOVA evidenció que los residuos no cumplen con la normalidad y presentan heterocedasticidad, especialmente en el conteo de células. La prueba de Levene confirmó homogeneidad de varianzas para la escala de gradación, pero no para el conteo celular. Pruebas adicionales de normalidad, como Shapiro-Wilk, mostraron valores de p inferiores a 0.05 en la mayoría de los grupos, rechazando la normalidad en ambas variables y justificando el uso de pruebas no paramétricas.

Bibliografía

1. Kanski J, Bowling B. Oftalmología Clínica. 8a Edición. Elsevier, editor. España; 2016.

2. Kumar A, Yun H, Funderburgh ML, Du Y. Regenerative therapy for the Cornea. Prog Retin Eye Res. 2022 Mar;87:101011.

3. Agrahari V, Mandal A, Agrahari V, Trinh HM, Joseph M, Ray A, et al. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. Drug Deliv Transl Res. 2016 Dec 31;6(6):735–54.

4. Mathews PM, Lindsley K, Aldave AJ, Akpek EK. Etiology of Global Corneal Blindness and Current Practices of Corneal Transplantation: A Focused Review. Cornea. 2018 Sep 14;37(9):1198–203.

5. Chiang P, Keeffe J, Le Mesurier R, Taylor H. Global burden of disease and visual impairment. The Lancet. 2006 Jul;368(9533):365.

6. Steinmetz JD, Bourne RRA, Briant PS, Flaxman SR, Taylor HRB, Jonas JB, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet Glob Health. 2021 Feb;9(2):e144–60.

7. Wang C, Pang Y. Nano-based eye drop: Topical and noninvasive therapy for ocular diseases. Adv Drug Deliv Rev. 2023 Mar;194:114721.

8. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. PLoS Biol. 2020 Jul 14;18(7):e3000411.

9. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP) [Internet]. OCDE; 2018 [cited 2023 Feb 18]. (OECD Series on Testing and Assessment). Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-good-in-vitro-method-practices-givimp_9789264304796-en

10. Onodera H, Sasaki S, Otake S, Tomohiro M, Shibuya K, Nomura M. General considerations in ocular toxicity risk assessment from the toxicologists' viewpoints. J Toxicol Sci. 2015;40(3):295–307.

11. Karamouzian M, Esmaeili H, Sharifi A, Sharifi H, Mokhtari M, Nejad A, et al. Topical ocular anesthetic abuse among Iranian welders: time for action. Middle East Afr J Ophthalmol. 2013;20(4):336.

12. Sughra U, Khan WA, Kausar S. Topical Ocular Anesthetic Use among Welders of Rawalpindi City, Pakistan. J Coll Physicians Surg Pak. 2021 Jun;30(6):737–9.

13. Fan WY, Sui YL, Fan TJ. Proparacaine induces cytotoxicity and mitochondria-dependent apoptosis in corneal stromal cells both in vitro and in vivo. Toxicol Res (Camb). 2016;5(5):1434–44.

14. Abuin L, Cecilia MD, Ferella E, Leticia M. Queratopatía por abuso de anestésicos. Oftalmología Clínica y Experimental. 2012;5(3):95–101.

15. Zagelbaum BM, Tostanoski JR, Hochman MA, Hersh PS. Topical lidocaine and proparacaine abuse. Am J Emerg Med. 1994 Jan;12(1):96–7.

16. Baradad-Jurjo MC, Planas-Domenech N, Barnils-Garcia N, López-López M, Martí-Huguet T. Topical anesthetic abuse keratopathy in a contact lens wearer. J Fr Ophtalmol. 2022 Jan;45(1):154–6.

17. Sharifi A, Naisir N, Shams M, Sharifi M, Sharifi H. Adverse Reactions from Topical Ophthalmic Anesthetic Abuse. J Ophthalmic Vis Res. 2022 Nov 24;

18. Aksoy A, Başkan AM, Aslan L, Aslankurt M. Topical proparacaine abuse resulting in evisceration. BMJ Case Rep. 2013 Apr 22;2013.

19. Agnieszka B, Agnieszka K, Jan O, Joanna G, Tomasz G, Anna W, et al. Pharmacokinetics and ocular disposition of paracetamol and paracetamol glucuronide in rabbits with diabetes mellitus induced by alloxan. Pharmacological Reports. 2012 Mar;64(2):421–7.

20. Pamulapati CR, Schoenwald RD. Ocular Pharmacokinetics of a Novel Tetrahydroquinoline Analog in Rabbit: Compartmental Analysis and PK–PD Evaluation. J Pharm Sci. 2012 Jan;101(1):414–23.

21. Fayyaz A, Ranta VP, Toropainen E, Vellonen KS, Valtari A, Puranen J, et al. Topical ocular pharmacokinetics and bioavailability for a cocktail of atenolol, timolol and betaxolol in rabbits. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020 Dec;155:105553.

22. Park CG, Choi K, Kim YK, Park KH, Kim S, Choy Y Bin. Mathematical modelling of brimonidine absorption via topical delivery of microparticle formulations to the eye. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2016 Jul;39:194–202.

23. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Guidance document on the collection of eye tissues for histological evaluation and collection of data series on testing and assesment [Internet].

2018 [cited 2023 Apr 6]. Available from: https://one.oecd.org/document/env/jm/mono(2011)45/rev1/en/pdf

24. Food and Drug Administration. In Vitro Permeation Test Studies for Topical Drug Products Submitted in ANDAs Guidance for Industry [Internet]. 2022. Available from: https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs

25. Baena Y, Dallos L, Manzo R, Ponce de León L. Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2011;40(2):174–88.

26. Sanabria LM, Martínez JA, Baena Y. Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. 2017 May 1;46(2).

27. Ospina VE, Mantilla JC, Conde CA, Escobar P. Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. Ciencias de la Salud. 2014 May 30;12(2):195–211.

28. Mannermaa E, Vellonen KS, Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood–retina barrier: Emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. Adv Drug Deliv Rev. 2006 Nov;58(11):1136–63.

29. Zeng Y, Yang J, Huang K, Lee Z, Lee X. A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. J Biomech. 2001 Apr;34(4):533–7.

30. Elsheikh A, Alhasso D, Rama P. Biomechanical properties of human and porcine corneas. Exp Eye Res. 2008 May;86(5):783–90.

31. Agarwal P, Rupenthal ID. In vitro and ex vivo corneal penetration and absorption models. Drug Deliv Transl Res. 2016 Dec;6(6):634–47.

32. Awwad S, Mohamed Ahmed AHA, Sharma G, Heng JS, Khaw PT, Brocchini S, et al. Principles of pharmacology in the eye. Br J Pharmacol. 2017 Dec;174(23):4205–23.

33. BioRender [Internet]. 2023 [cited 2023 Apr 23]. Available from: https://app.biorender.com/biorender-templates

34. Downie LE, Bandlitz S, Bergmanson JPG, Craig JP, Dutta D, Maldonado-Codina C, et al. BCLA CLEAR - Anatomy and physiology of the anterior eye. Contact Lens and Anterior Eye. 2021 Apr;44(2):132–56.

35. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. J Cataract Refract Surg. 2011 Mar;37(3):588–98.

36. Soni V, Pandey V, Tiwari R, Asati S, Tekade RK. Design and Evaluation of Ophthalmic Delivery Formulations. In: Basic Fundamentals of Drug Delivery. Elsevier; 2019. p. 473–538.

37. Tian B, Bilsbury E, Doherty S, Teebagy S, Wood E, Su W, et al. Ocular Drug Delivery: Advancements and Innovations. Pharmaceutics. 2022 Sep 13;14(9).

38. Adrianto MF, Annuryanti F, Wilson CG, Sheshala R, Thakur RRS. In vitro dissolution testing models of ocular implants for posterior segment drug delivery. Drug Deliv Transl Res. 2022 Jun 11;12(6):1355–75.

39. Ashique S, Mishra N, Mohanto S, Gowda BHJ, Kumar S, Raikar AS, et al. Overview of processed excipients in ocular drug delivery: Opportunities so far and bottlenecks. Heliyon. 2024 Jan;10(1):e23810.

40. Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. Eur J Pharm Biopharm. 2005 Jul;60(2):207–25.

41. Crafts P. The Role of Solubility Modeling and Crystallization in the Design of Active Pharmaceutical Ingredients. In 2007. p. 23–85.

42. Deb PK, Abed SN, Jaber AMY, Tekade RK. Particulate Level Properties and its Implications on Product Performance and Processing. In: Dosage Form Design Parameters. Elsevier; 2018. p. 155–220.

43. Rousseau RW. Crystallization Processes. In: Encyclopedia of Physical Science and Technology. Elsevier; 2003. p. 91–119.

44. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. European Union; 2010.

45. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 2023: USP 42 . The United States Pharmacopeia 2023: USP 42, editor. Vol. 48. Rockville; 2023.

46. Dahan A, Beig A, Lindley D, Miller JM. The solubility–permeability interplay and oral drug formulation design: Two heads are better than one. Adv Drug Deliv Rev. 2016 Jun;101:99–107.

47. Lennernäs H. Animal data: the contributions of the ussing chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Sep 30;59(11):1103–20.

48. Zhang W, Prausnitz MR, Edwards A. Model of transient drug diffusion across cornea. Journal of Controlled Release. 2004 Sep;99(2):241–58.

49. Valkó KL. Application of HPLC measurements for the determination of physicochemical and biomimetic properties to model in vivo drug distribution in support of early drug discovery. In 2020. p. 667–758.

50. Dosmar E, Walsh J, Doyel M, Bussett K, Oladipupo A, Amer S, et al. Targeting Ocular Drug Delivery: An Examination of Local Anatomy and Current Approaches. Bioengineering. 2022 Jan 17;9(1):41.

51. Stamper RL, Lieberman MF, Drake M V. Medical treatment of glaucoma: general principles. In: Becker-Shaffer's Diagnosis and Therapy of the Glaucomas. Elsevier; 2009. p. 345–58.

52. Vandervoort J, Ludwig A. Ocular drug delivery: nanomedicine applications. Nanomedicine. 2007 Feb;2(1):11–21.

53. Gratieri T, Gelfuso GM, Thomazini JA, Lopez RFV. Excised Porcine Cornea Integrity Evaluation in an in vitro Model of Iontophoretic Ocular Research. Ophthalmic Res. 2010;43(4):208–16.

54. Mofidfar M, Abdi B, Ahadian S, Mostafavi E, Desai TA, Abbasi F, et al. Drug delivery to the anterior segment of the eye: A review of current and future treatment strategies. Int J Pharm. 2021 Sep;607:120924.

55. Al-Ghananeem A, Crooks P. Phase I and Phase II Ocular Metabolic Activities and the Role of Metabolism in Ophthalmic Prodrug and Codrug Design and Delivery. Molecules. 2007 Mar 8;12(3):373–88.

56. Onugwu AL, Nwagwu CS, Onugwu OS, Echezona AC, Agbo CP, Ihim SA, et al. Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. Journal of Controlled Release. 2023 Feb;354:465–88.

57. Grossniklaus HE, Nickerson JM, Edelhauser HF, Bergman LAMK, Berglin L. Anatomic Alterations in Aging and Age-Related Diseases of the Eye. Investigative Opthalmology & Visual Science. 2013 Dec 13;54(14):ORSF23.

58. Kutlehria S, Sachdeva MS. Role of In Vitro Models for Development of Ophthalmic Delivery Systems. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2021;38(3):1–31.

59. Maurice DM. The permeability to sodium ions of the living rabbit's cornea. J Physiol. 1951 Feb 20;112(3–4):367–91.

60. Dikstein S, Maurice DM. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. J Physiol. 1972 Feb 1;221(1):29–41.

61. Hedbys BO, Mishima S, Maurice DM. The imbibition pressure of the corneal stroma. Exp Eye Res. 1963 Apr;2(2):99-IN1.

62. Maurice D. Characterization of paracellular penetration routes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997 Oct;38(11):2177–80.

63. Maurice DM, Giardini AA. A Simple Optical Apparatus for Measuring the Corneal Thickness, and the Average Thickness of the Human Cornea. British Journal of Ophthalmology. 1951 Mar 1;35(3):169–77.

64. Mishima S, Kudo T. In Vitro Incubation of Rabbit Cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci [Internet]. 1967 [cited 2023 May 21];6(4):329–39. Available from: https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2203555

65. Mishima S, Hedbys BO. The permeability of the corneal epithelium and endothelium to water. Exp Eye Res. 1967 Jan;6(1):10–32.

66. Donn A, Maurice DM, Mills NL. Studies on the living cornea in vitro. II. The active transport of sodium across the epithelium. Arch Ophthalmol. 1959 Nov;62:748–57.

67. Maurice DM. The use of fluorescein in ophthalmological research. Invest Ophthalmol [Internet]. 1967 Oct [cited 2023 May 21];6(5):464–77. Available from: https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2203579

68. Franz TJ. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. Journal of Investigative Dermatology. 1975 Mar;64(3):190–5.

69. Franz TJ. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. Curr Probl Dermatol. 1978;7:58–68.

70. Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Caramella C. A Modified Franz Diffusion Cell for Simultaneous Assessment of Drug Release and Washability of Mucoadhesive Gels. Pharm Dev Technol. 1999 Jan 6;4(1):45–53.

71. Tegtmeyer S, Papantoniou I, Müller-Goymann CC. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2001 Mar;51(2):119–25.

72. Reichl S, Müller-Goymann CC. [Development of an organotypic corneal construction as an in vitro model for permeability studies]. Ophthalmologe. 2001 Sep;98(9):853–8.

73. Elhabal SF, Ghaffar SA, Hager R, Elzohairy NA, Khalifa MM, Mohie PM, et al. Development of thermosensitive hydrogel of Amphotericin-B and Lactoferrin combination-loaded PLGA-PEG-PEI nanoparticles for potential eradication of ocular fungal infections: In-vitro, ex-vivo and in-vivo studies. Int J Pharm X. 2023 Dec;5:100174.

74. Alsaidan OA, Zafar A, Yasir M, Alzarea SI, Alqinyah M, Khalid M. Development of Ciprofloxacin-Loaded Bilosomes In-Situ Gel for Ocular Delivery: Optimization, In-Vitro Characterization, Ex-Vivo Permeation, and Antimicrobial Study. Gels. 2022 Oct 25;8(11):687.

75. Khattab A, Marzok S, Ibrahim M. Development of optimized mucoadhesive thermosensitive pluronic based in situ gel for controlled delivery of Latanoprost: Antiglaucoma efficacy and stability approaches. J Drug Deliv Sci Technol. 2019 Oct;53:101134.

76. Di Prima G, Bongiovì F, Palumbo FS, Pitarresi G, Licciardi M, Giammona G. Mucoadhesive PEGylated inulin-based self-assembling nanoparticles: In vitro and ex vivo transcorneal permeation enhancement of corticosteroids. J Drug Deliv Sci Technol. 2019 Feb;49:195–208.

77. Al-Ghabeish M, Xu X, Krishnaiah YSR, Rahman Z, Yang Y, Khan MA. Influence of drug loading and type of ointment base on the in vitro performance of acyclovir ophthalmic ointment. Int J Pharm. 2015 Nov;495(2):783–91.

78. Yu Y, Feng R, Li J, Wang Y, Song Y, Tan G, et al. A hybrid genipin-crosslinked dual-sensitive hydrogel/nanostructured lipid carrier ocular drug delivery platform. Asian J Pharm Sci. 2019 Jul;14(4):423–34.

79. Bao Q, Newman B, Wang Y, Choi S, Burgess DJ. In vitro and ex vivo correlation of drug release from ophthalmic ointments. Journal of Controlled Release. 2018 Apr;276:93–101.

80. Ilka R, Mohseni M, Kianirad M, Naseripour M, Ashtari K, Mehravi B. Nanogel-based natural polymers as smart carriers for the controlled delivery of Timolol Maleate through the cornea for glaucoma. Int J Biol Macromol. 2018 Apr;109:955–62.

81. Dave V, Paliwal S. A novel approach to formulation factor of aceclofenac eye drops efficiency evaluation based on physicochemical characteristics of

in vitro and in vivo permeation. Saudi Pharmaceutical Journal. 2014 Jul;22(3):240–5.

82. Gupta H, Jain S, Mathur R, Mishra P, Mishra AK, Velpandian T. Sustained Ocular Drug Delivery from a Temperature and pH Triggered Novel In Situ Gel System. Drug Deliv. 2007 Jan 10;14(8):507–15.

83. Pawar PK, Majumdar DK. Effect of formulation factors on in vitro permeation of moxifloxacin from aqueous drops through excised goat, sheep, and buffalo corneas. AAPS PharmSciTech. 2006 Mar;7(1):E89.

84. Reichl S, Müller-Goymann CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. Int J Pharm. 2003 Jan;250(1):191–201.

85. Li Q, Li Z, Zeng W, Ge S, Lu H, Wu C, et al. Proniosome-derived niosomes for tacrolimus topical ocular delivery: in vitro cornea permeation, ocular irritation, and in vivo anti-allograft rejection. Eur J Pharm Sci. 2014 Oct 1;62:115–23.

86. Li X, Nie S fang, Kong J, Li N, Ju C yi, Pan W san. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. Int J Pharm. 2008 Nov;363(1–2):177–82.

87. Singla S, Majumdar DK, Goyal S, Khilnani G. Evidence of carrier mediated transport of ascorbic acid through mammalian cornea. Saudi Pharmaceutical Journal. 2011 Jul;19(3):165–70.

88. Fangueiro JF, Calpena AC, Clares B, Andreani T, Egea MA, Veiga FJ, et al. Biopharmaceutical evaluation of epigallocatechin gallate-loaded cationic lipid nanoparticles (EGCG-LNs): In vivo , in vitro and ex vivo studies. Int J Pharm. 2016 Apr;502(1–2):161–9.

89. Song K, Yan M, Li M, Geng Y, Wu X. Preparation and in vitro-in vivo evaluation of novel ocular nanomicelle formulation of thymol based on glycyrrhizin. Colloids Surf B Biointerfaces. 2020 Oct;194:111157.

90. Chaudhari P, Naik R, Sruthi Mallela L, Roy S, Birangal S, Ghate V, et al. A supramolecular thermosensitive gel of ketoconazole for ocular applications: In silico, in vitro, and ex vivo studies. Int J Pharm. 2022 Feb 5;613:121409.

91. Mudgil M. Preparation and In Vitro/Ex Vivo Evaluation of Moxifloxacin-Loaded PLGA Nanosuspensions for Ophthalmic Application. Sci Pharm. 2013;81(2):591–606.

92. Alhowyan AA, Kalam MA, Iqbal M, Raish M, El-Toni AM, Alkholief M, et al. Mesoporous Silica Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for 5-Fluorouracil Ocular Delivery: Characterization, In Vitro and In Vivo Studies. Molecules. 2023 Jan 27;28(3):1260.

93. Bíró T, Bocsik A, Jurišić Dukovski B, Gróf I, Lovrić J, Csóka I, et al. New Approach in Ocular Drug Delivery: In vitro and ex vivo Investigation of Cyclodextrin-Containing, Mucoadhesive Eye Drop Formulations. Drug Des Devel Ther. 2021;15:351–60.

94. Sharma D, Wadhwa S, Gulati M, Kumar B, Chitranshi N, Gupta V, et al. Chitosan-modified 5-fluorouracil nanostructured lipid carriers for treatment of diabetic retinopathy in rats: a new dimension to an anticancer drug. Int J Biol Macromol. 2023 Jan;224:810–30.

95. Alzahrani A, Youssef AAA, Nyavanandi D, Tripathi S, Bandari S, Majumdar S, et al. Design and optimization of ciprofloxacin hydrochloride biodegradable 3D printed ocular inserts: Full factorial design and in-vitro and ex-vivo evaluations: Part II. Int J Pharm. 2023 Jan;631:122533.

96. Uner B, Ozdemir S, Yildirim E, Yaba A, Tas C, Uner M, et al. Loteprednol loaded nanoformulations for corneal delivery: Ex-vivo permeation study, ocular safety assessment and stability studies. J Drug Deliv Sci Technol. 2023 Mar;81:104252.

97. Juretić M, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J, Hafner A, Lovrić J, Pepić I. Biopharmaceutical evaluation of surface active ophthalmic excipients using in vitro and ex vivo corneal models. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018 Jul;120:133–41.

98. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. OCDE; 2021.

99. Draize J, Woodard G, Calvery H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes . Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1944;82(3):377–90.

100. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD). Second Edition - Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation [Internet]. OECD; 2019 [cited 2023 Feb 18]. (OECD Series on Testing and Assessment). Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/second-edition-guidance-document-on-integrated-

approaches-to-testing-and-assessment-iata-for-serious-eye-damage-and-eye-irritation_84b83321-en

101. Kaluzhny Y, Klausner M. In vitro reconstructed 3D corneal tissue models for ocular toxicology and ophthalmic drug development. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2021 Feb 5;57(2):207–37.

102. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OCDE; 2023.

103. Burton ABG. A method for the objective assessment of eye irritation. Food Cosmet Toxicol. 1972 Jan;10(2):209–17.

104. Borenfreund E, Borrero O. In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test. Cell Biol Toxicol. 1984 Oct;1(1):55–65.

105. Märtins T, Pauluhn J, Machemer L. Analysis of alternative methods for determining ocular irritation. Food and Chemical Toxicology. 1992 Dec;30(12):1061–7.

106. Gautheron P, Dukic M, Alix D, Sina JF. Bovine corneal opacity and permeability test: an in vitro assay of ocular irritancy. Fundam Appl Toxicol. 1992 Apr;18(3):442–9.

107. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OCDE; 2018.

108. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Test No. 492B: Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification. OCDE; 2022.

109. Lancina MG, Wang J, Williamson GS, Yang H. Dentimol as a dendrimeric timolol analogue for glaucoma therapy: synthesis and preliminary efficacy and safety assessment. Mol Pharm. 2018 Jul 2;15(7):2883–9.

110. Han S, Shen J qiu, Gan Y, Geng H ming, Zhang X xin, Zhu C liu, et al. Novel vehicle based on cubosomes for ophthalmic delivery of flurbiprofen with low irritancy and high bioavailability. Acta Pharmacol Sin. 2010 Aug;31(8):990–8.

111. Cardoso TP de A, Kishishita J, Souza ATM, Vieira JRC, Melo CML de, Santana DP de, et al. A proposed eye ex vivo permeation approach to

evaluate pesticides: Case dimethoate. Toxicology in Vitro. 2020 Aug;66:104833.

112. Gómez-Segura L, Parra A, Calpena AC, Gimeno Á, Boix-Montañes A. Carprofen Permeation Test through Porcine Ex Vivo Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues for Tolerability Assessments: Validation and Histological Study. Vet Sci. 2020 Oct 10;7(4):152.

113. Verstraelen S, Maglennon G, Hollanders K, Boonen F, Adriaens E, Alépée N, et al. Reprint of “CON4EI: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals.” Toxicology in Vitro. 2018 Oct;44:122–33.

114. Kolle SN, Van Cott A, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Lacking applicability of in vitro eye irritation methods to identify seriously eye irritating agrochemical formulations: Results of bovine cornea opacity and permeability assay, isolated chicken eye test and the EpiOcularTM ET-50 method to classify according to UN GHS. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2017 Apr;85:33–47.

115. Jeong MK, Kim BH. Grading criteria of histopathological evaluation in BCOP assay by various staining methods. Toxicol Res. 2022 Jan;38(1):9–17.

116. Furukawa M, Sakakibara T, Itoh K, Kawamura K, Sasaki S, Matsuura M. Histopathological evaluation of the ocular-irritation potential of shampoos, make-up removers and cleansing foams in the bovine corneal opacity and permeability assay. J Toxicol Pathol. 2015 Oct;28(4):243–8.

117. Barile FA. Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010 Mar;61(2):136–45.

118. Pescina S, Govoni P, Potenza A, Padula C, Santi P, Nicoli S. Development of a Convenient ex vivo Model for the Study of the Transcorneal Permeation of Drugs: Histological and Permeability Evaluation. J Pharm Sci. 2015 Jan;104(1):63–71.

119. Piehl M, Gilotti A, Donovan A, DeGeorge G, Cerven D. Novel cultured porcine corneal irritancy assay with reversibility endpoint. Toxicology in Vitro. 2010 Feb;24(1):231–9.

120. Schoen HF, Candia OA. Effects of tertiary amine local anesthetics on ion transport in the isolated bullfrog cornea. Exp Eye Res. 1979 Feb;28(2):199–209.

121. Fuchsjäger-Mayrl G, Zehetmayer M, Plass H, Turnheim K. Alkalinization increases penetration of lidocaine across the human cornea. J Cataract Refract Surg. 2002 Apr;28(4):692–6.

122. Igarashi H, Sato Y, Hamada S, Kawasaki T. Studies on rabbit corneal permeability of local anesthetics (I). Jpn J Pharmacol. 1984;34(4):429–34.

123. Lalatsa A, Patel P V., Sun Y, Kiun CC, Karimi F, Zekonyte J, et al. Transcutaneous anaesthetic nano-enabled hydrogels for eyelid surgery. Int J Pharm. 2020 Mar;577:119003.

124. Diaz L. Evaluación de la permeación y la irritación ocular y dérmica de una mezcla de ramnolípidos a través de metodologías in vitro [tesis de maestría]. [Bogotá D.C., Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2019.

125. Salamanca CH, Barrera-Ocampo A, Lasso JC, Camacho N, Yarce CJ. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. Pharmaceutics. 2018 Sep 5;10(3).

126. PermeGear. Franz Cell – The Original. 2023 [cited 2023 Apr 6]; Available from: https://permegear.com/franz-cells/

127. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. OCDE; 2004.

128. Moss GP, Gullick DR, Wilkinson SC. Predictive Methods in Percutaneous Absorption. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.

129. Ehrhardt C, Kwang-Jin K. Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models. New York: Springer; 2008.

130. Enderle JD. Bioelectric Phenomena. In: Introduction to Biomedical Engineering. Elsevier; 2012. p. 747–815.

131. Rauchman SH, Locke B, Albert J, De Leon J, Peltier MR, Reiss AB. Toxic External Exposure Leading to Ocular Surface Injury. Vision. 2023 Apr 3;7(2):32.

132. Nourse WL, Tyson CA, Bednarz RM. Mechanisms of mild ocular irritation. Toxicology in Vitro. 1995 Dec;9(6):967–76.

133. UNECE. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations; 2021.

134. Parasuraman S. Toxicological screening. J Pharmacol Pharmacother. 2011 Jun 11;2(2):74–9.

135. Brock WJ, Somps CJ, Torti V, Render JA, Jamison J, Rivera MI. Ocular Toxicity Assessment From Systemically Administered Xenobiotics. Int J Toxicol. 2013 May 24;32(3):171–88.

136. Short BG. Safety Evaluation of Ocular Drug Delivery Formulations: Techniques and Practical Considerations. Toxicol Pathol. 2008 Jan 1;36(1):49–62.

137. Glaudo M, Panfil C, Schrage NF. Defining corneal chemical burns: A novel exact and adjustable ocular model. Toxicol Rep. 2021;8:1200–6.

138. Schrage NF, Abu SS, Hermanns L, Panfil C, Dutescu RM. Irrigation with phosphate-buffered saline causes corneal calcification during treatment of ocular burns. Burns. 2019 Dec;45(8):1871–9.

139. Griffith GL, Wirostko B, Lee HK, Cornell LE, McDaniel JS, Zamora DO, et al. Treatment of corneal chemical alkali burns with a crosslinked thiolated hyaluronic acid film. Burns. 2018 Aug;44(5):1179–86.

140. Bhasker S, Kislay R, Rupinder KK, Jagat KR. Evaluation of nanoformulated therapeutics in an ex-vivo bovine corneal irritation model. Toxicology in Vitro. 2015 Aug;29(5):917–25.

141. Prinsen MK, Schipper MEI, Wijnands MVW. Histopathology in the isolated chicken eye test and comparison of different stainings of the cornea. Toxicology in Vitro. 2011 Oct;25(7):1475–9.

142. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). SIDS Initial Assessment Report SODIUM HYDROXIDE CAS N°: 1310-73-2 [Internet]. Paris; 2002 Mar [cited 2024 Aug 6]. Available from: https://hpvchemicals.oecd.org/ui/handler.axd?id=4d5cda68-5a7d-4ab6-85ec-20a0fd6592ca#:~:text=Based%20on%20human%20data%20concentrations,concentration%20was%201.2%20%25%20or%20higher

143. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. OCDE; 2023.

144. Nemr AA, El-Mahrouk GM, Badie HA. Hyaluronic acid-enriched bilosomes: an approach to enhance ocular delivery of agomelatine via D-optimal design: formulation, *in vitro* characterization, and *in vivo* pharmacodynamic evaluation in rabbits. Drug Deliv. 2022 Dec 31;29(1):2343–56.

145. Sá L de L, Rodrigues RV, Alves VM, Gaspar LR. Strategies for the evaluation of the eye irritation potential of different types of surfactants and silicones used in cosmetic products. Toxicology in Vitro. 2022 Jun;81:105351.

146. Vincent A, Bernard L, Léone M. Farmacología de los anestésicos locales. EMC - Podología. 2019 Oct;21(4):1–19.

147. Becker DE, Reed KL. Local anesthetics: review of pharmacological considerations. Anesth Prog. 2012;59(2):90–101; quiz 102–3.

148. Drugbank. Drugbank online [Internet]. 2024 [cited 2024 Jun 12]. Available from: https://go.drugbank.com/

149. Whigan DB. Proparacaine Hydrochloride. In: Florey K, editor. Analytical Profiles of Drug Substances. New Brunswick; 1977. p. 423–56.

150. National Library of Medicine (US). PubChem [Internet]. Vol. 51. [cited 2025 Mar 22]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

151. Settimo L, Bellman K, Knegtel RMA. Comparison of the Accuracy of Experimental and Predicted pKa Values of Basic and Acidic Compounds. Pharm Res. 2014 Apr 19;31(4):1082–95.

152. Maher TJ. Anesthetic Agents: General and Local Anesthetics. In: Lemke TL, Williams DA, editors. Foye's Principles of Medicinal Chemistry [Internet]. 7th ed. Philadelphia; 2012 [cited 2025 Mar 23]. p. 508–22. Available from: https://downloads.lww.com/wolterskluwer_vitalstream_com/sample-content/9781609133450_Lemke/samples/Chapter_16.pdf

153. Pope RLE, Brown AM. A primer on tissue pH and local anesthetic potency. Adv Physiol Educ. 2020 Sep 1;44(3):305–8.

154. Yamuna M, Divya T. Drug pKa value prediction – Using graph eccentricity. International Journal of Green Pharmacy [Internet]. 2018 [cited 2025 Mar 23];12:168–74. Available from: http://greenpharmacy.info/index.php/ijgp/article/viewFile/1948/917

155. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye. J Pharm Sci. 1998 Dec;87(12):1479–88.

156. Luo AM, Sasaki H, Lee VHL. Ocular drug interactions involving topically applied timolol in the pigmented rabbit. Curr Eye Res. 1991 Jan 2;10(3):231–40.

157. Eke T. Anesthesia for glaucoma surgery. Ophthalmol Clin North Am. 2006 Jun;19(2):245–55.

158. Rafailov L, Kulak A, Weedon J, Shinder R. Comparison of Lidocaine Gel–Assisted Transconjunctival and Transcutaneous Local Anesthesia for Outpatient Eyelid Surgery. Ophthalmic Plast Reconstr Surg. 2015 Nov;31(6):470–3.

159. Mahan M, Flor R, Purt B. Local And Regional Anesthesia in Ophthalmology and Ocular Trauma. 2023.

160. Mahajan A, Derian A. Local Anesthetic Toxicity. 2023.

161. El-Boghdadly K, Pawa A, Chin KJ. Local anesthetic systemic toxicity: current perspectives. Local Reg Anesth. 2018 Aug;Volume 11:35–44.

162. McGee HT, Fraunfelder F. Toxicities of topical ophthalmic anesthetics. Expert Opin Drug Saf. 2007 Nov 30;6(6):637–40.

163. Patel M, Fraunfelder FW. Toxicity of topical ophthalmic anesthetics. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013 Aug 25;9(8):983–8.

164. Moon J, Choi SH, Lee MJ, Jo DH, Park UC, Yoon SO, et al. Ocular surface complications of local anticancer drugs for treatment of ocular tumors. Ocul Surf. 2021 Jan;19:16–30.

165. Maurice D, Singh T. A permeability test for acute corneal toxicity. Toxicol Lett. 1986 May;31(2):125–30.

166. Gohil H, Miskovic M, Buxton JA, Holland SP, Strike C. Smoke Gets in the Eye: A systematic review of case reports of ocular complications of crack cocaine use. Drug Alcohol Rev. 2022 Feb;41(2):347–55.

167. Erdem E, Undar IH, Esen E, Yar K, Yagmur M, Ersoz R. Topical anesthetic eye drops abuse: are we aware of the danger? Cutan Ocul Toxicol. 2013 Sep 15;32(3):189–93.

168. Sun R, Hamilton RC, Gimbel H V. Comparison of 4 topical anesthetic agents for effect and corneal toxicity in rabbits. J Cataract Refract Surg. 1999 Sep;25(9):1232–6.

169. Liu JC, Steinemann TL, McDonald MB, Thompson HW, Beuerman RW. Topical Bupivacaine and Proparacaine: A Comparison of Toxicity, Onset of Action, and Duration of Action. Cornea. 1993 May;12(3):228–32.

170. Swaminathan A, Otterness K, Milne K, Rezaie S. The Safety of Topical Anesthetics in the Treatment of Corneal Abrasions: A Review. J Emerg Med. 2015 Nov;49(5):810–5.

171. Moreira LB, Kasetsuwan N, Sanchez D, Shah SS, LaBree L, McDonnell PJ. Toxicity of topical anesthetic agents to human keratocytes in vivo. J Cataract Refract Surg. 1999 Jul;25(7):975–80.

172. Tappeiner C, Flueckiger F, Boehnke M, Goldblum D, Garweg JG. Effect of topical anesthetic agents and ethanol on corneoepithelial wound healing in an ex vivo whole-globe porcine model. J Cataract Refract Surg. 2012 Mar;38(3):519–24.

173. Begum G, Leigh T, Courtie E, Moakes R, Butt G, Ahmed Z, et al. Rapid assessment of ocular drug delivery in a novel ex vivo corneal model. Sci Rep. 2020 Jul 16;10(1):11754.

174. Loch C, Zakelj S, Kristl A, Nagel S, Guthoff R, Weitschies W, et al. Determination of permeability coefficients of ophthalmic drugs through different layers of porcine, rabbit and bovine eyes. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012 Aug;47(1):131–8.

175. Ministerio de Salud. Resolución No 008430. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. [Internet]. Bogotá; 1993 [cited 2023 Apr 8]. Available from: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF

176. Congreso de Colombia. Ley 84. Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. [Internet]. Bogotá; 1989 [cited 2023 Apr 8]. Available from: https://www.dnp.gov.co/programas/justicia-seguridad-y-gobierno/Documents/ANEXO%203_LEY%2084%20DE%201989.pdf

177. Armitage WJ. Preservation of Human Cornea. Transfusion Medicine and Hemotherapy. 2011;38(2):143–7.

178. Kaur A, Priyadarshini S, Mohanty A, Sahu S, Das S. Preservation of donor corneal epithelium in McCarey-Kaufman medium. Indian J Ophthalmol. 2022;70(8):2946.

179. Thoft RA, Friend J, Freedman H, Dohlman CH. Corneal Epithelial Preservation. Archives of Ophthalmology. 1975 May 1;93(5):357–61.

180. Lindstrom RL. Advances in corneal preservation. Trans Am Ophthalmol Soc. 1990;88:555–648.

181. Nibourg LM, Koopmans SA. Preservation of enucleated porcine eyes for use in a wet laboratory. J Cataract Refract Surg. 2014 Apr;40(4):644–51.

182. Kissner A, Spoerl E, Jung R, Spekl K, Pillunat LE, Raiskup F. Pharmacological Modification of the Epithelial Permeability by Benzalkonium Chloride in UVA/Riboflavin Corneal Collagen Cross-Linking. Curr Eye Res. 2010 Aug 30;35(8):715–21.

183. Koppen C, Gobin L, Tassignon MJ. The Absorption Characteristics of the Human Cornea in Ultraviolet-A Crosslinking. Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice. 2010 Mar;36(2):77–80.

184. Boice EN, Snider EJ. Anterior Segment Organ Culture Platform for Tracking Open Globe Injuries and Therapeutic Performance. Journal of Visualized Experiments. 2021 Aug 25;(174).

185. Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. AAPS PharmSciTech. 2010 Sep 15;11(3):1432–41.

186. Yang Z, Zhao J, Feng Y, Lei Y, Liu D, Qin F, et al. Identification, synthesis and structural confirmation of process-related impurities in proparacaine hydrochloride. J Pharm Biomed Anal. 2020 Oct;190:113497.

187. Cañadas-Enrich C, Abrego G, Alvarado HL, Calpena-Campmany AC, Boix-Montañes A. Pranoprofen quantification in ex vivo corneal and scleral permeation samples: Analytical validation. J Pharm Biomed Anal. 2018 Oct;160:109–18.

188. National Library of Medicine (NIH). 2024. Dailymed.

189. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). CONSULTA DATOS DE PRODUCTOS [Internet]. 2024 [cited 2024 Jun 15]. Available from: https://consultaregistro.invima.gov.co/Consultas/consultas/consreg_encabcum.jsp

190. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th Edition. Philadelphia: Elsevier; 2015.

191. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. Prog Retin Eye Res. 2015 Nov;49:1–16.

192. Crespo-Moral M, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y. Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface. PLoS One. 2020 Jan 13;15(1):e0227732.

193. Muñoz E. Micropunción estromal anterior en la queratopatía bullosa [tesis de maestría]. [Valencia]: Universitat De Valencia; 2006.

194. Daryabari SH, Aghamollaei H, Asadi Amoli F, Jadidi K, Tebyanian H. Histopathology Study of Patients with Delayed Mustard Gas Keratopathy 30 Years After Exposure. Iran J Pathol. 2022 Jul 1;17(3):354–9.

195. Radwan SES, El-Moslemany RM, Mehanna RA, Thabet EH, Abdelfattah EZA, El-Kamel A. Chitosan-coated bovine serum albumin nanoparticles for topical tetrandrine delivery in glaucoma: in vitro and in vivo assessment. Drug Deliv. 2022 Dec;29(1):1150–63.

196. Song J, Bi H, Xie X, Guo J, Wang X, Liu D. Natural borneol enhances geniposide ophthalmic absorption in rabbits. Int J Pharm. 2013 Mar;445(1–2):163–70.

197. Klein S. Influence of different test parameters on in vitro drug release from topical diclofenac formulations in a vertical diffusion cell setup. Pharmazie. 2013 Jul;68(7):565–71.

198. Zhang R, Yang J, Luo Q, Shi J, Xu H, Zhang J. Preparation and in vitro and in vivo evaluation of an isoliquiritigenin-loaded ophthalmic nanoemulsion for the treatment of corneal neovascularization. Drug Deliv. 2022 Dec;29(1):2217–33.

199. Díaz-Tomé V, Bendicho-Lavilla C, García-Otero X, Varela-Fernández R, Martín-Pastor M, Llovo-Taboada J, et al. Antifungal Combination Eye Drops for Fungal Keratitis Treatment. Pharmaceutics. 2022 Dec 22;15(1):35.

200. Lewczuk K, Jabłońska J, Konopińska J, Mariak Z, Rękas M. Schlemm's canal: the outflow 'vessel.' Acta Ophthalmol. 2022 Jun 13;100(4).

201. Shah AM, Galor A. Impact of Ocular Surface Temperature on Tear Characteristics: Current Insights. Clin Optom (Auckl). 2021 Feb;Volume 13:51–62.

202. Kessel L, Johnson L, Arvidsson H, Larsen M. The Relationship between Body and Ambient Temperature and Corneal Temperature. Investigative Opthalmology & Visual Science. 2010 Dec 1;51(12):6593.

203. Vitoux MA, Kessal K, Melik Parsadaniantz S, Claret M, Guerin C, Baudouin C, et al. Benzalkonium chloride-induced direct and indirect toxicity on

corneal epithelial and trigeminal neuronal cells: proinflammatory and apoptotic responses in vitro. Toxicol Lett. 2020 Feb;319:74–84.

204. Mohamed HB, Attia Shafie MA, Mekkawy AI. Chitosan Nanoparticles for Meloxicam Ocular Delivery: Development, In Vitro Characterization, and In Vivo Evaluation in a Rabbit Eye Model. Pharmaceutics. 2022 Apr 20;14(5):893.

205. Üstündağ-Okur N, Gökçe EH, Bozbıyık Dİ, Eğrilmez S, Özer Ö, Ertan G. Preparation and in vitro–in vivo evaluation of ofloxacin loaded ophthalmic nano structured lipid carriers modified with chitosan oligosaccharide lactate for the treatment of bacterial keratitis. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014 Oct;63:204–15.

206. Liu J, Fu S, Wei N, Hou Y, Zhang X, Cui H. The effects of combined menthol and borneol on fluconazole permeation through the cornea ex vivo. Eur J Pharmacol. 2012 Aug;688(1–3):1–5.

207. Xie F, Ji S, Cheng Z. In vitro dissolution similarity factor (f2) and in vivo bioequivalence criteria, how and when do they match? Using a BCS class II drug as a simulation example. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015 Jan;66:163–72.

208. Dincel A, Basci NE, Atilla H, Bozkurt A. Development and Validation of an HPLC–UV–Vis Method for the Determination of Proparacaine in Human Aqueous Humour. Chromatographia. 2007 Sep 23;66(S1):51–6.

209. Latreille PL, Banquy X. A simple method for the subnanomolar quantitation of seven ophthalmic drugs in the rabbit eye. Anal Bioanal Chem. 2015 May 8;407(13):3567–78.

210. Taylor A, McLeod G. Basic pharmacology of local anaesthetics. BJA Educ. 2020 Feb;20(2):34–41.

211. Tojo K. Pharmacokinetic model of transcorneal drug delivery. Math Biosci. 1988 May;89(1):53–77.

212. Avtar R, Tandon D. Modeling the drug transport in the anterior segment of the eye. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008 Oct;35(3):175–82.

213. Schreier S, Malheiros SVP, de Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2000 Nov;1508(1–2):210–34.

214. Toffoletto N, Chauhan A, Alvarez-Lorenzo C, Saramago B, Serro AP. Asymmetry in Drug Permeability through the Cornea. Pharmaceutics. 2021 May 11;13(5):694.

215. Margo CE, Grossniklaus HE, Filutowski O. Clinical-pathologic correlation. In: Ophthalmic Pathology. Elsevier; 2023. p. 363–8.

216. Klyce SD, Hallak J, Romond K, Azar DT, Kim T im. Corneal Physiology: Corneal Form and Function. In: Albert and Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 31–103.

217. National Center for Biotechnology Information (NCBI). National Library of Medicine (NLM), National Institutes of Health (NIH). [cited 2025 Mar 1]. MedGen. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/

218. Alomar TS, Al-Aqaba M, Gray T, Lowe J, Dua HS. Histological and Confocal Microscopy Changes in Chronic Corneal Edema: Implications for Endothelial Transplantation. Investigative Opthalmology & Visual Science. 2011 Oct 17;52(11):8193.

219. Guérin LP, Le-Bel G, Desjardins P, Couture C, Gillard E, Boisselier É, et al. The Human Tissue-Engineered Cornea (hTEC): Recent Progress. Int J Mol Sci. 2021 Jan 28;22(3).

220. Oh JY, Yu JM, Ko JH. Analysis of Ethanol Effects on Corneal Epithelium. Investigative Opthalmology & Visual Science. 2013 Jun 4;54(6):3852.

221. Soni NG, Hoover CK, Da Silva H, Jeng BH. Preservation of the Corneal Epithelium in Different Corneal Storage Media. Cornea. 2015 Nov;34(11):1400–3.

222. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). echemportal [Internet]. [cited 2024 Aug 5]. Available from: https://www.echemportal.org/echemportal/ghs-search

223. Mahajan A, Coelho A, Pissurlenkar R, Fernandes A, Tagalpallewar A. Prediction of Ocular Toxicity of Potential Degradation Products of Proparacaine Hydrochloride Subjected under ICH Recommended Stress Conditions. J Chromatogr Sci. 2023 Apr 24;61(4):393–401.

224. Benhar H, Idri A, Fernández-Alemán JL. Data preprocessing for heart disease classification: A systematic literature review. Comput Methods Programs Biomed. 2020 Oct;195:105635.

225. Seaman CW, Whittingham A, Guest R, Warren N, Olson MJ, Guerriero FJ, et al. An evaluation of a cultured human corneal epithelial tissue model for the determination of the ocular irritation potential of pharmaceutical process materials. Toxicology in Vitro. 2010 Sep;24(6):1862–70.

226. Zhu R, Chen W, Gu D, Wang T, Li J, Pan H. Chondroitin sulfate and L-Cysteine conjugate modified cationic nanostructured lipid carriers: Pre-corneal retention, permeability, and related studies for dry eye treatment. Int J Biol Macromol. 2023 Feb;228:624–37.

227. Khan N, Aqil M, Imam SS, Ali A. Development and evaluation of a novel in situ gel of sparfloxacin for sustained ocular drug delivery: in vitro and ex vivo characterization. Pharm Dev Technol. 2015 Aug 18;20(6):662–9.

228. Gómez-Segura L, Parra A, Calpena-Campmany AC, Gimeno Á, Gómez de Aranda I, Boix-Montañes A. Ex Vivo Permeation of Carprofen Vehiculated by PLGA Nanoparticles through Porcine Mucous Membranes and Ophthalmic Tissues. Nanomaterials. 2020 Feb 18;10(2):355.

229. Jiang G, Jia H, Qiu J, Mo Z, Wen Y, Zhang Y, et al. PLGA Nanoparticle Platform for Trans-Ocular Barrier to Enhance Drug Delivery: A Comparative Study Based on the Application of Oligosaccharides in the Outer Membrane of Carriers. Int J Nanomedicine. 2020 Nov;Volume 15:9373–87.

230. Schrage A, Kolle SN, Moreno MCR, Norman K, Raabe H, Curren R, et al. The Bovine Corneal Opacity and Permeability Test in Routine Ocular Irritation Testing and its Improvement within the Limits of OECD Test Guideline 437. Alternatives to Laboratory Animals. 2011 Mar 1;39(1):37–53.

231. Cydulka R, Betzelos S. Seizures following the use of proparacaine hydrochloride eye drops. J Emerg Med. 1990;8:131–3.

232. Grant RL, Acosta D. Comparative Toxicity of Tetracaine, Proparacaine and Cocaine Evaluated with Primary Cultures of Rabbit Corneal Epithelial Cells. Exp Eye Res. 1994 Apr;58(4):469–78.

233. Riff C, Le Caloch A, Dupouey J, Allanioux L, Leone M, Blin O, et al. Local Anesthetic Plasma Concentrations as a Valuable Tool to Confirm the Diagnosis of Local Anesthetic Systemic Toxicity? A Report of 10 Years of Experience. Pharmaceutics. 2022 Mar 26;14(4).

234. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. OECD; 2023.

235. Hefferren JJ, Klessig RS, Dietz CL. Ultraviolet Absorption of Local Anesthetics with an Aromatic Amino Group as a Function of pH. J Dent Res. 1963 May 1;42(3):793–802.

236. Bahgat EA, Hashem H, Saleh H, Kamel EB, Eissa MS. Manipulation and Processing of Spectral Signals for the Assay of the Newly Authorized Mixture of Bupivacaine/Meloxicam Using Fully Green Solvents and a Comparative Green Evaluation Supporting the Greenness and Sustainability of the Developed Smart Spectrophotometric Methods. J AOAC Int. 2023 Jul 17;106(4):1056–69.

237. Omer LS, Ali RJ. Extraction-Spectrophotometric Determination of Lidocaine Hydrochloride in Pharmaceuticals. Int J Chem. 2017 Sep 29;9(4):49.

238. Hamdan MF, Ramadhani NN, Aziz AYR, Sahra M, Agrabudi AI, Permana AD. Development and validation of UV–Vis spectrophotometry-colorimetric method for the specific quantification of rivastigmine tartrate from separable effervescent microneedles: Ex vivo and in vivo applications in complex biological matrices. J Mol Struct. 2024 May;1303:137589.

239. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis [Internet]. Amsterdam; 2022 [cited 2024 Jun 15]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf

240. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) [Internet]. Geneva; 2005 [cited 2024 Jun 15]. Available from: http://somatek.com/wp-content/uploads/2014/06/sk140605h.pdf

241. Owen T. Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna Conceptos básicos. Agilent Technologies. Alemania ; 2000.

242. Smolinska M, Ostapiv R, Yurkevych M, Poliuzhyn L, Korobova O, Kotsiumbas I, et al. Determination of Benzalkonium Chloride in a Disinfectant by UV Spectrophotometry and Gas and High-Performance Liquid Chromatography: Validation, Comparison of Characteristics, and Economic Feasibility. Int J Anal Chem. 2022 Sep 19;2022:1–8.

243. Tong A, Tang X, Zhang F, Wang B. Study on the shift of ultraviolet spectra in aqueous solution with variations of the solution concentration. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2020 Jun;234:118259.

244. Worsfold PJ. Spectrophotometry| Overview. In: Encyclopedia of Analytical Science. Elsevier; 2005. p. 318–21.

245. Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2016 Mar;77:167–85.

246. Dincel A, Basci NE. An Experimental Design Approach to Selecting the Optimum LC Conditions for the Determination of Local Anaesthetics. Chromatographia. 2007 Sep 20;66(S1):81–5.

247. Van Loco J, Elskens M, Croux C, Beernaert H. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. Accreditation and Quality Assurance. 2002 Jul 1;7(7):281–5.

248. Wisniak J, Polishuk A. Analysis of residuals — a useful tool for phase equilibrium data analysis. Fluid Phase Equilib. 1999 Oct;164(1):61–82.