

Esther Prieto Calvo

Farmacocinética, biodisponibilidad
y tolerancia ocular de memantina
en conejos : Aportaciones al
análisis de una nueva formulación
oftálmica a base de nanopartículas

Departamento
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es
Bregante Ucedo, Miguel Angel
Pérez Oliván, Susana

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

FARMACOCINÉTICA, BIODISPONIBILIDAD Y
TOLERANCIA OCULAR DE MEMANTINA EN
CONEJOS : APORTACIONES AL ANÁLISIS DE UNA
NUEVA FORMULACIÓN OFTÁLMICA A BASE DE
NANOPARTÍCULAS

Autor

Esther Prieto Calvo

Director/es

Bregante Ucedo, Miguel Angel
Pérez Oliván, Susana

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2012



Universidad
Zaragoza

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Farmacología y Fisiología

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia
Servicio Oftalmología. Hospital Universitario Miguel Servet

**Farmacocinética, Biodisponibilidad y
Tolerancia Ocular de Memantina en
Conejos. Aportaciones al Análisis de una
Nueva Formulación Oftálmica a base de
Nanopartículas**

**Memoria para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Zaragoza**

Esther Prieto Calvo
2012

Dra. SUSANA PÉREZ OLIVÁN, Profesora Asociada adscrita al Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza y el Dr. MIGUEL ANGEL BREGANTE UCEDO, Profesor Titular adscrito al Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

Certifican

que la presente memoria de tesis doctoral titulada “*Farmacocinética, Biodisponibilidad y Tolerancia Ocular de Memantina en Conejos. Aportaciones al Análisis de una Nueva Formulación Oftálmica a base de Nanopartículas*” que presenta Dña. ESTHER PRIETO CALVO, Licenciada en Medicina, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne las condiciones necesarias para su lectura y defensa.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Zaragoza a 12 de julio de 2012.

Fdo. Susana Pérez Oliván

Fdo. Miguel Ángel Bregante Ucedo

El presente trabajo es el resultado de la colaboración entre la Unidad de Farmacología del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Miguel Servet y el Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.

«Adelante, siempre adelante. Dios proveerá»

(Carmen Sallés y Barangueras)

Si complejo ha sido plasmar en papel los conocimientos adquiridos durante estos años de trabajo, más difícil me ha resultado aún expresar mi gratitud a todos aquellos que durante este largo proceso habéis estado a mi lado.

En primer lugar, quiero manifestar mi agradecimiento a mis directores de Tesis, los profesores Miguel Angel Bregante y Susana Pérez, porque ellos han sido los verdaderos artífices de este trabajo. Ellos confiaron en mi y me brindaron la oportunidad de adentrarme en el campo de la investigación y de la farmacología, sabedores del esfuerzo que para un clínico como yo, eso supone. Indudablemente la base de mi conocimiento científico ha surgido al 99% de su generosidad, paciencia y buen hacer. Gracias, muy especialmente al Doctor Miguel Angel por dedicarme su tiempo y por ser un ejemplo de constancia. Perdón por esos correos que no recibieron su respuesta a tiempo.

Gracias también al Profesor Luis Pablo por motivar siempre la compatibilidad entre la asistencia y la investigación, por su mente siempre abierta y por su admirable capacidad de organización.

Gracias a los compañeros del Servicio de Oftalmología por todos los consejos brindados desde la voz de la experiencia y por sus palabras de ánimo.

Zuiero dar las gracias a mi familia, a mis padres María Ángeles y José Santiago, y a mis hermanos María, Raquel y José Ángel, porque ellos han sido mi bastón y mi fuente de energía en los momentos de flaqueza. Porque su cariño y apoyo ha sido tan grande que ha podido superar la distancia que nos separa. Ellos son los que me han ayudado a crecer como persona y los que me han enseñado que con ilusión y esfuerzo todo se consigue.

Gracias también a César, por todo lo que ha tenido que sacrificar, que sé que no ha sido fácil. Gracias por entender mi trabajo y las exigencias que conlleva.

Gracias a todos de corazón, y espero que las horas de trabajo hayan merecido la pena.

A β : amiloide- β
ACPC: arterias ciliares posteriores cortas
ACR: arteria central de la retina
ACV: accidente cerebro-vascular
AGIS: de las siglas en inglés “Advanced Glaucoma Intervention Study”
ANR: anillo neuroretiniano
AMPA: de las siglas en inglés “ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico”
APP: precursor de proteína β -amiloide
ARVO: de las siglas en inglés “Association for Research in Vision and Ophthalmology”
BAK: cloruro de benzalconio
BB: beta bloqueante
BCC: bloqueantes de canales de calcio
BDNF: de las siglas en inglés “Brain-derived neurotrophic factor” o factor neurotrófico derivado del cerebro
BHA: barrera hemato-acuosa
BHR: barrera hemato-retiniana
BMC: biomicroscopia
BSS: solución salina balanceada
C: concentración de la sustancia
Ca²⁺: ión calcio
CE₅₀: Concentración eficaz-50
CFNR: capa de fibras nerviosas de la retina
CGRs: células ganglionares retinianas
CIGTS: de las siglas en inglés “Collaborative Inicial Glaucoma Treatment Study”
CIT: contacto irido-trabecular
CNE: capa nuclear externa
CNI: capa nuclear interna
CNTF: de las siglas en inglés “Ciliar neurotrophic factor” o factor neurotrófico ciliar
CNTGS: de las siglas en inglés “Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study”
COX-2: ciclooxigenasa-2
CsA: ciclosporina A
CSFN: capa superficial de fibras nerviosas
D: dosis administrada
DE: desviación estándar
DMAE: degeneración macular asociada a la edad
EMGT: de las siglas en inglés “Early Manifest Glaucoma Trial”
ENV: endovenosa
EPNP: esclerectomía profunda no perforante
EPO: eritropoyetina
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EPOR: receptor de eritropoyetina
EPR: epitelio pigmentario de la retina

ERG: electroretinograma
FDA: de las siglas en inglés “Food and Drug Administration”
FDEP: factor derivado del epitelio pigmentario
FGF- b: factor de crecimiento fibroblástico tipo-b
FMOC-Cl: 9-fluoroenilmetil cloroformiato
FSO: flujo sanguíneo ocular
GAA: glaucoma de ángulo abierto
GAc: glaucoma de ángulo cerrado
GCP: glaucoma congénito primario
GCV: ganciclovir
GDNF: de las siglas en inglés “Glial cell line-derived neurotrophic factor” o factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales
GFAP: de las siglas en inglés “Glial fibrillary acidic protein” o proteína gliofibrilar ácida
GLAST: de las siglas em inglés “glutamate / aspartate transporter”
GNT: glaucoma normotensivo
HA: humor acuoso
HE: hematoxilina-eosina
HPLC: de las siglas en inglés “High-performance liquid chromatography” o cromatografía líquida de alta resolución o de altas presiones
HSP: de las siglas en inglés “Heat shock protein” o proteínas de choque térmico
HTO: hipertensión ocular
HV: humor vítreo
IAC: inhibidores de anhidrasa carbónica
IL- β : interleukina- β
INT: intravítrea
K_i: constante de inhibición
LADME: sistema farmacocinético de liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación
LC: lámina cribosa
LCR: líquido cefalorraquídeo
LD: límite de detección
LQ: límite de cuantificación
MC: metilcelulosa
Mg²⁺: ión magnesio
MLI: membrana limitante interna
MMPs: metaloproteinasas
MRT: tiempo medio de residencia
Na²⁺: ión sodio
NF-B: factor nuclear-B
NGF: de las siglas en inglés “Nerve growth factor” o factor de crecimiento nervioso
NGL: núcleo geniculado lateral
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: nervio óptico
NOS: óxido nítrico sintetasa
NT: neurotrofinas
OHTS: de las siglas en inglés “Ocular Hypertension Treatment Study”

PBS: tampón fosfato
PCP: fenciclidina (contracción del nombre químico *fenilciclohexilpiperidina*)
PEV: potenciales evocados visuales
PGs: prostaglandinas
PIO: presión intraocular
pKa: logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
PK: parámetro cinético
Pl: plasma
PLGA: de las siglas en inglés “Poly-lactic-co-glycolic acid” o ácido poliláctico-co-glicólico
Pm: peso molecular
PMN: polimorfonucleares neutrófilos
PTFE: politetrafluoroetileno
PVP: polivinilpirrolidona
Q: cantidad de sustancia
RB: retrobulbar
RD: retinopatía diabética
RLO: radicales libres del oxígeno
RMN: resonancia magnética nuclear
RNAsi: de las siglas en inglés “Small interfering RNA” o ARN pequeño de interferencia o silenciamiento
RPL: porción prelaminar del nervio óptico
RRL: porción retrolaminar del nervio óptico
RR: riesgo relativo
SAEA: Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal
SC: subconjuntival
SEUG: Sociedad Europea del Glaucoma
SERV: Sociedad Española de Retina y Vítreo
SNC: sistema nervioso central
SS: solución salina
STP: subtenon posterior
TLA: trabeculoplastia láser
TNF-2 α : factor de necrosis tumoral-2 α
TS: temporal-superior
TSL: trabeculoplastia láser diodo selectivo
VAA: vectores virales de adenovirus
VCR: vena central de la retina
 λ_{ex} : longitud de onda de excitación
 λ_{em} : longitud de onda de emisión

I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- GLAUCOMA	3
1.1.- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	3
1.2.- EPIDEMIOLOGÍA	5
1.2.1.- Factores de Riesgo en el Glaucoma	7
1.3.- FISIOPATOLOGIA	11
1.3.1.- Anatomía y fisiología	11
1.3.2.- Teorías etiopatogénicas	17
1.3.2.1.- Teoría mecánica	17
1.3.2.2.- Teoría vascular	18
1.3.2.3.- Teoría autoinmune	19
1.3.3.- Degeneración y muerte de la célula ganglionar retiniana	21
1.4.- TRATAMIENTO ANTIGLAUCOMATOSO	24
1.4.1.- Tratamiento hipotensor	24
1.4.1.1.- Médico	25
1.4.1.2.- Quirúrgico	37
1.4.2.- Nuevas modalidades de tratamiento	40
1.4.2.1.- Terapias neuroprotectoras	41
1.4.2.2.- Terapias vasoprotectoras	55
1.4.2.3.- Terapia génica	56
2.- MEMANTINA	57
2.1.- CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	57
2.2.- COMPORTAMIENTO FARMACOCINÉTICO	59
2.3.- TOLERANCIA Y SEGURIDAD DE MEMANTINA	60
2.3.1.- Estudios de toxicidad en animales de experimentación	60
2.3.2.- Estudios de toxicidad en humanos	62
2.4.- MECANISMO DE ACCIÓN	64
2.4.1.- Propiedades farmacodinámicas	67
2.5.- MEMANTINA Y NEUROPROTECCIÓN	68
2.5.1.- Usos clínicos	71
3.- FARMACOCINÉTICA	74
3.1.- FARMACOCINÉTICA GENERAL. ANÁLISIS COMPARTIMENTAL	74
3.2.- FARMACOCINÉTICA OCULAR	84
3.2.1.- Anatomía del globo ocular	84
3.2.2.- Vías de administración en oftalmología	90
3.3.- NUEVAS FORMULACIONES OFTÁLMICAS	99
3.4.- MODELIZACIÓN CINÉTICA OCULAR	111
II.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	115
1.- JUSTIFICACIÓN	117
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	119

III.- MATERIAL Y MÉTODOS	123
1.- MATERIAL	125
1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	125
1.2.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES	126
1.3.- MATERIAL DE LABORATORIO	127
2.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	130
2.1.- ESTUDIO FARMACOCINETICO	130
2.1.1.- Administración periocular-subtenon posterior	130
2.1.2.- Administración intravítrea	132
2.1.3.- Administración endovenosa	132
2.1.3.1.- Dosis única	132
2.1.3.2.- Infusión endovenosa	133
2.1.4.- Obtención de muestras	134
2.1.5.- Metodología analítica	135
2.1.6.- Ajuste de datos y tratamiento cinético	140
2.1.7.- Biodisponibilidad	141
2.1.8.- Características cinéticas globales de la administración periocular subtenon	142
2.1.8.1.- Absorción subtenon	142
2.1.8.2.- Pérdida de sustancia del lugar de la administración	143
2.1.8.3.- Modelo cinético ocular	143
2.2.- ESTUDIO DE TOLERANCIA OCULAR DE MEMANTINA	143
2.2.1.- Administración del fármaco	144
2.2.2.- Evaluación clínica	145
2.2.3.- Examen histológico	146
2.3.- NUEVA FORMULACIÓN OFTÁLMICA	147
2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	147
IV.- RESULTADOS	151
1.- METODOLOGÍA ANALÍTICA	153
2.- FARMACOCINÉTICA PERIOCLAR	155
2.1.- CINÉTICA VÍTREA	155
2.1.1.- Ojos Administrados	155
2.1.2.- Ojos contralaterales	161
2.2.- CINÉTICA PLASMÁTICA	167
3.- FARMACOCINÉTICA INTRAVÍTREA	172
3.1.- CINÉTICA VÍTREA	172
3.2.- CINÉTICA PLASMÁTICA	178
4.- FARMACOCINÉTICA ENDOVENOSA: DOSIS ÚNICA	183
4.1.- CINÉTICA VÍTREA	183
4.2.- CINÉTICA PLASMÁTICA	187
5.- BIODISPONIBILIDAD VÍTREA	189
5.1.- ADMINISTRACIÓN PERIOCLAR	189
5.1.1.- Biodisponibilidad vítrea absoluta	189
5.1.2.- Biodisponibilidad vítrea relativa	190
5.1.2.a.- Frente a la administración intravítrea	190
5.1.2.b.- Frente a la administración endovenosa en dosis única	191
5.2.- ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA ENDOVENOSA	192
5.2.1.- Biodisponibilidad vítrea relativa	192

5.2.1.a.- Frente a la administración intravítrea	192
5.2.1.b.- Respecto a plasma	192
5.2.2.- Infusión endovenosa. Equilibrio estacionario	193
6.- CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS GLOBALES DE LA ADMINISTRACIÓN PERIOcular	195
6.1.- ABSORCIÓN LOCAL	195
6.2.- PÉRDIDA DE SUSTANCIA DEL LUGAR DE LA ADMINISTRACIÓN	196
6.3.- MODELO CINÉTICO VÍTREO TRAS LA ADMINISTRACIÓN PERIOcular	197
7.- TOXICIDAD OCULAR DE MEMANTINA	203
7.1.- ANÁLISIS CLÍNICO	203
7.2.- ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	205
8.- NUEVA FORMULACIÓN OFTÁLMICA	212
V.- DISCUSIÓN	213
<hr/>	
VI.- CONCLUSIONES	257
<hr/>	
VII.- RESUMEN	263
<hr/>	
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	269
<hr/>	
IX.- ANEXOS	289
<hr/>	

I

INTRODUCCION

1.- GLAUCOMA

1.1.- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Frente a la primera definición de *glaucoma* acuñada por Goldman en el año 1957: “Bajo el término glaucoma, se incluyen las enfermedades que son consecuencia de un aumento en la presión intraocular y en las cuales lo esencial es este aumento de presión intraocular”, hoy sabemos que el glaucoma engloba a un grupo heterogéneo de afecciones oculares las cursan con una pérdida progresiva de los axones y somas de las células ganglionares retinianas (CGRs), y con la aparición de defectos típicos e irreversibles a nivel de la cabeza del nervio óptico y del campo visual (Quigley, 1981); considerando el aumento de la presión intraocular (PIO) como un factor de riesgo de la enfermedad. Por otra parte, la *hipertensión ocular* (HTO) es un trastorno en el cual, la presión intraocular se encuentra elevada pero en el que no existen daños glaucomatosos a nivel de la papila óptica ni defectos detectables en el campo visual (Tuulonen, 2003).

No existe una definición única que permita englobar todas las formas de glaucoma posibles. La fisiopatología, presentación clínica y tratamiento de los diferentes tipos de glaucoma es muy variada, pero de forma práctica se pueden establecer 3 categorías:

El *glaucoma de ángulo abierto* (GAA) es la forma más común de glaucoma. Se trata de una neuropatía óptica crónica, progresiva, de origen multifactorial, en la

que ocurren cambios morfológicos característicos en la papila óptica y la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), en ausencia de otra enfermedad ocular o anomalía congénita. En este grupo, la PIO elevada será un factor de riesgo importante y encontraremos un ángulo camerular abierto (Tuulonen, 2003).

El *glaucoma de tensión normal* (GNT) es un subtipo de GAA con entidad clínica propia, caracterizado por un daño en la papila óptica y defectos en el campo visual similares a los que aparecen en el GAA pero con cifras de PIO normales, pudiendo mostrar una evolución clínica diferente respecto al GAA, en cuanto a modelos de daño de la cabeza del nervio óptico y en cuanto a cantidad y calidad de la pérdida del campo visual (Caprioli, 1998).

El *glaucoma por cierre angular o glaucoma de ángulo cerrado* (GAC) es una forma de glaucoma en la que existe una cámara anterior estrecha con un ángulo camerular potencialmente ocluíble, en el que por distintos mecanismos, se establece un contacto irido-trabecular (CIT) que bloquea el drenaje del humor acuoso (HA), produciendo la elevación de la presión intraocular (incluso por encima de los 50 mmHg) y daño sobre el nervio óptico. En estos casos, la elevación de la PIO puede ser sintomática (dolor ocular, enrojecimiento, visión borrosa) y puede originar cambios estructurales oculares (pérdida de células endoteliales corneales con edema estromal, daño isquémico en la musculatura iridiana con midriasis arrefléxica o necrosis focal del epitelio cristalino dando lugar al llamado “glaukomflecken”) (Tuulonen, 2003).

El *glaucoma congénito primario* (GCP): Es una entidad poco frecuente, que afecta aproximadamente a 1:10000 neonatos. Responde a una disminución en el flujo de salida del HA secundaria a la presencia de una trabeculodisgenesia. La mayoría de los casos de GCP son esporádicos y un 10% son hereditarios, respondiendo a un

patrón autosómico recesivo con penetrancia incompleta. La afectación es bilateral hasta en un 70% de los casos, aunque de forma asimétrica, debutando clínicamente en un margen de edad entre el nacimiento y los diez años de vida. En el diagnóstico del GCP debe considerarse la determinación de la PIO, la medición de los diámetros corneales (vertical y horizontal), la gonioscopia para la identificación de trabeculodisgenesias, y el examen de la papila óptica. La afectación visual en el GCP suele ser severa y su tratamiento es quirúrgico.

La Sociedad Europea del Glaucoma (SEUG) reconoce la existencia de múltiples clasificaciones del glaucoma y la arbitrariedad de las mismas. En general, todas las formas de glaucoma deberían poder ser clasificadas en formas *primarias* o *secundarias* en base a las características del ángulo camerular valorado mediante gonioscopia, el examen biomicroscópico con lámpara de hendidura, la morfología de la papila del nervio óptico y los defectos en el campo visual (Tuulonen, 2003).

1.2.- EPIDEMIOLOGÍA

El glaucoma constituye la segunda causa de ceguera legal irreversible en el mundo, por detrás de la retinopatía diabética y la segunda causa de ceguera evitable en los países desarrollados por detrás de la catarata (Quigley, 2006). Es una enfermedad que afecta a más de 67 millones de personas en todo el mundo (Rouland, 2005) y se prevé que en el año 2020, cerca de 79 millones de personas padecerán alguna de las formas de esta enfermedad (Quigley, 2006).

La prevalencia estimada de glaucoma en sujetos de raza blanca entre los 45-60 años es del 1-2%, incrementándose hasta el 6% en los mayores de 70 años. Su

prevalencia se incrementa exponencialmente con la edad en todos los grupos raciales (fig. 1), siendo este incremento más acusado en sujetos africanos de raza negra. El GAA es la forma más frecuente de glaucoma en las poblaciones caucásicas y africanas, mientras que el GAC es más común en las poblaciones asiáticas (Quigley, 2006). En España, la prevalencia del glaucoma se ha situado en torno al 2.1%, y representa junto a la retinopatía diabética (RD), la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y los traumatismos oculares, una de las principales causas de ceguera permanente en nuestro país (Anton, 2004). Con todo, casi el 10% de las consultas oftalmológicas en nuestro medio se relacionan con esta enfermedad.

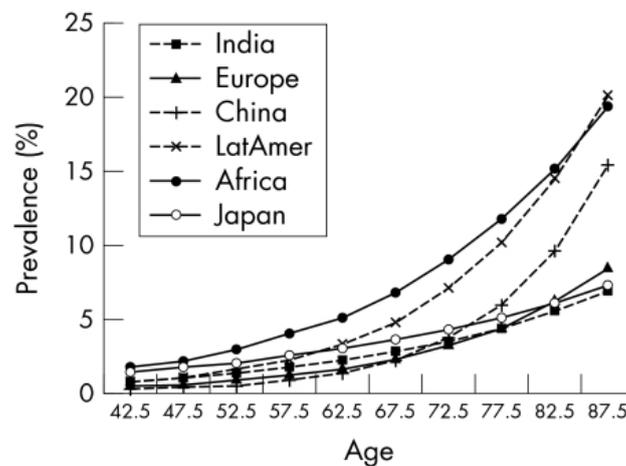


Figura 1: Prevalencia del GAA por grupos de edad en los 6 principales grupos raciales. (Reproducido de: Quigley HA. et al. *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. Br J Ophthalmol.* 2006; 90(3):262-267).

La enfermedad glaucomatosa constituye una preocupación cada vez mayor para la Salud Pública, ya que el incremento de la esperanza de vida poblacional en los países desarrollados, ha hecho que se incremente notablemente la prevalencia de esta enfermedad, y con ello la necesidad de introducir nuevas terapias capaces de prevenir

el glaucoma y controlar la gravedad y progresión de la enfermedad (Wierzbowska, 2010). Estudios de gasto sanitario-específico de la enfermedad han mostrado como el mayor consumo de recursos en el glaucoma deriva de los costes médicos directos (45%), habiéndose producido un dramático incremento en el número de pacientes glaucomatosos que reciben tratamiento médico, si bien ha disminuido el número de procedimientos quirúrgicos como tratamientos de primera línea (Rouland, 2005).

1.2.1.- Factores de Riesgo en el Glaucoma

Tradicionalmente se ha considerado la *presión intraocular elevada* ($PIO \geq 21$ mmHg) como el principal factor de riesgo para el desarrollo de glaucoma, y el único sobre el que podemos actuar, al menos de momento, para detener la progresión de la enfermedad. Sin embargo, puede desarrollarse glaucoma con cifras de presión intraocular dentro de los límites normales, y no todos los pacientes con hipertensión ocular tienen glaucoma (Weinreb, 2004). Por ello, cada vez se da mayor importancia a otros factores en la génesis del glaucoma, especialmente en aquellos pacientes que muestran progresión del defecto campimétrico con cifras de PIO normales, es decir, en los llamados glaucomas normotensivos (GNT) (Leske, 2008).

El factor vascular parece estar altamente implicado en la patogenia del glaucoma. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que existe relación entre una *presión arterial diastólica baja* y una *presión de perfusión ocular baja*, y la incidencia y progresión del glaucoma (considerando convencionalmente la presión de perfusión ocular como la diferencia entre la presión sanguínea arterial sistémica y la

presión intraocular) (Bonomi, 2000). Aunque en la práctica clínica no está claro el valor de la medición del flujo sanguíneo ocular en el manejo del glaucoma, los factores de riesgo vascular deberían tenerse en cuenta, especialmente en aquellos pacientes que muestran progresión del daño glaucomatoso incluso con cifras de PIO bajas (Caprioli, 2010). En este sentido, se ha debatido mucho sobre la relación entre la diabetes y la enfermedad glaucomatosa, y se considera que existe al menos dos veces más riesgo de desarrollar glaucoma en pacientes diabéticos, probablemente condicionado por factores de tipo vascular y flujo sanguíneo ocular (Pache, 2006).

El estudio OHTS muestra cómo la *edad* es un factor riesgo en la conversión de pacientes hipertensos oculares a glaucomas y, cómo las tasas de progresión de la enfermedad son mayores en los sujetos de mayor edad (Gordon, 2002).

La mayoría de los estudios epidemiológicos coinciden en que la prevalencia de GAA es mayor en los sujetos de *raza negra*, al presentar una serie de características oculares que condicionan en ellos una mayor susceptibilidad al daño glaucomatoso, existiendo casi cuatro veces más riesgo de padecer GAA en sujetos de raza afro-caribeña que en sujetos caucásicos (Leske, 2008).

Tradicionalmente se han considerado los *antecedentes familiares de glaucoma*, en familiares de primer grado, como un factor de riesgo para el desarrollo de GAA, con un riesgo tres veces mayor de desarrollar glaucoma en familiares de sujetos afectados que en la población general (Leske, 2008).

Parece que la *miopía* incrementa el riesgo de padecer glaucoma y además, este aumento está en relación con la cuantía del defecto refractivo, siendo casi dos veces mayor el riesgo de padecer GAA en pacientes miopes respecto a aquellos sin miopía.

Probablemente el mayor tamaño de la excavación de la papila óptica en los pacientes miopes podría justificar una mayor susceptibilidad al daño glaucomatoso (Mitchell, 1999).

Una *córnea central delgada* -menor de 555micras- ha demostrado ser un factor de riesgo independiente en la aparición de GAA, aunque hay quienes lo consideran un factor de confusión a la hora de medir la PIO mediante tonometría de aplanación. En cualquier caso, estudios multicéntricos, como el OHTS y el EGS, confieren al valor de la paquimetría el mayor peso a la hora de determinar el riesgo de progresión de hipertenso ocular a glaucoma, independientemente de su efecto artefactuador sobre la medida de la PIO, considerando una mayor vulnerabilidad del nervio óptico a la lesión glaucomatosa en aquellos pacientes con córneas delgadas, relacionando esta condición con una mayor distensibilidad de la lámina cribosa (Gordon, 2002).

La presencia de *material pseudoexfoliativo* se ha relacionado tanto con un mayor riesgo de desarrollar glaucoma como de progresión de la enfermedad. Se estima que el riesgo de progresión HTO-glaucoma se multiplica por dos en los pacientes con pseudoexfoliación, considerándose esta condición como un factor de riesgo en sí mismo, independiente de las mayores cifras de PIO que suelen presentar estos pacientes (Grodum, 2005).

Las *fluctuaciones circadianas de la PIO* no han resultado ser un factor de riesgo de progresión en los glaucomas incipientes según los resultados del estudio EMGT, pero sí en los glaucomas avanzados, estableciéndose una relación directa entre el rango de fluctuación de la PIO y el riesgo de progresión de la enfermedad (Bengtsson, 2007).

Aunque todavía hay muchos interrogantes, los estudios sugieren la existencia de un factor de riesgo *genético*. Se han identificado numerosos genes (1q23, 2cen-q13,

3q21-q24, 8q23, 10p15-p14, 7q35-q36) asociados a diferentes tipos de glaucoma, aunque no todos ellos han sido confirmados, lo que corrobora la gran heterogeneidad genética de esta enfermedad. Dos de ellos, el TIGR/ MYOC (1q23) y el OPTN (10p15-p14) han sido identificados en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA), y un tercero, el WDR36 (5q22) cuyas mutaciones se han asociado tanto con el GPAA como con el GNT (Fuse, 2010). El primer gen que se identificó en el glaucoma fue el gen MYOC, también llamado TIGR (de las siglas en inglés “trabecular meshwork inducible glucocorticoid response”), que codifica para una proteína, la miociclina, producida por las células trabeculares en respuesta al “stretch” mecánico inducido por las cifras de PIO elevadas y a los glucocorticoides, y que es segregada como constituyente de la matriz extracelular. Se han identificado más de 43 mutaciones en dicho gen asociadas con el glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y el glaucoma juvenil (Fingert, 2002). El segundo gen, el OPTN (de las siglas en inglés “optic neuropathy-inducing protein”), codifica para una proteína, la optineurina, expresada por las células trabeculares, células del epitelio no pigmentado de los procesos ciliares y células retinianas. Defectos en la expresión de esta proteína se han asociado con la aparición de GPAA (Rezaie, 2002).

El polimorfismo en un cuarto gen, el LOXL1, se ha relacionado con un incremento en el riesgo de padecer glaucoma pseudoexfoliativo (un tipo de glaucoma secundario de ángulo abierto). Aunque se desconoce todavía la función específica de este gen, se cree que codifica para una proteína implicada en catalizar la formación de fibras de elastina (Thorleifsson, 2007).

A pesar de todo ello, menos del 10% de los casos de glaucoma tienen una base genética, por lo que es necesario investigar si existen otros genes implicados no

identificados hasta el momento. Por otra parte, se investiga la existencia de un posible determinante genético de la presión intraocular (PIO) que permita identificar a los sujetos de riesgo, posibilitando el diagnóstico precoz de la enfermedad y mejorando los resultados terapéuticos, a través de un tratamiento personalizado basado en la geonómica de cada paciente (Fuse, 2010).

1.3.- FISIOPATOLOGIA

1.3.1.- Anatomía y fisiología

El *nervio óptico* (NO) está formado por millones de fibras nerviosas correspondientes a los axones de las células ganglionares retinianas que discurren conformando la capa más profunda de la retina, la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR). Las fibras nerviosas retinianas abandonan el ojo a través del orificio escleral posterior o *canal escleral*. A nivel de este orificio, se encuentra la *lámina cribosa* (LC) constituida por una serie de láminas de tejido conectivo que se disponen formando una estructura fenestrada con múltiples poros a través de los cuales discurren los haces de fibras nerviosas. Las aberturas de estos poros, en la superficie de la lámina cribosa, se identifican en la oftalmoscopia como puntos grisáceos profundos dentro de la excavación de la papila óptica. El tamaño de estos poros varía entre diez y cien micras y su distribución en el área de la LC es desigual, de manera que en las regiones nasal y temporal del NO son más pequeños y hay más densidad de poros, lo que permite que éstos sean más resistentes. Por el contrario, en las regiones superior e inferior del NO hay menos poros, siendo éstos además de mayor diámetro, lo que condiciona una menor resistencia mecánica (Ramírez, 2008). Se ha visto que existe un aumento en el

número de poros visibles de la lámina cribosa, en aquellos ojos que exhiben progresión en la pérdida del anillo neuroretiniano por el glaucoma (Tezel, 2004). Desde hace años se ha estudiado el papel de la lámina cribosa en la fisiopatología del glaucoma, entendiendo el nervio óptico como una estructura biomecánica. Se ha postulado que la distensibilidad de la LC juega un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad.

En el centro de la papila del nervio óptico se identifica una depresión pálida tridimensional, libre de tejido neural, que se conoce como *excavación óptica*. El color pálido de la excavación se debe a la exposición de la lámina cribosa y a la pérdida de tejido glial a este nivel.

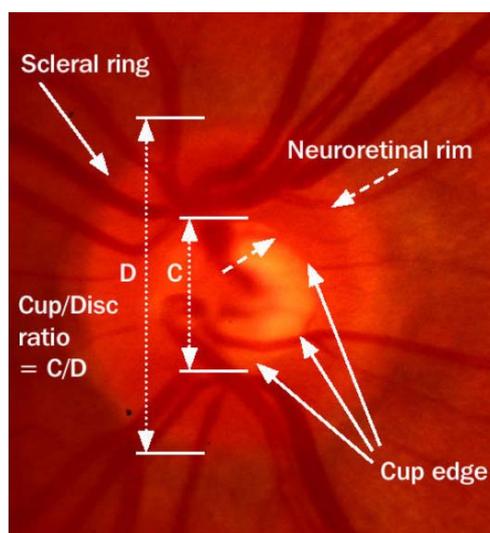


Figura 2: Estereofotografía de la papilla óptica en un ojo sano. C/D: cociente entre el tamaño de la excavación y el tamaño del disco óptico. (Reproducida de: Bourne RR. *The optic nerve head in glaucoma. Community Eye Health. 2006; 19(59): 44–45*).

El tamaño de la excavación guarda relación con el diámetro del disco óptico (fig.2), de manera que un disco pequeño tendrá una excavación fisiológica pequeña, pues las fibras nerviosas retinianas tendrán que cruzarse más a su salida del globo

ocular, mientras que un disco grande tendrá una mayor excavación fisiológica, ya que las fibras nerviosas estarán menos cruzadas y se distribuirán de manera más homogénea por toda la circunferencia papilar (Jonas, 1988). El *anillo neuroretiniano* (ANR) es la parte del disco óptico comprendida entre el borde externo de la excavación y los márgenes de la papila, y corresponde a la porción preliminar de las fibras nerviosas retinianas que cambian de angulación para introducirse por el canal escleral. El ANR tiene una coloración anaranjada o rosada, y posee una configuración característica, de manera que el borde inferior es el más ancho, seguido por el superior, el nasal y el temporal (regla ISNT) (Jonas, 1988; Bourne, 2006).

El glaucoma se caracteriza por un adelgazamiento progresivo del ANR con aumento del tamaño de la excavación óptica. El patrón morfológico de la pérdida del anillo es variable, pudiendo presentarse como una pérdida difusa, localizada (muesca o sacabocados) o mixta, siendo más frecuente que acontezca a nivel de los polos superior e inferior, y de forma más precoz a nivel de este último (Bartz, 1999; Larrosa, 2001).

Para poder interpretar los defectos en el campo visual en relación con el aumento de la excavación del nervio óptico, es fundamental conocer la disposición de los casi 1.2 millones de axones de células ganglionares, a nivel de la retina y a su paso a través del canal escleral. Dentro de la retina, las fibras procedentes de la mácula siguen un trayecto recto hasta la papila óptica, conformando un área en forma de huso denominado haz papilo-macular. Las fibras procedentes de la retina nasal siguen también un trayecto relativamente recto hasta el nervio óptico, y las fibras procedentes de la retina temporal siguen un trayecto arqueado alrededor del haz papilo-macular para alcanzar la cabeza del nervio óptico, sin cruzar el rafe horizontal que se extiende desde la fovea hasta la perifería retiniana temporal formando el límite virtual entre las

hemirretinas superior e inferior (fig. 3). A nivel del disco óptico, las fibras nerviosas retinianas se encuentran dispuestas de manera que, las fibras procedentes de las zonas más periféricas de la retina ocuparán la porción más periférica (externa) del NO, mientras que las fibras procedentes del polo posterior y las proximidades de la papila, ocuparán la porción más central del nervio (Bartz, 1999). Las fibras retinianas procedentes de las regiones superotemporal e inferotemporal de la retina, que describen una trayectoria arqueada hacia la papila, serán por tanto, más vulnerables a la lesión glaucomatosa.

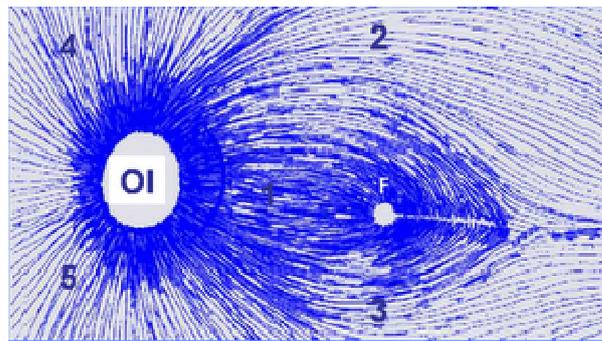


Figura 3: Esquema de la distribución retinotópica de la capa de fibras nerviosas de la retina, en un ojo izquierdo.

1. haz papilo-macular; 2. haz de fibras temporales arcuatas superior; 3. haz de fibras temporales arcuatas inferior; 4. haz de fibras radiales nasales superior; 5. haz de fibras radiales nasales inferior.

En la porción anterior del nervio óptico o cabeza del nervio óptico pueden distinguirse cuatro regiones: la capa superficial de fibras nerviosas (CSFN), la región preliminar (RPL), la porción laminar y la retrolaminar (RRL); cada una de las cuales recibe un aporte sanguíneo diferente (Mackenzie, 2008). El principal aporte de sangre a la cabeza del nervio óptico, en sus porciones preliminar, laminar y retrolaminar, llega a través de las arterias ciliares posteriores cortas (ACPC), bien por ramas directas o a

partir de ramas derivadas del círculo de Zinn-Haller; mientras que la arteria central de la retina (ACR) es la que contribuye a la irrigación de la retina y de la capa superficial de fibras nerviosas del nervio óptico (fig. 4). Debemos considerar que el sistema ciliar funciona con una presión de perfusión menor que el sistema de la ACR, lo que condiciona una mayor vulnerabilidad de aquellas estructuras que como la lámina cribosa, solamente son irrigadas por el sistema ciliar (Ramírez, 2008). El drenaje venoso de la cabeza del NO ocurre exclusivamente a través de la vena central de la retina (VCR).

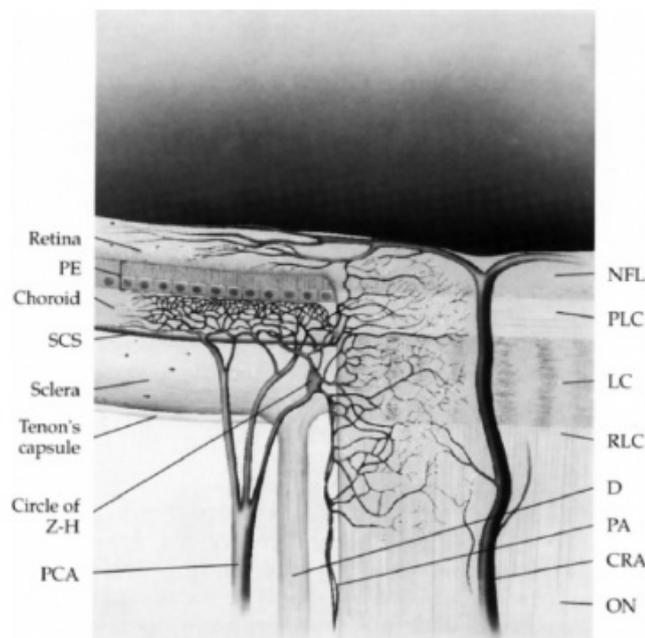


Figura 4: Esquema de la vascularización de la cabeza del nervio óptico. (Reproducido de: Mackenzie PJ. et al. *Vascular anatomy of the optic nerve head*. *Can J Ophthalmol*. 2008; 43(3): 308-312).

El humor acuoso (HA) es producido a nivel del cuerpo ciliar, por el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares, a partir de un ultrafiltrado de plasma. Desde allí, se vierte a la cámara posterior del ojo, situada entre el iris y el cristalino, pasando

después a la cámara anterior a través de la pupila. Una vez en la cámara anterior del ojo, el HA es drenado por dos vías: la vía trabecular o la vía uveo-escleral (fig. 5).

La *vía trabecular* es la vía convencional de evacuación, responsable del drenaje de aproximadamente el 80% del HA. En ella el humor acuoso fluye a través de la malla trabecular, situada a nivel del ángulo irido-corneal, hacia el canal de Schlemm. Una vez en la luz del canal, el HA es evacuado por los vasos colectores, alcanzando a través de las venas del acuoso, el sistema venoso espiescleral.

La *vía uveo-escleral* es la vía no convencional, responsable del drenaje del 10% del HA restante. El humor acuoso es reabsorbido por el cuerpo ciliar pasando directamente al espacio supracoroideo, desde donde es drenado por la circulación venosa del cuerpo ciliar-coroides-esclerótica.

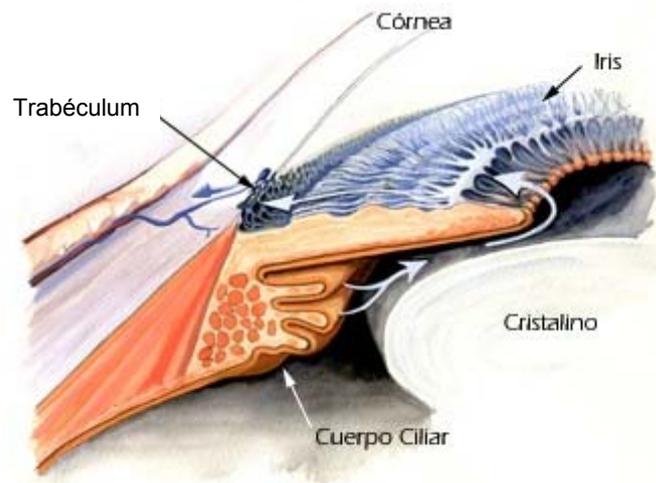


Figura 5: Esquema-ilustración circulación del humor acuoso: producción a nivel de los procesos ciliares, paso desde la cámara posterior a la cámara anterior del ojo a través de la pupila, y drenaje a través de la malla trabecular, situada en el ángulo camerular. (Reproducido de: *Kanski J. Oftalmología clínica. 5ª edición. Ed. Elsevier-España. 2006*).

El desequilibrio entre la producción y la eliminación del humor acuoso es la causa principal de aumento de la PIO. En este sentido, las terapias hipotesoras buscan la reducción de la PIO, bien aumentando el flujo de salida uveo-escleral del HA (prostaglandinas y mióticos) o bien disminuyendo su producción (beta-bloqueantes, alfa-2-agonistas e inhibidores de anhidrasa carbónica).

1.3.2.- Teorías etiopatogénicas

La controversia sobre la fisiopatología del glaucoma ha comprendido básicamente dos teorías etiopatogénicas, la mecánica y la vascular, sin embargo, en los últimos años se habla de un tercer mecanismo, de tipo inmune, implicado en la génesis del glaucoma.

1.3.2.1.- Teoría mecánica

Aunque el mecanismo exacto del daño glaucomatoso sobre la capa de células ganglionares es desconocido, se ha considerado tradicionalmente el aumento de la presión intraocular (PIO) como la causa esencial del glaucoma. Así, este aumento de la PIO, actuando sobre el tejido conectivo de la lámina cribosa (LC), originaría la compresión de los axones de las CGRs, interrumpiendo el flujo axonal retrógrado, y bloqueando la llegada de factores neurotróficos endógenos al soma de la célula ganglionar retiniana (Weinreb, 2004). Existen evidencias, tanto por estudios retrospectivos (Mao, 1991) como prospectivos (CNTGS, 1998; AGIS, 2000; Kass, 2002; Leske, 2003), de los beneficios del descenso de la PIO sobre el entrecimiento de la progresión en la pérdida de función visual, en los pacientes con glaucoma.

1.3.2.2.- Teoría vascular

Según la teoría vascular, existiría un compromiso en el flujo sanguíneo capilar a nivel de la cabeza del nervio óptico, que originaría la isquemia y alteración funcional de las células ganglionares retinianas. Se ha visto como los descensos nocturnos no fisiológicos de la presión arterial y las amplias fluctuaciones circadianas de la presión de perfusión ocular se relacionan con el desarrollo y la progresión de la enfermedad glaucomatosa (Werne, 2008). Hay datos que sugieren la existencia de una alteración en los mecanismos de autorregulación vascular en el glaucoma, entre los cuales se ha encontrado una reducción en el flujo sanguíneo, tanto coroideo como a nivel de la cabeza del nervio óptico, sus fluctuaciones son mayores, en sujetos con glaucoma y que en ojos con PIO elevada, cuanto mayor es el índice de resistividad en la arteria oftálmica y en las arterias ciliares posteriores cortas, mayor es el riesgo de deterioro del campo visual (Martínez, 2005). Numerosos estudios han permitido evidenciar defectos de perfusión no sólo a nivel de la cabeza del nervio óptico sino también a nivel cerebral y retrobulbar, en los pacientes con glaucoma.

Se dispone de distintos instrumentos para el estudio del flujo sanguíneo ocular (FSO), los cuales proporcionan información útil tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de la enfermedad (Martínez, 2005). Sin embargo, el estudio del FSO presenta claras limitaciones, ya que no se dispone de un método único que permita evaluar los distintos lechos vasculares en una sola medición (cada instrumento permite determinar el FSO en un área concreta del globo ocular: retina, coroides, vasos retrobulbares, cabeza del NO), y los resultados obtenidos con cada una de las técnicas son difícilmente comparables (Caprioli, 2010). No obstante, los estudios del flujo sanguíneo ocular ayudarán a mejorar el enfoque terapéutico de los pacientes con glaucoma.

1.3.2.3.- Teoría autoinmune

Desde que Tezel y Wax en 1998 documentara la presencia de títulos elevados de anticuerpos frente a las proteínas de choque térmico (HSP) en pacientes con GNT, la concepción del glaucoma como una enfermedad autoinmune órgano-específica, está cada vez más extendida. El ojo y el cerebro se conocen como “órganos inmunoprivilegiados” en base a su capacidad para controlar sus reacciones inflamatorias en respuesta a las agresiones externas. A nivel del globo ocular, el humor acuoso y la cámara anterior, son las estructuras capaces de controlar dicha inmunogenicidad.

Se ha podido demostrar la existencia de un incremento en la reactividad de anticuerpos frente a la alfa-fodrina (la principal proteína constituyente del citoesqueleto neuronal), en pacientes con GNT de poblaciones alemana y estadounidense, también demostrada en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Grus, 2006). Aunque no está claro el mecanismo exacto de autoinmunidad en la enfermedad glaucomatosa, y si ésta es causa o consecuencia, se han podido detectar distintos patrones de autoanticuerpos tipo IgG frente a antígenos del nervio óptico y/o retinianos, en el humor acuoso de pacientes con glaucoma (glaucoma pseudoexfoliativo y primario de ángulo abierto). En algunos casos se habla de una sobreactivación del sistema inmune mientras que en otros se defiende una hipofunción del mismo, como la responsable de la falta de protección y mayor vulnerabilidad frente al glaucoma (Grus, 2008). Esto último, concordaría con la teoría de Schwartz, en la que mediante vacunación con antígenos específicos, se estimularía la respuesta inmune, confiriendo protección frente al glaucoma (Schwartz, 2003).

Aunque son necesarios más estudios para comprender la relevancia de los autoanticuerpos en la patogenia del glaucoma, la posibilidad de demostrar una reactividad inmunológica específica frente a determinados antígenos oculares, en estos pacientes, sería de gran utilidad como test de screening, permitiendo un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Por uno u otro mecanismo, o lo que es más probable, por efecto combinado todos ellos, acontecerán una serie de cambios a nivel de la cabeza del nervio óptico, con pérdida del tejido nervioso axonal, activación del tejido glial y remodelación tisular, que llevarán en último término a la degeneración y muerte de la célula ganglionar retiniana (Wierzbowska, 2010):

- *Pérdida de tejido nervioso axonal*: Se ha considerado tradicionalmente, que el daño inicial en el glaucoma, acontece a nivel de los axones de las CGRs. Sin embargo, parece que desde fases iniciales de la enfermedad, se produce una afectación de la célula ganglionar retiniana a distintos niveles, y que la degeneración final del soma celular estaría precedida no sólo por el daño axonal sino también por la pérdida de sus conexiones dendríticas con otras neuronas retinianas y de los centros superiores de la visión (Yücel, 2008).

- *Activación secundaria del tejido glial*: La activación del tejido glial - microglía, astrocitos y células de Müller- en respuesta al estrés, mecánico o vascular, llevará a un desequilibrio en la expresión de genes y factores reguladores del ciclo celular, con sobreactivación de mediadores intracelulares como la óxido nítrico sintetasa-2 inducible (NOS-2), la ciclooxygenasa-2 (COX-2) o el factor de necrosis tumoral-2 α (TNF-2 α); así como a cambios en la morfología de las células,

favoreciendo la acumulación en el espacio extracelular de glutamato, H^+ y K^+ , que serán interiorizados en el citoplasma astrocitario, provocando la edematización de las células gliales. Dicho edema provocará la degeneración del tejido astrogial, quedando desprotegido el axón de la célula ganglionar y produciéndose la muerte de la misma. La irreversibilidad de la enfermedad glaucomatosa reside precisamente en la degeneración y muerte final de las células ganglionares retinianas.

- *Remodelación tisular:* En la neuropatía óptica glaucomatosa se produce una remodelación a nivel de la cabeza del NO, con aumento típico de la excavación, que parece responder no sólo la pérdida de fibras nerviosas, tejido glial y vasos sanguíneos, sino también, a la activación de procesos metabólicos y sistemas enzimáticos, como las metaloproteasas (MMPs), que condicionarán modificaciones en la composición de la matriz extracelular. Dichos cambios inducirán un incremento del colágeno tipo VI y una disminución de las fibras colágenas alrededor de las fibras elásticas, lo que determina una alteración importante de las propiedades biomecánicas de la lámina cribosa. Además, el colágeno tipo IV, constituyente de la membrana basal astrocitaria, también se verá incrementada en las regiones prelaminar y laminar de la cabeza del nervio óptico, modificándose la estructura original de los poros, lo que podría explicar porqué existe una menor capacidad para amortiguar los gradientes de presión en esta patología (Tezel, 2004).

1.3.3.- Degeneración y muerte de la célula ganglionar retiniana

La célula diana del daño glaucomatoso es la *célula ganglionar retiniana*, sobre la que actúan de forma directa (efecto mecánico de la presión intraocular) o indirecta (isquemia retiniana, bloqueo del transporte axonal retrógrado), distintos factores. El

papel de otros tipos celulares no neuronales, en la patogenia del glaucoma, es en parte incierto, si bien, en modelos de glaucoma experimental se ha podido constatar la activación de los astrocitos y de la microglía asociada a la degeneración de las CGRs (Naskar, 2002).

Aunque las manifestaciones clínicas del glaucoma son bien conocidas, no así los mecanismos exactos por los que se produce la muerte de la célula ganglionar retiniana. Se cree que la muerte de la CGR en respuesta al daño axonal y a los cambios en la matriz extracelular, inducidos por el incremento de la PIO, ocurre por un mecanismo de *apoptosis* (Guo, 2005). Aunque el mecanismo de apoptosis o muerte celular programada, puede ser activado por distintos estímulos, en el caso del glaucoma, la CGR entra en apoptosis en respuesta a dos fenómenos fundamentales: la deprivación de factores neurotróficos y la presencia de niveles excesivos de aminoácidos excitadores (como el glutamato) en el medio extracelular.

Uno de los conceptos más importantes para poder entender la secuencia de acontecimientos que llevan a la muerte de la célula ganglionar, es aceptar que su proceso de degeneración ocurre de forma *compartimentalizada*. Investigaciones recientes sugieren que el proceso de destrucción de la CGR sucede en las siguientes etapas (Nickells, 2007):

a.- Elevación de la presión intraocular y *activación del tejido glial a nivel la lámina cribosa del nervio óptico*: Las células gliales activadas, interrumpirán sus funciones de soporte y aporte nutricional a la célula ganglionar, liberando distintos mediadores como la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), la vimentina, el óxido nítrico y otros agentes vasoactivos; que actuarán sobre la microcirculación de la cabeza del nervio óptico, comprometiendo el aporte sanguíneo a este nivel (Hernández, 2008).

b.- *Daño axonal y degeneración selectiva del axón* de la CGR: La isquemia originada en la porción pre-laminar del nervio óptico, estimulará la entrada masiva de calcio (Ca^{2+}) dentro de la célula y la autodigestión del citoesqueleto y organelas axoplásmicas, existiendo una interrupción del flujo axonal y bloqueándose de esta manera, el transporte de neurotrofinas/factores neurotróficos hacia el soma de la célula ganglionar (Whitmore, 2005).

c.- Apoptosis de la célula ganglionar *-degeneración primaria-*: La privación de neurotrofinas desencadenará la disfunción mitocondrial a nivel del soma de la CGR, con la consiguiente sobreproducción de radicales libres del oxígeno (RLO), liberación de la citocromo-C-oxidasa, formación del apoptosoma y activación de una compleja cascada de enzimas -caspasas, nucleasas, proteasas y lipasas- que llevarán a la degradación de los componentes intracelulares y a la entrada de la célula en apoptosis (Osborne, 2008).

d.- Apoptosis de la célula ganglionar *-degeneración secundaria-*: Las CGRs que han sufrido apoptosis tras la lesión de sus axones, liberarán sus depósitos de glutamato al espacio extracelular, el cual actuará sobre las células ganglionares vecinas estimulando la degeneración de éstas (Martin, 2002).

e.- *Activación del tejido glial en respuesta al proceso de neurodegeneración*: Esta activación tardía del tejido glial en respuesta a la degeneración de las CGRs y sus axones, llevará a la migración de los astrocitos y células de Müller que fagocitarán los detritus celulares y sintetizarán nuevos componentes de la matriz extracelular, con la formación de una cicatriz de tejido fibroso que ocupará el espacio dejado por las células ganglionares degeneradas (Hernández, 2008). Además el tejido glial activado,

liberará mediadores potencialmente tóxicos, como el TNF-2 α , óxido nítrico y glutamato, que contribuirán a la propagación del daño neuronal (Osborne, 2008).

Un mejor conocimiento de la fisiopatología del glaucoma permitirá el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas, y el desarrollo de terapias cada vez más efectivas. En las últimas décadas, el concepto de enfermedad glaucomatosa se ha ampliado, considerado como tal, no sólo la afectación del nervio óptico –*neuropatía*-, sino también de otras estructuras y centros superiores de la visión –*enfermedad neurodegenerativa*-, como el núcleo geniculado lateral (NGL) y el cortex visual (Yücel, 2003; Gupta, 2007).

1.4.- TRATAMIENTO ANTIGLAUCOMATOSO

1.4.1.- Tratamiento hipotensor

Según los resultados del OHTS entre el 4-20% de las personas con HTO desarrollan defectos en el campo visual a los cinco años (Kass, 2002). La detección y tratamiento precoz del glaucoma es fundamental, ya que una vez que se ha establecido el defecto en el campo visual ninguna forma de tratamiento puede restaurarlo. Tradicionalmente, el tratamiento hipotensor se han considerado el “gold estándar” en el tratamiento del glaucoma, por ser la presión intraocular el único factor de riesgo potencialmente modulable y sobre el que es posible actuar con eficacia. El descenso de la PIO que se busca conseguir con el tratamiento es la denominada *presión diana*, que se define como la PIO media obtenida con

tratamiento, que evita la progresión del daño glaucomatoso (Kass, 2002). Según los resultados del estudio EMGT sobre efectividad de la reducción de la PIO con tratamiento frente a no tratamiento, en pacientes con GAA incipiente, por cada mmHg de reducción de la PIO respecto a la cifra basal, el riesgo de progresión de la enfermedad disminuye en un 10% (Leske, 2003).

1.4.1.1.- Médico

El tratamiento médico del glaucoma ha sufrido en los últimos años una importante revolución. Hasta finales de los 80 sólo se disponía de tres clases de fármacos para el tratamiento del glaucoma: los mióticos, los simpaticomiméticos no selectivos y los inhibidores de la anhidrasa carbónica (IAC) orales. Sin embargo, los efectos adversos tanto de los mióticos como de los simpaticomiméticos no selectivos, constituyeron una limitación importante para su uso clínico. Por su parte, los IAC sistémicos siguen ocupando un lugar importante en el tratamiento del glaucoma, aunque su utilización ha quedado relegada a casos especiales. En sólo unos años las posibilidades terapéuticas en el glaucoma se multiplicaron. La aparición de los betabloqueantes a finales de los años 70, supuso una auténtica revolución en el tratamiento del glaucoma, ya que a su potente efecto hipotensor se unía un perfil de seguridad local y sistémica muy superior al de los anteriores.

Los resultados de una revisión de la Cochrane del año 2007, sobre eficacia del tratamiento médico hipotensor en el glaucoma incipiente y en la HTO, demostraron que el tratamiento antiglaucomatoso tópico previene eficazmente la conversión de hipertenso ocular a glaucoma, y la aparición de defectos en el campo visual, aunque

sin especificar qué fármaco utilizar ni tampoco cuál de los fármacos disponibles ofrece un mayor efecto protector sobre el campo visual (Vass, 2007).

De entre los diferentes grupos de fármacos hipotensores oculares destacamos los siguientes:

1.4.1.1.a.- Análogos de prostaglandinas

Los análogos de prostaglandinas son el grupo farmacológico de más reciente aparición en el arsenal terapéutico del glaucoma. Su potencia hipotensora, su mecanismo de acción y la simplicidad de su posología (una vez al día), les ha permitido situarse en la primera línea en el tratamiento del glaucoma (Van der Valk, 2005). En nuestro país se encuentran comercializados 4 compuestos: *latanoprost*, *bimatoprost*, *travoprost* y *tafluprost*.

En los estudios llevados a cabo en humanos con los análogos de la $PGF_2\alpha$, se ha evidenciado un descenso de la PIO a expensas de aumentar el drenaje de HA por la vía uveo-escleral. Se utilizan en una aplicación única diaria, preferiblemente por la noche. Su efecto suele iniciarse a las 2-4 horas de la primera instilación, con un efecto máximo entre las 8-12 horas postadministración. El tratamiento con análogos de prostaglandinas se ha visto relacionado con efectos adversos a nivel ocular como hiperemia conjuntival, picor y escozor ocular, aumento de la pigmentación de la piel periocular y crecimiento de las pestañas, aumento de la pigmentación iridiana, edema macular quístico en pacientes afáquicos y pseudofáquicos, reactivación de queratitis herpética, incluso casos de uveítis anterior. Por su parte, los análogos de prostaglandinas parecen tener muy pocos efectos adversos sistémicos en

comparación con los beta-bloqueantes y los agonistas alfa2-adrenérgicos, que se reducen a episodios de exacerbación del asma y disnea o disminución de la capacidad respiratoria en sujetos afectados de EPOC (Arranz-Márquez, 2002).

Los análogos de prostaglandinas pueden usarse solos (en monoterapia - bimatoprost, latanoprost y travoprost- parecen ser al menos tan efectivos como el maleato de timolol en el descenso de la PIO) o en combinación con otros fármacos antiglaucomatosos (Van der Valk, 2005). En muchos países europeos hay disponibles combinaciones fijas de análogos de prostaglandinas y maleato de timolol, que administradas una vez al día por la noche, han demostrado ser tan efectivas como los componentes de la combinación administrados juntos pero por separado (Van der Valk, 2005).

1.4.1.1.b.- Agonistas adrenérgicos (simpaticomiméticos)

En el tratamiento médico del glaucoma se han utilizado tanto agonistas adrenérgicos *no selectivos* (epinefrina) como agonistas *alfa2-selectivos* (clonidina, apraclonidina y brimonidina). La *epinefrina* ha sido utilizada en el tratamiento del glaucoma durante casi un siglo, pero el desarrollo posterior de los agonistas alfa2-adrenérgicos ha relegado su uso en el momento actual.

Existen tres agentes alfa2-adrenérgicos de uso tópico ocular -clonidina, apraclonidina y brimonidina- que se diferencian fundamentalmente en su índice terapéutico, grado de selectividad, lipofilia y efectos adversos. *Clonidina* fue el primer agonista alfa-2 utilizado en el tratamiento del glaucoma. Su alta lipofilia facilita su penetración a nivel ocular pero también condiciona su aplicabilidad clínica por la facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica y originar efectos

secundarios sistémicos como hipotensión arterial, sedación e incluso síncope. La *apraclonidina* es un derivado hidrofílico de la clonidina, lo que explica su baja penetración corneal y la dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que no asocia los efectos secundarios sistémicos de la clonidina. Es el menos alfa-2 selectivo de los tres, y debe su efecto hipotensor a un doble mecanismo: reduce la producción de humor acuoso debido a su acción alfa-1-vasoconstrictora sobre los procesos ciliares y reduce la presión venosa episcleral disminuyendo la resistencia al drenaje del acuoso. En España hay comercializadas dos concentraciones de apraclonidina, al 1% formulada en monodosis, para uso en procesos agudos como profilaxis de picos hipertensivos tras procedimientos oftalmológicos con láser, y apraclonidina al 0,5% para tratamiento antiglaucomatoso crónico, aplicado dos o tres veces al día (Van der Valk, 2005). Prácticamente todos los efectos adversos de apraclonidina son de tipo local, en relación con su actividad alfa1-agonista, pero el efecto adverso que más ha limitado su uso clínico es la reacción de hipersensibilidad ocular inducida en los tratamientos prolongados (blefarconjuntivitis alérgica y dermatitis), considerándose como tratamiento de segunda línea y fundamentalmente en terapia combinada con otros agentes hipotensores. La *brimonidina* es un compuesto lipofílico, con una alta penetración ocular a través de la córnea, y de los tres es el que presenta una mayor selectividad por los receptores alfa-2. Actúa fundamentalmente disminuyendo la producción de humor acuoso, aunque también podría tener cierto efecto facilitando el flujo de salida uveo-escleral. La SEUG incluye la brimonidina entre los fármacos de primera línea en el tratamiento del glaucoma en dos aplicaciones al día, especialmente en pacientes en tratamiento con betabloqueantes sistémicos, y en la profilaxis de picos hipertensivos tras tratamientos

oftalmológicos con láser (Tuulonen, 2003). Es el único fármaco antiglaucomatoso considerado dentro del grupo B de seguridad en el embarazo, no existiendo evidencia de efectos teratógenos en humanos aunque debe evitarse en el último trimestre del embarazo (Coleman, 2005). Debido a la capacidad de brimonidina de atravesar la barrera hematoencefálica, puede producir síntomas por depresión del SNC (astenia, somnolencia, falta de atención e hipotensión sistémica), por lo que no debe utilizarse en pacientes en tratamiento con antidepresivos tricíclicos o inhibidores de la monoaminoxidasa, ni en niños menores de 2 años.

1.4.1.1.c.- Beta-bloqueantes

Su introducción a finales de los 70 supuso una verdadera revolución en el tratamiento del glaucoma. El *maleato de timolol* (1978) fue el primero en utilizarse en el tratamiento del glaucoma, y posteriormente se han ido poniendo a disposición del oftalmólogo otros principios activos de la misma familia, de los cuales los más utilizados en la actualidad son el *carteolol*, el *betaxolol*, y el *levobunolol*. Los bloqueantes beta-adrenérgicos actúan disminuyendo la producción de HA al actuar sobre los receptores beta del cuerpo ciliar. Su posología es de una gota cada 12 horas, con algunas excepciones, como el levobunolol que puede ser administrado una vez al día o el maleato de timolol que formulado en gel (Timogel®) puede utilizarse también en aplicación única diaria (Rouland, 2002). Los beta-bloqueantes tópicos se dividen en dos grupos: *selectivos* que bloquean únicamente los receptores beta-1 (betaxolol), y *no selectivos* que actúan sobre los receptores beta-1 y beta-2 (maleato de timolol, carteolol, levobunolol). Poseen una alta eficacia hipotensora y una buena tolerancia local, aunque su uso clínico se ve limitado por los efectos adversos

sistémicos que presentan. Contraindicados en casos de hiperreactividad bronquial (EPOC o asma), bradicardia sinusal, hipotensión arterial, bloqueos auriculo-ventriculares, insuficiencia cardíaca congestiva, embarazadas durante el segundo y tercer trimestres de la gestación o pacientes con antecedentes de shock anafiláctico o reacciones alérgicas graves a medicamentos. La mayoría de los problemas de intolerancia local a los betabloqueantes tópicos son debidos a la utilización del cloruro de benzalconio (BAK) como conservante en sus formulaciones. Para disminuir la incidencia de efectos adversos locales se han desarrollado formulaciones sin conservantes, de las cuales Timabak[®] es la única comercializada en nuestro país.

Los betabloqueantes son fármacos efectivos en la reducción de la PIO, y se dispone de una amplia experiencia en cuanto a su eficacia, seguridad y tolerabilidad. Sus contraindicaciones son bien conocidas, aunque algunas de ellas no han sido claramente probadas o no se ha demostrado su relación causal.

1.4.1.1.d.- Inhibidores de anhidrasa carbónica (IAC)

Los inhibidores de la anhidrasa carbónica han formado parte del tratamiento médico del glaucoma desde mediados de los años 50. En el momento actual son el único tratamiento sistémico empleado como terapia crónica en el glaucoma, pero sus efectos adversos (anorexia, parestesias, litiasis renal y acidosis) han limitado de forma importante su uso en la clínica habitual. Actúan disminuyendo la producción de HA mediante la inhibición de la anhidrasa carbónica (isoenzima II) en los procesos ciliares y pueden ser utilizados en monoterapia o como tratamiento coadyuvante asociados a otros fármacos antiglaucomatosos. Se dividen en dos

grupos: los *IAC sistémicos* (acetazolamida) y los *IAC tópicos* (dorzolamida y brinzolamida).

La *acetazolamida* es un IAC sistémico utilizado en el tratamiento del glaucoma. Los efectos adversos de acetazolamida cuando es administrada por vía oral (nauseas, parestesias, pérdida de peso, malestar general, pirosis, nefrolitiasis, aumento de la frecuencia miccional, hipopotasemia, acidosis metabólica, cefalea e incluso cuadros de anemia hemolítica y/o aplásica) se relacionan con la dosis administrada, por lo que no se recomienda iniciar el tratamiento con dosis muy elevadas. La dosis utilizada normalmente en la clínica oscila entre los 125 mg administrados 2 veces al día hasta los 250 mg administrados cada 8 horas. *Dorzolamida* se introdujo en el mercado como el primer IAC tópico para el tratamiento del glaucoma en 1995. Presenta una alta afinidad no sólo por la isoforma II sino también por la isoforma IV, lo que podría justificar un cierto efecto sobre el flujo sanguíneo ocular. Se utiliza en el tratamiento del glaucoma a una concentración del 2%, presentando un efecto terapéutico máximo a las 2 horas de su instilación, y una duración de más de 8 horas (Van der Valk, 2005). La *brinzolamida* se introdujo tres años después, en 1998, y presenta una estructura química similar a la de la dorzolamida pero más liposoluble. Estudios comparativos de eficacia pusieron de manifiesto que el efecto hipotensor de brinzolamida 1% era similar al de dorzolamida 2%, administrada 2 y 3 veces al día. En la práctica se utiliza brinzolamida al 1% porque concentraciones más elevadas no han demostrado mayor potencia hipotensora y sí mayores efectos adversos (Van der Valk, 2005). Los problemas de tolerancia de los IAC tópicos son básicamente locales, produciendo escozor y picor

ocular, queratitis punctata superficial, visión borrosa, urticaria y angioedema periocular, incluso vértigo, cefalea y/o miopización transitoria.

1.4.1.1.e.- Parasimpaticomiméticos (mióticos)

En este grupo se incluyen compuestos capaces de producir respuestas biológicas mediante estimulación directa de los receptores colinérgicos (parasimpaticomiméticos) o bien inhibiendo la acción de la colinesterasa (anticolinesterásicos).

Dentro del grupo de fármacos parasimpaticomiméticos que actúan sobre los receptores muscarínicos, la *pilocarpina* (de origen natural) es el único comercializado en España para el tratamiento del glaucoma. Otros agentes colinérgicos como el *carbacol* (de origen sintético), la *fisostigmina* (anticolinesterásico de efecto reversible) o el *ecotiofato* (anticolinesterásico de efecto irreversible) han encontrado utilidad oftalmológica por el efecto hipotensor derivado su acción constrictora sobre el músculo ciliar y el esfínter del iris (miosis), sin embargo, en el momento actual ninguno de ellos está disponible comercialmente en España para uso oftalmológico.

La *pilocarpina* actúa sobre los receptores colinérgicos muscarínicos de la musculatura lisa ocular produciendo la contracción del esfínter del iris (miosis) y del músculo ciliar (acomodación) y originando una rotación del espón escleral con la consiguiente dilatación y apertura de los espacios trabeculares, lo que favorece el flujo de salida del HA a su través. Se ha postulado un efecto directo de la pilocarpina sobre la malla trabecular, que no ha sido nunca demostrada. Desde su síntesis en 1876, la pilocarpina ha sido el miótico más utilizado en el tratamiento del glaucoma, tanto de ángulo abierto como de ángulo cerrado. Sin embargo, en nuestro medio se

encuentra en desuso como tratamiento crónico del glaucoma, en base a la corta duración de su acción y a sus efectos secundarios (cefalea, visión borrosa, hiperemia conjuntival y epífora, iridociclitis, cierre angular paradójico y tracciones vítreo-retinianas que pueden aumentar el riesgo de desprendimiento de retina). En el momento actual sus usos terapéuticos son puntuales, utilizándose en el tratamiento del glaucoma agudo por cierre angular, previo a la realización de iridotomías láser. La capacidad de la pilocarpina para alterar la barrera hematoacuosa (BHA) contraindica su uso en los glaucomas neovasculares y/o uveíticos, y en todas aquellas situaciones en las que exista una reacción inflamatoria en la cámara anterior del ojo.

Las novedades en el tratamiento médico antiglaucomatoso se centran, en el momento actual, en el perfeccionamiento de principios activos preexistentes para mejorar su tolerancia local, facilitar su administración y cumplimiento terapéutico; y en el descubrimiento de nuevas moléculas.

En cuanto a productos ya comercializados, se está intentando mejorar su tolerancia local mediante la introducción de modificaciones en su formulación, como la sustitución de conservantes clásicos como el cloruro de benzalconio (BAK), por otros con menor toxicidad sobre la superficie ocular como el Polyquad (Travatan-Free[®]), o como el diseño de presentaciones libres de conservantes (Saflután[®]) (Hommer, 2010).

En cuanto a los nuevos principios activos podemos destacar las siguientes líneas de trabajo:

1.4.1.1.f.- Nuevos análogos de prostaglandinas

A la lista de análogos de prostaglandinas existentes en el mercado, se unen otros nuevos que pretenden mejorar su potencia farmacológica. Dos análogos de prostaglandinas de segunda generación, el AR-102 y el PF-03187207 se encuentran en fase de investigación. Respecto al *AR-102*, ha demostrado en ensayos preclínicos una eficacia hipotensora superior a la de latanoprost con resultados de tolerancia óptimos e incluso superiores a los de travoprost. En cuanto al *PF-03187207*, es un análogo de PGF₂ α que asocia propiedades de donante de moléculas de óxido nítrico, potenciando el efecto hipotensor del análogo de PGs con el efecto añadido de la relajación del músculo ciliar. Sin embargo, a partir de los resultados de ensayos preclínicos parece que esta molécula no va a ser finalmente comercializada (Wierbowska, 2010).

1.4.1.1.g.- Agonistas de receptores serotoninérgicos

Recientemente se ha identificado la presencia de receptores serotoninérgicos 5-HT₂ a nivel del músculo ciliar y del trabéculum, lo que podría suponer una nueva diana terapéutica. En modelos de glaucoma experimental en monos se ha probado la eficacia de un agonista selectivo 5-HT₂, el *R-DOI 0.5%*, que administrado por vía tópica una vez al día, consigue reducir la PIO aumentando el del flujo de salida uveo-escleral (Gabelt, 2005).

1.4.1.1.h.- Derivados cannabinoides

Se ha identificado la expresión de receptores cannabinoides (CB₁) en células del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar y en la malla trabecular de ojos de rata, oveja y de humanos, así como en el músculo ciliar de ojos humanos, lo que justificaría

la capacidad potencial de la *marihuana* y otros *derivados cannabinoides* (tetrahidrocannabinol (THC)) para reducir la PIO por un doble mecanismo: incrementando el flujo de salida uveo-escleral y disminuyendo la producción de HA. Lo que no se ha podido demostrar todavía, es si el efecto hipotensor de los cannabinoides es producido directamente por su acción sobre el receptor CB1 o indirectamente, al inducir la síntesis de prostaglandinas (PGE₂ y PGF_{2α}) (Pinar-Sueiro, 2011).

1.4.1.1.i.- Antagonistas de receptores esteroideos

Mifepristona es un antagonista específico de receptores glucocorticoideos, que administrada por vía tópica en ojos de conejo, ha mostrado capacidad para controlar las elevaciones de PIO inducidas por sobreexposición a dexametasona. En ensayos clínicos en fase II, se ha evaluando el papel de una formulación de mifepristona tópica (RU486) en el tratamiento de la HTO secundaria al uso de corticoides y del glaucoma corticoideo con buenos resultados (Novack, 2007).

1.4.1.1.j.- Inhibidores de la Rho-kinasa y estatinas

Se investiga el uso en el tratamiento del glaucoma de agentes capaces de disminuir la PIO mediante modulación del drenaje del HA a través de la malla trabecular (“mecanismo trabecular”). En este grupo estarían, por una parte, aquellos agentes capaces de modificar el volumen y la forma de las células endoteliales trabeculares así como sus uniones intercelulares, produciendo lo que en el año 1979, Kaufman denominó “trabeculocanalotomía farmacológica”; y por otra, aquellas sustancias capaces de modular la contractilidad de la malla trabecular mediante inhibición de sistemas enzimáticos específicos implicados en la interacción de fibras de actina y miosina del citoesqueleto de las células trabeculares. En este sentido, se

ha demostrado la capacidad in vitro de los *inhibidores de la Rho-kinasa*, como el Y-27632, de inducir cambios en la morfología de las células endoteliales trabeculares y en sus uniones intercelulares, facilitando el drenaje del HA a través de la malla trabecular (Koga, 2006). También se han sugerido propiedades adicionales de los inhibidores de la Rho-kinasa, como el aumento del flujo sanguíneo ocular, la protección de las CGRs y la regeneración axonal, que potenciarían su eficacia terapéutica en el glaucoma desde la perspectiva de la neuroprotección (Rao, 2007). Por otra parte, las *estatinas*, habitualmente utilizadas como fármacos hipolipemiantes, han demostrado capacidad para inducir cambios en la morfología y contractilidad de las células de la malla trabecular mediante la inducción de modificaciones en su citoesqueleto. Dentro de esta familia, *lovastatina* ha mostrado su eficacia hipotensora en condiciones experimentales in vitro, al facilitar el drenaje del HA por vía trabecular (Song, 2005).

En cualquier caso, la decisión de tratar o no a un paciente, así como la decisión del fármaco con el que iniciar el tratamiento, debe hacerse de manera individualizada, considerando en cada caso: el estadio del daño glaucomatoso, el nivel de PIO, la edad y la esperanza de vida del paciente, y la existencia de otros factores de riesgo asociados (Vass, 2007). La ineficacia de las terapias médicas hipotensoras es debida, en parte, a la baja adhesividad y falta de cumplimiento terapéutico de los pacientes, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevas fórmulas que mejoren la tolerancia y simplifiquen las posologías de administración.

1.4.1.2.- Quirúrgico

Entre las modalidades de tratamiento quirúrgico de reducción de la PIO encontramos:

1.4.1.2.a.- Trabeculoplastia láser

Consiste en la aplicación de impactos de láser (láser Argón (TLA) o láser Diodo Selectivo (TSL)) en el trabéculum, creando microperforaciones a este nivel que favorezcan el drenaje del HA. Tiene un efecto limitado por lo que suele utilizarse como coadyuvante al tratamiento médico, siendo una alternativa útil si existe contraindicación para la cirugía o en casos de glaucomas pigmentarios y/o pseudoexfoliativos.

1.4.1.2.b.- Cirugía filtrante penetrante o trabeculectomía

Consiste en la creación de una fístula (comunicación directa) que permita el drenaje del HA desde la cámara anterior hacia el espacio subtenoniano. En la misma se diseñan dos colgajos esclerales, uno superficial y otro profundo, incluyendo en este último la membrana de Descemet, el canal de Schlemm y el trabéculum. Se forma así una especie de escotilla que quedará cubierta por el colgajo escleral superficial, realizando una iridectomía periférica para prevenir el bloqueo de esta ventana interna por el iris.

1.4.1.2.c.- Cirugía filtrante no penetrante

Esta modalidad de cirugía se diferencia básicamente de la trabeculectomía en que el mecanismo filtrante del HA desde la cámara anterior, se establece sin apertura de la misma, lo que reduce la incidencia de complicaciones derivadas del exceso de

filtración como hipotonías y desprendimientos coroideos. Consiste en diseñar dos colgajos esclerales lamelares y reseca el colgajo profundo respetando la membrana trabeculo-descemética. Esta modalidad de cirugía incluye dos procedimientos: la esclerectomía profunda no perforante (EPNP) y la viscocanaliculostomía.

1.4.1.2.d.- Dispositivos de derivación o drenaje artificiales

Son ingenios plásticos utilizados para crear una comunicación directa entre la cámara anterior y el espacio subtenoniano, y están indicados en casos específicos de glaucomas refractarios, en los que los procedimientos convencionales de cirugía filtrante han fracasado. La mayoría de estos dispositivos se basan en el diseño descrito originariamente por Molteno, y consisten en un tubo unido a un explante epiescleral posterior que favorecerá el drenaje de HA en un área de encapsulación alrededor del explante, localizado aproximadamente a 10-12 mm del limbo esclero-corneal, mientras que el otro extremo del tubo se sitúa en la cámara anterior. En estos implantes la reducción de la PIO es debida al flujo pasivo, dependiente de la presión de humor acuoso, a través de la pared capsular.

1.4.1.2.e.- Dispositivos bypass trabecular

Este tipo de dispositivos no tubulados persiguen incrementar la salida de HA, bien disminuyendo la resistencia de la malla trabecular y del tejido yuxtacanalicular, o bien buscando otras alternativas como el drenaje al espacio supracoroideo. Con mayor o menor éxito se han desarrollado numerosos implantes como el bypass-trabecular de Spiegel, el Eye-Pass o el Gold-Microshunt. El implante ExPRESS, por ejemplo, es capaz de mantener un flujo permanente de drenaje del humor acuoso a los espacios subconjuntival y supracoroideo. Es un dispositivo no valvulado de acero

inoxidable con una pestaña distal que previene que penetre en exceso y un espolón proximal que previene su extrusión. El primer dispositivo ExPRESS apareció en 1998, y se diseñó para ser implantado bajo conjuntiva, en glaucomas crónicos de ángulo abierto, pero pronto se detectaron complicaciones asociadas y frecuentes erosiones conjuntivales con esta técnica, por lo que Dahan y sugirieron colocación bajo un pequeño tapete escleral. Uno de los implantes más recientes es el stent trabecular Glaukos (Glaukos i-stent[®]). Este implante con forma L, de 1x0.4 mm de tamaño y con un diámetro externo de 180 micras está compuesto de titanio y recubierto con heparina, que implantado ab-interno, busca establecer una comunicación directa de la cámara anterior con el canal de Schlemm, venciendo así la resistencia al drenaje del HA por la vía trabecular.

Según los resultados del Collaborative Inicial Glaucoma Treatment Study (CIGTS) sobre eficacia del tratamiento - farmacológico vs trabeculectomía - en pacientes con GAA de reciente diagnóstico, la reducción de la PIO a los 4 años no difiere de forma significativa entre una u otra terapia, sin embargo, las cifras de PIO alcanzadas con la cirugía fueron inferiores a las logradas con el tratamiento médico, siendo los resultados funcionales (conservación del campo visual) similares en ambos grupos. Por su parte, la evaluación de la calidad de vida resultó inicialmente mejor en el grupo de tratamiento médico, sin embargo, tanto la cirugía como el tratamiento farmacológico aumentaron la incidencia de catarata, aunque en mayor medida con la cirugía (Lichter, 2001).

Shaarawy en 2004 analizó los pros y los contras de cada una de las modalidades de tratamiento en pacientes glaucomatosos -tratamiento médico versus tratamiento quirúrgico (trabeculectomía y cirugía no perforante)- estableciendo que, frente al tratamiento médico, la cirugía era capaz de conseguir mayores reducciones de la PIO, mejor mantenidas a largo plazo y con menores fluctuaciones, menor coste económico y menores efectos secundarios sistémicos. Sin embargo, el principal inconveniente del tratamiento quirúrgico serían los efectos secundarios a nivel ocular (cataratas, molestias oculares y disminución de visión) (Shaarawy, 2004).

Aunque la cirugía se establece como el tratamiento de primera línea en los países en vías de desarrollo, en los países desarrollados se mantiene como tratamiento de segunda elección en base a sus potenciales complicaciones. La cirugía filtrante no penetrante (EPNP) constituye una alternativa quirúrgica más segura que la trabeculectomía, pero su imposición como práctica generalizada, está condicionada en gran parte por la complejidad de la técnica y una larga curva de aprendizaje. Por estas razones es difícil que este tipo de cirugía se imponga en los países en vías de desarrollo (Shaarawy, 2004).

1.4.2.- Nuevas modalidades de tratamiento

El tratamiento del glaucoma tiene como objetivo preservar la función visual evitando la progresión de la neuropatía óptica glaucomatosa. Sin embargo, las nuevas líneas de investigación, en el campo de la neuroprotección y la neuroregeneración, apuntan hacia la posibilidad de actuar directamente sobre los mecanismos implicados en el daño y la muerte de la célula ganglionar retiniana.

Tradicionalmente, las terapias antiglaucomatosas -tratamiento médico y/o tratamiento quirúrgico- han sido la única opción terapéutica disponible para el tratamiento del glaucoma. Sin embargo, para muchos pacientes la reducción de la PIO no es capaz de frenar la progresión del daño glaucomatoso sobre el nervio óptico ni el deterioro del campo visual (Cheung, 2008). Ya hace años, los estudios de Cockburn (1983) y Brubaker (1996), mostraron como en algunos casos, la pérdida de CGRs continuaba a pesar de la reducción de la PIO, estableciendo que aquellas intervenciones terapéuticas encaminadas exclusivamente a la disminución de la PIO podían ser insuficientes en determinados pacientes con glaucoma.

El principal desafío hoy, en el tratamiento del glaucoma es, por tanto, prevenir la propagación del daño neuronal y frenar la pérdida progresiva de fibras nerviosas, más allá del simple control de la PIO (Yücel, 2003). Así, en los últimos años, ha cobrado interés el ensayo de otras estrategias de tratamiento, como la *neuroprotección*, la *vasoprotección* o la *terapia génica*, en base a la insuficiencia de las terapias tradicionales para prevenir la progresión de la enfermedad en algunos pacientes con glaucoma (Cheung, 2008).

1.4.2.1.- Terapias neuroprotectoras

Estudios recientes defienden las similitudes existentes en los mecanismos celulares de muerte neuronal, entre el glaucoma y otras enfermedades del SNC, existiendo una tendencia creciente a probar la eficacia en el glaucoma de terapias neuroprotectoras ya existentes para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o la corea de Huntington.

La *neuroprotección* puede definirse como la aplicación de distintos agentes terapéuticos para intentar prevenir, frenar e incluso revertir la muerte de células neuronales, cualquiera que sea la naturaleza del daño primario. Parece que las CGRs sanas y aquellas en estado de compromiso energético (Osborne, 2009), pueden ser protegidas de la degeneración secundaria, mediante el bloqueo de alguno de los mecanismos implicados en la muerte celular programada (apoptosis): deprivación de factores neurotróficos (GDNF, BDNF, CNTF), producción de radicales libres del oxígeno (RLO) por disfunción mitocondrial, liberación excesiva de glutamato, incremento del Ca^{2+} intracelular o activación de mediadores pro-apoptóticos como la proteína Bad (Chidlow, 2007). De esta forma, han aparecido diferentes compuestos, naturales o sintéticos, capaces de detener la muerte de la CGR tras el daño axonal, actuando por distintos mecanismos: factores neurotróficos (BDNF, CNTF), inhibidores de caspasas (IQACRG), activadores de PI3-kinasa/Akt-kinasa (eritropoyetina), estabilizadores de la función mitocondrial (Coenzima Q10, inhibidores del NF- κ B), sequestradores de RLO (vitamina E, ácidos grasos Ω 3, vitamina B12, extracto Ginkgo-biloba), inhibidores de la óxido nítrico sintetasa (2-aminoguanidina), bloqueantes de canales calcio (fumarato de brovincamida, flupirtina, nimodipino, nifedipino, verapamilo), beta-bloqueantes (betaxolol, timolol), agonistas alfa-2-adrenérgicos (brimonidina), inmunoactivadores (acetato de glatiramero, anti-TNF), antagonistas de los receptores NMDA del glutamato (MK 801, memantina), inhibidores de la agregación de proteína β -amiloide (proteínas de choque térmico), inhibidores de acetilcolinesterasa (Bis (7)-tacrina). Dichos agentes neuroprotectores pueden utilizarse solos o en combinación con las terapias hipotensoras tradicionales,

en una estrategia que se ha venido a denominar “terapia completa del glaucoma”

(Cheung, 2008).

1.4.2.1.a.- Bloqueantes de canales de calcio

Se ha sugerido el efecto neuroprotector de los bloqueantes de canales de calcio (BCC), en base a su capacidad para neutralizar las corrientes de Ca^{2+} inducidas por la sobreactivación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato. De hecho, uno de los primeros ensayos clínicos sobre neuroprotección fue el llevado a cabo por Sawada en 1996, sobre la eficacia neuroprotectora del *fumarato de brovincamida* por vía oral en pacientes con glaucoma normotensivo (GNT), en el que mostró los efectos beneficiosos del tratamiento sobre el campo visual, aunque con resultados no significativos. Más tarde, Koseki y colaboradores (1999) diseñaron un estudio similar, cuyos resultados sugerían también la capacidad de brovincamida para retrasar el deterioro campimétrico en pacientes con GNT, aunque finalmente, sus autores atribuyeron este resultado, más a una posible mejoría en la función cerebral derivada del efecto vasodilatador del fármaco que al efecto neuroprotector del fármaco en sí mismo (Koseki, 1999). También se ha probado la eficacia neuroprotectora de *flupirtina* en modelos animales de HTO transitoria, en los que ha conseguido frenar la pérdida de células ganglionares retinianas (Nash, 2000). Otros BCC, como *nimodipino* o *nifedipino*, han sido probados como agentes neuroprotectores con resultados diversos. Mientras que en ensayos clínicos hospitalarios unicéntricos han demostrado un efecto beneficioso sobre la función visual en pacientes con GAA, éste hecho no ha sido confirmado en estudios caso-control (Araie, 2011). Por su parte, *verapamilo* aunque ha sido capaz de lograr reducciones significativas de la PIO, con una potencia

comparable a la del maleato de timolol tanto en modelos animales de glaucoma como en humanos, sólo ha mostrado capacidad neuroprotectora teórica en modelos de glaucoma experimental en conejos. A pesar de los alentadores resultados alcanzados con los BCC en ensayos clínicos de isquemia cerebral aguda, éstos no son directamente extrapolables a otras enfermedades neurodegenerativas de curso crónico como el glaucoma (Araie, 2011).

1.4.2.1.b.- Bloqueantes beta-adrenérgicos

Los beta-bloqueantes (BB) deben su efecto neuroprotector a la capacidad añadida de bloquear canales de sodio y calcio (tipo L), reduciendo de esta manera, la entrada masiva de Ca^{2+} a la célula, en condiciones de sobreexcitación. *Betaxolol*, utilizado habitualmente como hipotensor tópico en humanos, ha demostrado en cultivos de células neuronales capacidad para frenar las corrientes de Ca^{2+} inducidas por glutamato, y ha mostrado efecto neuroprotector frente a la isquemia retiniana en conejos y frente a la citotoxicidad NMDA-inducida en ratas, tras su administración tópica (Osborne, 1999); lo que justificaría su potencial uso como terapia neuroprotectora en el glaucoma. Sin embargo, la potencia con la que betaxolol bloquea dichas corrientes de Ca^{2+} parece que no es suficiente como para poder ser utilizado como un verdadero neuroprotector en la práctica clínica (García-Campos, 2007). Por su parte, la aplicación tópica de *maleato de timolol* ha mostrado capacidad para frenar la pérdida de CGRs tanto en modelos experimentales in vitro de neurotoxicidad inducida por glutamato como en modelos in vivo de isquemia retiniana en ratas (Goto, 2002).

1.4.2.1.c.- Agonistas alfa-adrenérgicos

El efecto neuroprotector de los agonistas alfa-adrenérgicos es bien conocido a nivel del SNC. Se ha demostrado la capacidad de la *clonidina* para al estimular la producción de factores neurotróficos como el BDNF, y del factor de crecimiento fibroblástico (FGF-b), los cuales actuarían promoviendo la transcripción de genes de supervivencia y bloqueando la síntesis de proteínas pro-apoptóticas en la célula neuronal (Chao, 2000). *Brimonidina* ha conseguido mejorar la supervivencia de CGRs en modelos experimentales de daño neuronal retiniano por isquemia (Vidal-Sanz, 2001), compresión el nervio óptico y/o hipertensión ocular (WoldeMussie, 2001). Frente a clonidina, los agonistas alfa2-adrenérgicos más selectivos como brimonidina, no tienen efecto vasoconstrictor asociado, lo que los hace más útiles en la práctica clínica. Existen datos de niveles de brimonidina en vítreo tras su administración tópica (brimonidina 0.2 y 0.5%) en animales (Acheampong, 2002) y en humanos (Kent, 2001), alcanzando concentraciones superiores al valor de la CE_{50} de activación de receptores alfa2-adrenérgicos retinianos (Concentración eficaz-50), aunque se desconoce la concentración a la cuál esta molécula tiene efecto neuroprotector sobre la célula ganglionar retiniana.

1.4.2.1.d.- Antagonistas de receptores NMDA del glutamato

El concepto de excitotoxicidad neuronal, al que cada vez se le concede un papel más importante en la patogenia del glaucoma, hace referencia al fenómeno de muerte celular programada (apoptosis), inducida por la presencia de niveles excesivos de glutamato en el medio extracelular. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y la retina (Thoreson, 1999), y su sobreexpresión ha sido identificada

como uno de los mecanismos implicados en la degeneración secundaria de las CGRs en el glaucoma. Aunque hay distintos tipos de células retinianas que expresan receptores NMDA, las CGRs presentan una mayor vulnerabilidad a los efectos citotóxicos del glutamato, lo que podría justificar en parte, la pérdida selectiva de este tipo celular en el glaucoma, tal y como han demostrado las experiencias in vitro (Luo, 2001). Por esta razón, el bloqueo de la excitotoxicidad mediada por la liberación masiva de glutamato, en respuesta a la degeneración primaria de la célula ganglionar, constituye una estrategia terapéutica muy interesante en el glaucoma (Lipton, 2004).

Se ha probado la eficacia de distintos antagonistas de los receptores NMDA del glutamato para frenar la pérdida de CGRs en distintos modelos experimentales de daño retiniano en ratas (WoldeMussie, 2002). Entre ellas, el *MK801* (5-methyl-10,11-dihidro-5H-dibenzociclohepteno-5,10-imina), un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, posiblemente el mejor conocido, ha mostrado propiedades neuroprotectoras en modelos experimentales de HTO en ratas, tras su administración intraperitoneal (Chaudhary, 1998). Sin embargo, su aplicación clínica se ha visto limitada en la práctica, por el efecto neurotóxico derivado de su alta afinidad por el receptor, interfiriendo en las sinapsis fisiológicas del glutamato. Por su parte, memantina (derivado de amantadina) es un antagonista de receptores NMDA del glutamato, aprobado por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que se diferencia de otros antagonistas NMDA en su moderada-baja afinidad por el receptor y en una rápida cinética de unión al mismo. Estas propiedades hacen de memantina un agente eficaz en el bloqueo de la actividad glutamatérgica excesiva sin interferir en el funcionamiento normal del SNC, mejorando así su tolerancia frente a otros antagonistas NMDA (Chen, 2006).

1.4.2.1.e.- Inhibidores de la agregación de proteína β -amiloide

Enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington, se han caracterizado desde el punto de vista histopatológico por la presencia a nivel cerebral de placas seniles formadas por agregación de proteína amiloide- β (A β), resultante de un procesamiento anómalo del precursor de proteína amiloide (APP) en las células nerviosas.

Se ha demostrado, en pacientes con glaucoma y en modelos de glaucoma experimental en ratas, que existe un aumento de los niveles de A β en las CGRs, coincidiendo con un fallo en el procesamiento del APP, inducido por la activación de las caspasas (McKinnon, 2002). De esta manera, la implicación de la proteína A β en la apoptosis de la célula ganglionar retiniana en el glaucoma, proporciona una nueva diana terapéutica para el control de la enfermedad. Se ha probado la eficacia de tres agentes capaces de inhibir la agregación de proteína A β en la célula ganglionar: el *rojo Congo*, un anticuerpo anti-A (A-ab) y un inhibidor de secretasa, cuya combinación consiguió reducir de manera importante (> 80%) la apoptosis de CGRs en modelos de HTO inducida, mostrando cierta superioridad del anticuerpo anti-A respecto a los otros dos (Guo, 2007).

Se ha reconocido la implicación de las *proteínas de choque térmico* (HSP, de las siglas en inglés “Heat Shock Proteins”) en la fisiopatología de distintos procesos neurodegenerativos y entre ellos del glaucoma (Tezel, 2000). Constituyen una familia de proteínas, clasificadas según su peso molecular (HSP-90, HSP-72, HSP-70, HSP-60, HSP-25) capaces de prevenir la agregación intracelular de proteínas desnaturalizadas. Se ha demostrado en modelos de glaucoma experimental en ratas, como el tratamiento con *geranil-geranil-acetona* induce la expresión de HSP-72 en las CGRs,

protegiéndolas frente al daño glaucomatoso (Ishii, 2003). Aunque todavía no se han desarrollado ensayos clínicos que prueben la eficacia de este compuesto en pacientes con glaucoma, se prevé una buena eficacia y tolerancia tras su administración por vía oral.

1.4.2.1.f.- Factores neurotróficos

No se conoce exactamente el papel de los factores neurotróficos endógenos o neurotrofinas (NT), en la supervivencia de la célula ganglionar retiniana tras la lesión del nervio óptico. Las neurotrofinas son una familia de moléculas peptídicas (entre las que se incluyen *factor de crecimiento nervioso* (NGF), el *factor neurotrófico derivado del cerebro* (BDNF), las *neurotrofinas NT-3, NT-4/5 y NT-6*, responsables de promover el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las células neuronales, mediante interacción con receptores específicos (TrkA, TrkB, TrkC y p75-NTR). La privación de factores neurotróficos puede inducir a la apoptosis de las células nerviosas, y de hecho, las experiencias de diversos autores como Anderson (1974), Quigley (1976), Mansour-Robaey (1994) o Meyer-Frank (1995) avalan su implicación en la apoptosis de las CGRs en el glaucoma (Johnson, 2009).

La administración del BDNF mediante inyección intravítrea ha mostrado capacidad para mejorar la supervivencia de las CGRs en modelos de glaucoma experimental, tras sección del nervio óptico y/o isquemia retiniana, tanto en ojos de rata como de mamíferos superiores (Chen, 2001). El *factor neurotrófico ciliar* (CNTF) es una citoquina con función trófica (estructuralmente no relacionado con las neurotrofinas), implicada en la supervivencia neuronal, que ha demostrado la protección de las CGRs en modelos animales de hipertensión ocular en ratas, aunque

con menor eficacia que el BDNF (Ji, 2004). Sin embargo, la aplicación clínica de NTs se ha visto condicionada por su baja especificidad (unión a ambos subtipos de receptores Trk y p75), provocando la activación de múltiples vías de señalización intracelular, con efectos pro-apoptóticos no deseados. Por su baja biodisponibilidad y dificultad para alcanzar concentraciones eficaces en el segmento posterior del ojo, dada su naturaleza polipeptídica (rápida degradación proteolítica y dificultad para atravesar las barreras hematoa-cuosa y hemato-retiniana por su elevado peso molecular), se está probando la administración de moléculas no peptídicas capaces de estimular la actividad trófica en el tejido retiniano dañado, como la *idebenona* (1994) y/o el *clenbuterol* (1998), entre otras, que han demostrado ser eficaces en modelos de daño cerebral isquémico y en algunas neuropatías ópticas (Bamils, 2007), sin embargo, no se ha divulgado su uso específico en el tratamiento del glaucoma.

1.4.2.1.g.- Inhibidores de caspasas

La terapia antiapoptótica mediante inhibidores de caspasas, ha sido probada con resultados modestos en el campo de la neuroprotección. El *BIRC4*, es un inhibidor de caspasas (caspasas 3, 7 y 9), que ha demostrado capacidad para reducir la pérdida axonal, en modelos de glaucoma experimental en ratas (McKinnon, 2002). Sin embargo, la disfunción mitocondrial que acontece en el proceso de muerte de la célula ganglionar, con liberación masiva de RLO, puede continuar aún en caso de bloqueo de la actividad de las caspasas. Por otro lado, se ha demostrado la capacidad de *IQACRG*, un inhibidor de la caspasa-1, de proteger la célula ganglionar retiniana frente al daño inducido por la excitotoxicidad del glutamato, mediante bloqueo de la producción de la interleucina- β (IL- β) e inhibición de la metaloproteinasa-9 (MMP-9). La ventaja del

IQACRG frente a otros agentes inhibidores de caspasas reside en la reversibilidad de su efecto (Seki, 2010).

1.4.2.1.h.- Activadores de PI3 kinasa/Akt kinasa

La *eritropoyetina* (EPO) es un factor de crecimiento hematopoyético que regula y promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores de los eritrocitos. La unión de la EPO a su receptor específico (EPOR), identificado en la superficie de las CGRs así como de otras células retinianas, induce la activación de una cascada de señalización intracelular en la que se encuentran implicadas, entre otros mediadores, la PI3-kinasa/Akt-kinasa. Se ha podido comprobar cómo la EPO promueve la regeneración de neuronas del SNC al inhibir la apoptosis neuronal por activación de la vía de la PI3kinasa/Akt.

La administración sistémica de EPO ha mostrado efecto neuroprotector en distintos modelos de daño neuronal cerebral, accidente vascular cerebral, trauma mecánico o excitotoxicidad mediada por glutamato (Kretz, 2005). Además, se ha comprobado en condiciones *in vitro*, la capacidad de la EPO para prevenir la muerte de las CGRs inducida por efecto tóxico del glutamato y del óxido nítrico (Yamasaki, 2005). El tratamiento sistémico con EPO es capaz de reducir la pérdida de CGRs en modelos de glaucoma-genéticamente inducido en ratones (DBA/2J), con una eficacia similar a la mostrada por memantina. Además, la EPO posee propiedades angiogénicas añadidas, que mejorando el aporte sanguíneo y la oxigenación de la retina, favorecerían la supervivencia de las CGRs por un mecanismo vascular añadido (Zhong, 2007). De cualquier manera, directa (mediante inhibición de mediadores de apoptosis) o indirectamente (incrementando del flujo sanguíneo), la EPO es capaz de prevenir la

pérdida de CGRs y se presenta como un potencial complemento a las terapias hipotensoras tópicas en el tratamiento del glaucoma.

1.4.2.1.i.- Estabilizadores de la función mitocondrial

La disfunción mitocondrial que acontece en el glaucoma, en respuesta a distintos mediadores (hipoxia, aumento del TNF- α extracelular, entrada masiva de Ca^{2+} en la célula), se asocia con un incremento del estrés oxidativo y sobreproducción de radicales libres del oxígeno (RLO), activándose los mecanismos de apoptosis de la célula ganglionar. En este sentido la *coenzima Q10* (Coq10) ejerce un efecto neuroprotector de tres maneras: aumentando la función del complejo-I en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, inhibiendo la acción del factor nuclear-B (NF-B) (factor de transcripción implicado en procesos inflamatorios, autoinmunes y en procesos neoplásicos) y modulando la permeabilidad de los transportadores de membrana mitocondriales. La aplicación intraocular de CoQ10 ha mostrado efecto neuroprotector en modelos experimentales de isquemia retiniana e hipertensión ocular, en ratas, al frenar la muerte de CGRs (Nucci, 2007).

1.4.2.1.j.- Antioxidantes y secuestradores de RLO

Se cree que el estrés oxidativo juega un papel importante en la degeneración de la célula ganglionar retiniana en el glaucoma. En modelos de glaucoma experimental, así como en el humor acuoso de pacientes con GAA, se ha constatado una producción excesiva de RLO y productos de peroxidación lipídica, junto a una reducción en los niveles de glutatión reducido (Ferreira, 2004). La *vitamina E* y sus derivados (tocoferoles) son la principal fuente de antioxidantes liposolubles para la célula, actuando como secuestradores de radicales peróxido. Algunos estudios han probado con éxito la

eficacia neuroprotectora de la vitamina E y de otros agentes antioxidantes, en modelos experimentales de daño isquémico retiniano en ratas (Dilsiz, 2006). El *extracto de Ginkgo biloba* (EGb 761) ha demostrado capacidad para incrementar la supervivencia de las CGRs en modelos experimentales de glaucoma crónico en ratas. Se creía que el efecto de este compuesto derivaba de su poder antioxidante como secuestrador de RLO, pero recientemente se ha sugerido también su actuación a nivel de los receptores NMDA del glutamato (Hirooka, 2004).

1.4.2.1.k.- Inhibidores de óxido nítrico sintetasa

La oxido nítrico sintetasa-2 inducible (NOS-2) juega un papel importante en la degeneración axonal de la célula ganglionar retiniana. El bloqueo de la actividad de esta enzima podría representar una potencial estrategia terapéutica en el glaucoma y en otras neuropatías. La inhibición de la NOS-2 mediante la utilización de *2-aminoguanidina* en un modelo de hipertensión ocular en ratas, redujo la pérdida de células ganglionares, en alrededor de un 70% (Neufeld, 2004). Sin embargo estos resultados no han podido ser reproducidos en otros modelos de glaucoma experimental ni se han publicado hasta el momento ensayos clínicos en humanos que confirmen estos resultados.

1.4.2.1.l.- Inmunoactivadores

Las nuevas líneas de trabajo estudian el posible efecto neuroprotector de la activación local del sistema inmune en respuesta al daño axonal. La activación de células T frente a antígenos del nervio óptico dañado, como la proteína básica de la mielina, conduciría a la liberación de neurotrofinas a ese nivel, favoreciendo la supervivencia de las CGRs (Schwartz, 2003). Este efecto neuroprotector inmunomediado,

justifica el mecanismo de acción del *acetato de glatiramero* (Cop-1) en el tratamiento de la esclerosis múltiple, y su posible utilidad en el tratamiento de neuropatías ópticas como el glaucoma. Se ha demostrado el efecto neuroprotector del Cop-1 sobre la capa de CGRs, tras la lesión mecánica del nervio óptico y tras la administración intravítrea de glutamato (Kipnis, 2000). La inmunización pasiva mediante vacunación con Cop-1 ha conseguido frenar la muerte de CGRs en modelos de HTO en ratas (Ben Simon, 2006). Se ha sugerido la eficacia neuroprotectora de agentes con capacidad anti-TNF (ya que en los ojos afectados de glaucoma existe una sobreproducción de TNF- α por el tejido glial activado), capaces de bloquear la activación de las caspasas mediada por esta citoquina proinflamatoria, implicada en los procesos de degeneración de la célula ganglionar retiniana (Tezel, 2008). Entre las moléculas con actividad anti-TNF se encuentra el *factor derivado del epitelio pigmentario* (FDEP), una molécula con propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas, que mediante transfección intravítrea (transferencia con vectores virales) ha demostrado capacidad para reducir la pérdida de CGRs y fibras nerviosas retinianas en ratones DBA/2J (portadores de mutación inductora de glaucoma), al reducir los niveles de TNF- α , IL-18 y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Zhou, 2009).

1.4.2.1.m.- Inhibidores de acetilcolinesterasa

Se ha demostrado el efecto neuroprotector de la *bis(7)-tacrina* (derivado de la tacrina con actividad anticolinesterasa, utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer) sobre la muerte de CGR inducida por glutamato, tanto en condiciones in vitro como in vivo, posiblemente mediado por la inhibición de receptores NMDA, siendo potencialmente útil en el tratamiento de retinopatías de diversa naturaleza,

isquémica o traumática, de la neuropatía óptica glaucomatosa (Fang, 2010). Posee un potente efecto neuroprotector al actuar simultáneamente como inhibidor de la acetilcolinesterasa, inhibidor de los receptores NMDA e inhibidor de la NOS; y que además es capaz de frenar los mecanismos de apoptosis neuronal mediante regulación de canales de calcio-voltaje dependientes. Se ha visto como bis(7)-tacrina es incluso más potente que memantina en la inhibición de la muerte celular inducida por sobreexpresión de glutamato (Fang, 2010).

No existe por el momento, ningún agente neuroprotector aprobado para el tratamiento del glaucoma (Sena, 2010). Aunque muchas sustancias han mostrado efecto neuroprotector sobre las CGRs en modelos de daño neuronal por isquemia, por fototraumatismo y/o por sección del nervio óptico, sólo unas pocas han sido eficaces en modelos de glaucoma experimental. De ellas, brimonidina, memantina y el acetato de glatiramero han sido aprobadas por la FDA como agentes neuroprotectores para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, y se ha demostrado en ensayos preclínicos, su teórico efecto neuroprotector en modelos experimentales de glaucoma; sin embargo, sigue pendiente el desarrollo de ensayos clínicos controlados que corroboren su eficacia en humanos. Los ensayos sobre neuroprotección en el glaucoma deben estar diseñados para medir resultados clínicamente significativos a largo plazo, ya que el glaucoma es una enfermedad crónica y progresiva, y la perimetría, que es la herramienta habitualmente utilizada para medir la progresión en el glaucoma, es un método sujeto a una alta variabilidad,

lo que limita y dificulta la evaluación de la eficacia de las terapias neuroprotectoras en esta enfermedad (Sena, 2010).

No se dispone en la práctica clínica, de un método adecuado para evaluar los resultados de la neuroprotección en el glaucoma, siendo necesario desarrollar y validar nuevas variables y/o medidas de evaluación, basadas en métodos morfológico-cuantitativos, que permitan evaluar la capa de CGRs. Es posible que el desarrollo y aplicación de nuevas técnicas, no invasivas, como las técnicas de imagen para detección in vivo y en tiempo real de células en apoptosis (DARC), proporcionen una herramienta útil en este sentido (Guo, 2008).

1.4.2.2.- Terapias vasoprotectoras

Probablemente, la pérdida de fibras nerviosas y células ganglionares retinianas en el glaucoma, responde a un doble mecanismo, de una parte, a la compresión mecánica y de otra, a la remodelación tisular inducida por la isquemia y la falta de perfusión a nivel de la cabeza del nervio óptico (Caprioli, 2010). El fenómeno de isquemia-reperfusión retiniana induce la activación del tejido glial con sobreactivación de la óxido nítrico sintetasa-2 (NOS-2) y de las metaloproteasas (MMP), así como la sobreproducción del factor de necrosis tumoral-alpha (TNF- α) y de endotelina-1 (Grieshaber, 2007).

Un concepto muy relacionado últimamente con la neuroprotección es el de la vasoprotección, entendiendo por ésta, la capacidad de algunas sustancias de mejorar el flujo sanguíneo a nivel de la cabeza del NO. En este sentido, se ha probado la eficacia en el glaucoma de inhibidores de la endotelina, de bloqueantes de canales de calcio (BCC) y de antagonistas de receptores de la angiotensina II, los cuales serían

capaces de detener la progresión del daño glaucomatoso al mejorar el flujo sanguíneo ocular retrobulbar, gracias a su efecto vasodilatador (Koseki, 2008; Araie, 2011). Sin embargo, no hay evidencias suficientes que avalen la idea de que aumentando la perfusión a nivel de la cabeza del nervio óptico mejore la supervivencia de las CGRs, y por su parte, es posible que este aporte sanguíneo adicional al nervio óptico suceda a expensas de una derivación desde otros territorios retinianos (como en el caso de los BCC), con el consiguiente riesgo de efectos secundarios por hipoperfusión de los mismos (Caprioli, 2010).

1.4.2.3.- Terapia génica

La eficacia de la terapia génica pasa por desarrollar sistemas de transferencia efectivos. Entre ellos los *vectores virales de adenovirus* (VAA) se han mostrado como los vehículos más eficaces para su aplicación en el glaucoma, con capacidad para alcanzar tejidos oculares diana como la malla trabecular, el cuerpo ciliar o la célula ganglionar retiniana, con el objeto de modular su función. Otros que también se presentan como potenciales vehículos para la aplicación de la terapia génica en oftalmología son el *ARN pequeño de interferencia o ARN silenciador* (siRNA de las siglas en inglés de small interfering RNA) y los llamados *implantes celulares* que ya han sido probados en ensayos clínicos para el tratamiento de la DMAE seca, la retinosis pigmentaria o el glaucoma (Wierzbowska, 2010).

En este sentido se ha probado la capacidad de manipulación de la malla trabecular mediante transferencia génica, modulando la resistencia de ésta al flujo de salida del HA (Wierzbowska, 2010). Un ejemplo de ello, es la transferencia génica, mediante vectores de adenovirus, de *caldesmon* (una proteína intracelular implicada

en la regulación de la contractilidad de los filamentos de actina y miosina) en cultivos de células trabeculares humanas, que ha mostrado capacidad para inducir la reorganización de los citosqueletos de actina y de sus uniones intercelulares, lo que en condiciones *in vivo* se traduciría en un aumento del drenaje trabecular del acuoso (Grosheva, 2006). Otra opción de la terapia génica sería la modulación del control neuroendocrino del cuerpo ciliar mediante la transferencia de genes capaces de regular el ritmo circadiano de producción del HA. En este sentido se ha ensayado la transferencia de genes codificantes de receptores B-adrenérgicos como amplificadores del efecto inhibitorio de los B-bloqueantes sobre el cuerpo ciliar, o la transferencia de genes inhibidores de la expresión de canales de Aquaporina-1 (AQP-1) para disminuir la producción de humor acuoso (Zhang, 2002). Se ha estudiado también la posibilidad de promover la supervivencia de las CGRs mediante transfección de factores neurotróficos como el BDNF (Martin, 2003) y/o sus receptores (receptor TrkB), o mediante transferencia de genes codificantes del transportador del glutamato (GLAST) para facilitar la eliminación del exceso de glutamato extracelular.

2.- MEMANTINA

2.1.- CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

La molécula clorhidrato de memantina fue sintetizada por primera vez en la década de los 60 por Eli Lilly and Company, y patentada en 1968, tal como se recoge en el Index Merck. Es una amina tricíclica que posee dos grupos metilo en posición

meta y una molécula de ácido clorhídrico en forma de hidrato. Su fórmula molecular es la siguiente: $C_{12}H_{21}N \cdot HCl$ y su estructura es la que se muestra en la figura (fig. 6).

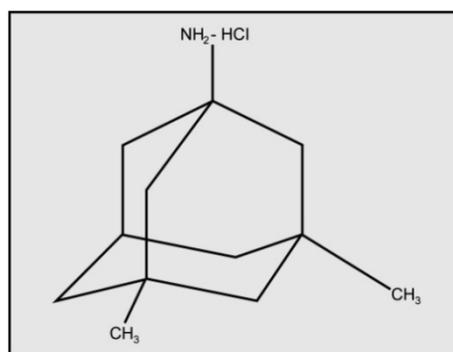


Figura 6: Estructura de la molécula clorhidrato de memantina.

En cuanto a sus características físico-químicas, memantina es un sólido cristalino, blanco, de sabor amargo, con un punto de fusión entre los 290-295° C. Tiene un peso molecular (Pm) de 215.77 KDa. Posee una solubilidad en agua a temperatura ambiente y pH 6.5, del 3.5 %, y un coeficiente de partición octanol/agua de 3.28, lo que la convierte en una sustancia bastante liposoluble capaz de atravesar membranas biológicas por difusión simple con relativa facilidad (Hughes, 2005).

Debido a la presencia de su grupo amino puede clasificarse como una base débil, su pK_a tiene un valor de 10.27 (Hughes, 2005), por lo que en función del pH puede existir en dos formas distintas, como catión (H_3N^+Mem , forma ionizada) o como especie neutra (H_2NMem , forma no ionizada), predominando la forma catiónica (ionizada) a pH de 5-9. El proceso de disociación viene definido por la siguiente constante:

$$K_a = \frac{[H_2NMem] \cdot [H^+]}{[H_3N^+Mem]}$$

Por tanto, en base a su carácter anfipático, memantina puede atravesar fácilmente las membranas biológicas cuando se presenta en su forma neutra (H_2NMem) mientras que su forma ionizada (H_3N^+Mem) es altamente retenida en los compartimentos y organelas intracelulares, justificando así que memantina pueda alcanzar concentraciones intracelulares por encima de las concentraciones extracelulares observadas, a pH fisiológico (Kornhuber, 1995).

2.2.- COMPORTAMIENTO FARMACOCINÉTICO

Memantina tiene una biodisponibilidad absoluta cuando se administra por vía oral de aproximadamente el 100% (McKeage, 2009), alcanzando concentraciones plasmáticas máximas (T_{max}) entre las 3-8 horas, no habiendo indicios de la influencia de la ingesta de alimentos en la velocidad de absorción de memantina tras su administración por vía oral. Dosis diarias de memantina de 20 mg por vía oral, producen concentraciones plasmáticas estables que oscilan entre los 70-150 ng/mL (0.5 - 1 μ M) a los 21 días del inicio del tratamiento, aunque con importantes variaciones interindividuales (Kornhuber, 2005; McKeage, 2009). Al administrar dosis diarias de memantina de 5-30 mg por vía oral se obtiene un índice medio de concentraciones LCR/plasma de 0.52. El volumen de distribución tras su administración por vía oral es de aproximadamente 10 L/kg y aproximadamente el 45% de la memantina en sangre se encuentra unida a proteínas plasmáticas (Kornhuber, 1995). Memantina ha

mostrado alta afinidad por proteínas titulares, como la melanina, con una capacidad máxima de unión de 140 nmoles/mg y una constante de disociación relativamente baja (Hughes, 2005).

Los principales metabolitos de degradación de memantina en humanos son el N-3,5-dimetil-gludantano, y la mezcla isomérica de 4- y 6-hidroxi-memantine y 1-nitroso-3,5-dimetil-adamantano, y ninguno de estos metabolitos muestra actividad antagonista NMDA. No se ha detectado in vitro metabolismo catalizado por la citocromo P₄₅₀. Memantina se excreta en más del 90% por vía renal, de manera monoexponencial, con una T_{1/2}-terminal de 60-100 horas. En voluntarios, con función renal normal, el aclaramiento total (C_L) asciende a 170 mL/min/1.73 m² y parte del aclaramiento total renal se logra por secreción tubular (McKeage, 2009).

Estudios en voluntarios sanos han demostrado una farmacocinética lineal para memantina en el intervalo de dosis de 10 a 40 mg/día, siendo éstas las dosis consideradas teóricamente terapéuticas (McKeage, 2009). Para una dosis de memantina por vía oral de 20 mg/día, los niveles de fármaco alcanzados en LCR concuerdan con el valor de la constante de inhibición (K_i) de los receptores NMDA postsinápticos de neuronas del cortex frontal humano (K_i= 0.5 µM) (Kornhuber, 1995).

2.3.- TOLERANCIA Y SEGURIDAD DE MEMANTINA

2.3.1.- Estudios de toxicidad en animales de experimentación

Estudios preclínicos de toxicidad aguda con memantina en roedores, tras administración oral y endovenosa, demostraron una baja toxicidad de la sustancia, con una dosis letal ≥ 300 mg/kg/día, y síntomas de ataxia y bradipnea precediendo el

momento de la muerte (Forest Pharmaceuticals, 2003). En estudios de toxicidad crónica, memantina ha mostrado signos de toxicidad a nivel del SNC, con fenómenos de vacuolización (lesiones de Olney) y necrosis de neuronas del sistema piramidal, similares a los documentados tras la administración de otros antagonistas NMDA, produciendo síntomas de ataxia, inestabilidad, bradipnea, temblor, agresividad e hiperexcitabilidad en ratas, y de apatía y estupor en perros (Forest Pharmaceuticals, 2003). Sin embargo, la dosis de memantina libre de efecto, en cuanto a toxicidad neurológica, se sitúa seis veces por encima de las dosis máximas terapéuticas recomendadas en humanos (20 mg/día). Solamente tras la administración de memantina en dosis altas (suficientemente altas como para producir la muerte del animal) se han documentado efectos tóxicos a nivel ocular en algunas especies animales (ratas y perros) (López-Pousa, 2007), en forma de opacidades corneales, edema corneal y/o degeneraciones del endotelio corneal; siendo la dosis de memantina libre de efecto, en cuanto a toxicidad ocular, de 8 a 44 veces superior a las dosis máximas recomendadas clínicamente en humanos, de lo que se deduce la existencia de un amplio margen de seguridad ocular para memantina (Physicians Desk Referente, 2004). La administración oral de 4 mg/Kg/día de memantina, durante 15 días en monos, alcanzando concentraciones plasmáticas por debajo de 2 μ M, no mostró signos de toxicidad retiniana en el análisis histológico ni interferencia en el procesamiento retiniano de la señal visual, evaluado mediante electroretinografía (ERG) y potenciales evocados visuales (PEV) (Hare, 2004(I)).

Memantina no ha mostrado potencial mutagénico en las pruebas estándar de genotoxicidad (Forest Pharmaceuticals, 2003). En ratones, el tratamiento con memantina a dosis de 40 mg/Kg/día durante 113 semanas no mostró indicios de carcinogenicidad

ni tampoco en ratas, tras 71 semanas de tratamiento con dosis de 40-20 mg/kg/día

(Thakur, 2002).

Estudios en conejos han demostrado que existe paso de memantina a través de la placenta. La administración oral de memantina en ratas (18 mg/Kg/día) y en conejos (30 mg/Kg/día), en periodo de gestación, indujo problemas de bajo peso y retraso en el crecimiento intrauterino de las crías, sin embargo, no provocó efectos teratogénos, situándose estas dosis por encima de las recomendadas en humanos (Forest

Pharmaceuticals, 2003).

2.3.2.- Estudios de toxicidad en humanos

No hay evidencias clínicas de que el tratamiento con memantina en mujeres embarazadas incremente el riesgo de malformaciones fetales, ni de si existe paso del fármaco a la leche materna, pero se aconseja tener precaución en la utilización del mismo en estos casos (Forest Pharmaceuticals, 2003).

Aunque no se dispone de datos farmacocinéticos suficientes de memantina en pacientes con insuficiencia renal o hepática, es de esperar un modesto efecto sobre el aclaramiento de la sustancia en estos casos que podría incrementar el tiempo de exposición, recomendándose una reducción de la dosis diaria administrada (5 mg/12 horas) pacientes con insuficiencia renal severa (Periclou, 2006). Condiciones de incremento del pH urinario, por ejemplo por dietas estrictas (vegetarianas o carnívoras), por infecciones graves del tracto urinario o por la toma de medicaciones concomitantes como los inhibidores de anhidrasa carbónica o el bicarbonato sódico, pueden disminuir la eliminación renal de memantina incrementado sus niveles en

plasma, debiéndose usar con precaución en estos casos (McKeage, 2009). No se ha estudiado el efecto de los trastornos hepáticos en la farmacocinética de memantina, pero ya que memantina se metaboliza en una baja proporción en el hígado y sus metabolitos resultantes son inactivos, no se prevén en principio, cambios clínicos relevantes en pacientes con insuficiencia hepática leve-moderada (McKeage, 2009).

No hay ensayos clínicos controlados sobre seguridad y eficacia de memantina en niños.

Los efectos adversos documentados en ensayos clínicos-controlados en humanos, incluyen como *frecuentes*: vértigos y mareos (7%), estreñimiento (5%), vómitos (3%), hipertensión arterial (4%), dolor de cabeza (6%), fatiga (2%), somnolencia (3%), confusión (6%) y alucinaciones (3%), principalmente en pacientes con enfermedad de Alzheimer grave; y como *poco frecuentes*: insuficiencia cardiaca (1/100 pacientes), alteraciones de la marcha, ataxia e hipoquinesia (1/100 pacientes), ACV (1/100), trombosis venosa y fenómenos tromboembólicos (1/100 pacientes), con una incidencia similar a la del grupo placebo. Se han notificado solamente casos aislados de pancreatitis y reacciones psicóticas post-comercialización (Forest Pharmaceuticals, 2003). El tratamiento con memantina a dosis de 5-30 mg/día por vía oral, en pacientes con demencia leve-moderada (alcanzando concentraciones plasmáticas próximas a 1 μ M) no ha revelado efectos secundarios a nivel ocular ni interferencias en la función visual (Kornhuber, 1995).

Hay pocos datos sobre intoxicación o sobredosis de memantina en humanos. La ingesta de más de 400 mg de memantina se ha relacionado con la aparición de inquietud, psicosis, alucinaciones visuales, convulsiones, somnolencia, estupor y coma. No existe un antídoto específico para revertir sus efectos en caso de

sobredosificación, debiendo realizar un tratamiento sintomático en estos casos

(Physicians Desk Referente, 2004).

2.4.- MECANISMO DE ACCIÓN

Memantina es un derivado de la amantadina, perteneciente a la familia de los antagonistas del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato, que actúa como bloqueador del canal iónico asociado a dicho receptor. Existen distintos tipos de receptores del glutamato (tres de ellos son ionotrópicos: los receptores AMPA, los receptores NMDA y los receptores kainato; y un cuarto que es metabotrópico, y que se asocia al sistema del segundo mensajero mediante proteínas de fijación al nucleótido de guanina), siendo los receptores NMDA de tipo ionotrópico, los implicados en el daño glaucomatoso. El receptor NMDA, está constituido por distintas subunidades -2 subunidades NR1 y 2 subunidades NR2- que se disponen formando un complejo receptor-canal iónico. En condiciones fisiológicas el ión Mg^{2+} regula la conductancia del canal iónico Na^+ - Ca^{2+} por un mecanismo voltaje dependiente. De manera que, en condiciones de potencial de membrana en reposo (-), el poro del canal se encuentra bloqueado por la presencia de un ión Mg^{2+} . Cuando el glutamato se une al receptor, induce la despolarización de la célula (potencial de membrana (+)), produciendo un cambio transitorio en la configuración del canal, de manera que el ión Mg^{2+} es desplazado y el canal queda abierto, permitiendo la entrada de Ca^{2+} y Na^+ dentro de la célula (Lipton, 2004).

En condiciones fisiológicas, el glutamato y la glicina (co-agonista del glutamato) se unen al receptor NMDA induciendo un cambio de conformación en el

mismo con liberación del ión Mg^{2+} , que normalmente se encuentra bloqueando el poro del canal, permitiendo la entrada de Ca^{2+} y Na^+ a la célula (Lipton, 2004). En condiciones patológicas de sobreexcitación, el exceso de glutamato en el espacio intersináptico (por sobreproducción o por defecto de recaptación) induce la apertura permanente del canal iónico, con la entrada masiva de Ca^{2+} dentro de la célula (Cheung, 2008). Las altas concentraciones de Ca^{2+} intracelular interferirán en la función mitocondrial, disparando la producción de RLO y la activación de proteasas y fosfolipasas, induciendo la entrada de la célula en apoptosis (fig. 7).

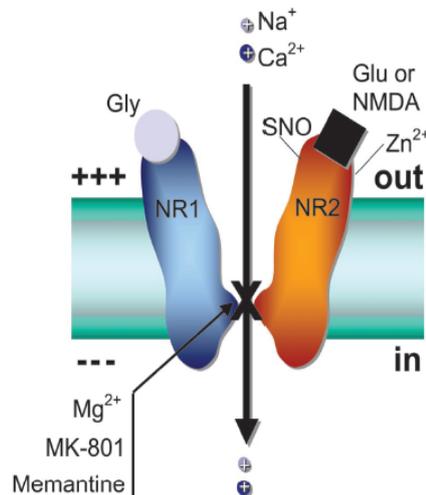


Figura 7: Esquema del receptor-canal NMDA del glutamato, representando el lugar de unión de memantina a dicho receptor y de otros antagonistas NMDA, que coincide con el lugar habitualmente ocupado por el ión Mg^{2+} en el poro del canal. (Reproducido de: Lipton SA. et al. *Failures and Successes of NMDA Receptor Antagonists: Molecular basis for the Use of Open blockers like Memantine in the treatment of Acute and Chronic Neurologic Insults. Journal of the American Society for experimental Neurotherapeutics. 2004; 1: 101-110*).

Memantina es un antagonista de los receptores NMDA de tipo “bloqueador de canal abierto”, ya que se une al canal en el lugar habitualmente ocupado por el ión Mg^{2+} , lugar que no resulta accesible a menos que dicho canal se encuentre abierto, al

haber sido previamente activado por la unión del glutamato al receptor (Chen, 1992). De esta manera, memantina ocupará su lugar en el poro del canal, bloqueando la conductancia del mismo para el Ca^{2+} y Na^+ . La eficacia de memantina en el bloqueo del receptor NMDA, es mayor cuando la célula se encuentra despolarizada (potencial de membrana (+)) y/o cuando los niveles de glutamato en el espacio extracelular son patológicamente elevados, ya que estas condiciones favorecen que el canal iónico permanezca más tiempo abierto y por tanto accesible a la memantina (Lipton, 2004). A diferencia de otros antagonistas NMDA, memantina posee moderada-baja afinidad por el receptor y presenta una rápida cinética de unión al mismo, produciendo un bloqueo reversible del receptor, que además es concentración y voltaje-dependiente (Chen, 1997; Parsons, 1999). En condiciones de potenciales de membrana negativos, memantina produce un bloqueo de los receptores NMDA extrasinápticos 100 veces más potente que el de los receptores NMDA sinápticos, revirtiéndose dicho bloqueo cuando la célula se despolariza (potencial de membrana positivo) (Zhao, 2006).

Estas propiedades hacen que memantina sea eficaz en el bloqueo de la actividad glutamatérgica excesiva, a concentraciones para las cuales no posee ningún efecto sobre la función normal del sistema nervioso, sugiriéndose además, una actuación selectiva de memantina sobre los receptores NMDA extrasinápticos respetando la actividad de los receptores NMDA sinápticos. Por esta razón, memantina, a diferencia de otros antagonistas NMDA de alta afinidad, como el MK801 o la fenciclidina (PCP), es un neuroprotector eficaz y bien tolerado, clínicamente (Lipton, 2004, Chen, 2006).

2.4.1.- Propiedades farmacodinámicas

Manipulaciones experimentales diseñadas para aumentar la actividad de los receptores NMDA del glutamato, se han asociado con un incremento de la actividad tónica de las CGRs y una interferencia en la generación de sus potenciales de acción. En dichas condiciones, la aplicación de memantina ha demostrado capacidad para revertir las corrientes tónicas y la amplitud de los potenciales de acción a niveles normales, siendo las concentraciones de memantina requeridas (10-30 μM) para revertir dicha toxicidad, suficientemente bajas como para no interferir en el procesamiento de la señal visual a nivel retiniano (Zhao, 2006; Hare, 2009).

Estudios experimentales *in vitro* en cultivos de CGRs y neuronas de cortex cerebral de rata incubadas bajo distintas concentraciones de NMDA y memantina, han mostrado que la constante del equilibrio de disociación de memantina de su lugar de unión en el receptor NMDA, es un parámetro voltaje-dependiente, cuyo valor se sitúa entre 1-2 μM para un potencial de membrana en reposo negativo de -60 mV (Chen, 1992).

Memantina actúa como un bloqueador de canal abierto, por un mecanismo no competitivo, de manera que, el grado de bloqueo del receptor, para una concentración fija de memantina, se incrementa proporcionalmente respecto a los niveles de agonista (glutamato/NMDA), siendo suficiente una concentración de 6 μM de memantina para bloquear aproximadamente el 85% de las corrientes inducidas por 200 μM de NMDA, a un potencial de membrana de -60 mV, mientras que para esta misma concentración de memantina serán inhibidas menos del 58% de las corrientes inducidas por concentraciones 5 μM de NMDA (Chen, 1992).

Disponemos de pocos datos sobre las concentraciones de memantina alcanzadas en plasma y/o LCR, tras su administración sistémica por vía oral en humanos. Wesemann en 1980 determina postmortem, las concentraciones plasmáticas de memantina alcanzadas en una paciente con enfermedad de Parkinson que recibía tratamiento con memantina a dosis consideradas terapéuticas (aunque sin especificar el valor de éstas), situando dichas concentraciones entorno a los 0.32 μM . Más tarde, Kornhuber (1995) estudia las concentraciones de memantina alcanzadas en plasma y LCR, tras su administración oral, en pacientes con demencia leve-moderada, situándolas entre los 0.1-1 μM , y encontrando una buena correlación LCR/plasma, siendo en todos los casos las concentraciones en LCR inferiores a las plasmáticas. Sin embargo, Kornhuber no encuentra relaciones significativas entre los niveles de memantina en LCR (que en todos los casos fueron inferiores a 1 μM) y la duración del tratamiento, pero sí entre éstos y la dosis diaria recibida (Kornhuber, 1995).

2.5.- MEMANTINA Y NEUROPROTECCIÓN

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y de la retina (Thoreson, 1999), sin embargo, su presencia en cantidades excesivas en el espacio extracelular, conlleva un daño irreversible a nivel neuronal, hablándose de fenómenos de degeneración neuronal secundarios a una sobreexcitación provocada por la liberación masiva de glutamato. Los efectos neurotóxicos del glutamato, son debidos a la entrada masiva de Ca^{2+} en la célula como consecuencia de la

sobreactivación de los receptores NMDA, con la consiguiente sobreproducción de RLO y activación de mediadores intracelulares pro-apoptóticos (Lipton, 2004).

La *excitotoxicidad del glutamato* se ha identificado como una de las causas más importantes de daño y muerte neuronal, en diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la demencia-SIDA, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica y/o el glaucoma. Fue descrita inicialmente (1957) a nivel de la retina, cuando Lucas y Newhouse, tras la inyección subcutánea de glutamato observaron daño selectivo sobre las células de la capa nuclear interna (CNI) de la retina. Aunque con distinta patogenia, todas estas enfermedades neurodegenerativas comparten como mecanismo último, la degeneración y muerte neuronal por sobreactivación de los receptores NMDA del glutamato (Lipton, 2004).

En condiciones patológicas, de isquemia o traumatismo cerebral, se ha comprobado como la interrupción del metabolismo celular normal, lleva a las neuronas dañadas a liberar cantidades excesivas de glutamato al espacio extracelular, al tiempo que disminuyen los mecanismos de recaptación del mismo. Este exceso de glutamato, actuaría sobre los receptores NMDA-postsinápticos de las neuronas próximas, induciendo la sobreactivación de los mismos y la entrada masiva de Ca^{2+} a la célula. El aumento del Ca^{2+} intracelular, provocaría un aumento en la producción de radicales libres del oxígeno (RLO) y activación de distintos sistemas enzimáticos (caspasas, proteasas y fosfolipasas) y mediadores pro-apoptosis (como la proteína-quinasa MAPK p38), que conducirán finalmente a la muerte y lisis de la célula, con la consiguiente liberación de los depósitos de glutamato intracelulares que a su vez

estimularán los receptores NMDA de las neuronas vecinas; siendo el resultado final, la activación de una cascada de autodestrucción y la propagación del daño neuronal, que podría mantenerse durante horas o incluso días después del cese del daño inicial (Lipton, 2004).

Se sabe que las células ganglionares retinianas expresan receptores NMDA en cantidad variable, y se ha podido comprobar, tanto *in vitro* como *in vivo* (WoldeMussie, 2002; Hare, 2004), como éstas células son especialmente vulnerables a la excitotoxicidad del glutamato, considerada por muchos como uno de los factores implicados en la pérdida de CGRs en el glaucoma (Hare, 2009). Se ha visto como los niveles de glutamato en el espacio extracelular aparecen elevados en situaciones de isquemia retiniana aguda, en la retinopatía diabética y en casos de desprendimiento de retina (Bertram, 2008). También se ha podido comprobar que existe una desregulación en la homeostasis del glutamato en la enfermedad glaucomatosa, habiéndose encontrado concentraciones elevadas de glutamato en el humor vítreo de humanos (Dreyer, 1996) y perros (Brooks, 1997) con glaucoma; así como en ratas (Levkovitch-Verbin, 2002) y en monos con glaucoma inducido experimentalmente (Dreyer, 1996).

Los primeros ensayos con memantina que demostraron la capacidad de esta sustancia para bloquear corrientes NMDA-inducidas, en neuronas de médula espinal de embrión de ratón, fueron realizados por Bormann en el año 1989. Años más tarde, Chen y su equipo (1992) comprobaron en condiciones *in vitro*, como concentraciones de memantina del orden de 6-12 μM eran capaces de frenar el efecto neurotóxico inducido experimentalmente mediante sobreactivación de receptores NMDA, tanto en cultivos de células ganglionares retinianas como de neuronas de

cortex cerebral de rata (Chen, 1992). Los estudios in vivo desarrollados por este grupo, con modelos animales de accidente vascular cerebral en embriones de rata, confirmaron el efecto neuroprotector de memantina frente a la isquemia, a dosis de 10-20 mg/Kg, mostrando una reducción en el tamaño del área infartada del 30% frente al grupo de no tratamiento (Chen, 1997). También se ha demostrado la capacidad de memantina de frenar la pérdida de CGRs en modelos animales de isquemia retiniana aguda (Lagréze, 1998; Osborne, 1999), de isquemia del nervio óptico (Kim, 2002) y en modelos de glaucoma experimental, en ratas (10 mg/Kg/día, vía subcutánea) (Hare, 2001) y en monos (4 mg/Kg/día, vía oral) (Hare, 2004(IyII)), y en ratones transgénicos DBA/2J portadores de una mutación inductora de daño neuronal glaucomatoso (Schuettauf, 2002).

2.5.1.- Usos clínicos

Las enfermedades neurodegenerativas, tanto agudas como crónicas, comparten un mecanismo final de excitotoxicidad provocada por la liberación excesiva de glutamato y otros neurotransmisores excitatorios, que conduce en último término a la degeneración y muerte neuronal. Por ello, en los últimos años buena parte de la investigación farmacológica se ha centrado en la búsqueda de fármacos neuroprotectores capaces de bloquear esta excitotoxicidad.

El efecto neuroprotector de memantina, como antagonista de los receptores NMDA del glutamato, se explica por su capacidad para bloquear la entrada masiva de calcio en la célula, inducida por la sobreexpresión de glutamato en el espacio extrasináptico y la sobreactivación de los receptores NMDA (Parsons, 1999; Lipton, 2004).

Los receptores NMDA se encuentran distribuidos por el SNC en distinta densidad, en el espacio sináptico y extrasináptico, jugando distintos papeles en la regulación de la plasticidad sináptica, el desarrollo neuronal y la excitotoxicidad. Mientras la actividad de los receptores NMDA sinápticos es esencial para el funcionamiento neuronal fisiológico, la sobreactivación de los receptores NMDA extrasinápticos ha sido identificada como uno de los factores implicados en la degeneración y muerte neuronal, en distintas enfermedades neurodegenerativas (Hardingham, 2002; Lipton, 2004).

Se han llevado a cabo varios ensayos clínicos para estudiar la eficacia de memantina en el tratamiento de la demencia tipo Alzheimer (Reisberg, 2003), la demencia vascular (Orgogozo, 2002), la demencia SIDA, la enfermedad de Parkinson (Rabey, 1992), la epilepsia y/o el dolor neuropático (Chen, 2009); algunos de los cuales se encuentran aún sin publicar. Aunque hay varias razones para pensar en la positividad de los resultados, solamente se ha probado la utilidad de memantina en ensayos clínicos en fase III, en la enfermedad de Alzheimer (Reisberg, 2003) y en la demencia de tipo vascular (Orgogozo, 2002).

Memantina fue comercializada en 1982 para el tratamiento de los parkinsonismos que cursaban con espasticidad y disfunción cognitiva, y en 2003 fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento sintomático de pacientes con enfermedad de Alzheimer moderada-severa, en los que ha demostrado una mejoría de la función cognitiva (mejorando la memoria, el aprendizaje y la comprensión), tras su administración en monoterapia o en combinación con otros fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (Reisberg, 2003). Se ha propuesto la utilidad de memantina en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Parkinson, en base a su capacidad para bloquear la excitotoxicidad

mediada por el glutamato a nivel del núcleo subtalámico y del núcleo estriado (Rabey, 1992), aunque su relevancia y aplicabilidad clínica, se encuentran todavía en estudio, durante años ha sido utilizada en Estados Unidos y en Europa para el tratamiento de ésta enfermedad.

La publicación de una revisión sistemática llevada a cabo por The Cochrane Dementia Group, ha permitido concluir que memantina es un fármaco seguro y eficaz en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Alzheimer moderada-grave, demencia vascular leve-moderada y demencias de tipo mixto, en los que consigue retrasar el deterioro cognitivo y funcional (Areosa Sastre, 2003).

Existen dos ensayos clínicos fase III, aleatorizados, doble ciego, controlados con placebo, sobre la eficacia de memantina por vía oral en pacientes con GAA (NCT00141882; NCT00168350). Los resultados del primer ensayo no han sido publicados como tal, pero en dos artículos de revisión en los que se hace referencia al mismo, se ha sugerido el efecto beneficioso del tratamiento con memantina frente al placebo sobre la progresión en la pérdida de campo visual (Cheung, 2008; Levin, 2008). Los resultados del segundo ensayo fueron publicados por los Laboratorios Allergan, estableciendo que los casos de progresión de la enfermedad, evaluados mediante perimetría automatizada, fueron significativamente menores en el grupo de pacientes que recibieron memantina a altas dosis frente a los que recibieron dosis bajas, pero no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo placebo (Cheung, 2008).

No obstante, la interpretación y comparación de los resultados de los ensayos sobre neuroprotección en el glaucoma debe hacerse de forma cuidadosa, ya que existen importantes diferencias en el diseño de los estudios en cuanto a los tiempos

de seguimiento de los grupos, así como en la definición de las variables y medidas de resultado utilizadas en cada uno de ellos (McKinnon, 2008; Danesh-Meyer, 2009).

3.- FARMACOCINÉTICA

3.1.- FARMACOCINÉTICA GENERAL. ANÁLISIS COMPARTIMENTAL

La farmacocinética es la parte de la farmacología que estudia la evolución temporal de la concentración de un fármaco en el organismo. La administración de un fármaco, en una determinada forma farmacéutica, a un organismo vivo, implica el paso de dicha sustancia por una serie de procesos cinéticos: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (Doménech-Berrozpe, 1997); existiendo una interdependencia entre dichos procesos. La vía de administración, la forma farmacéutica y las características físico-químicas del propio fármaco, son determinantes en dichos procesos cinéticos. El estudio del esquema LADME para un determinado fármaco puede llevarse a cabo tanto en animales de experimentación como en humanos, si bien, los estudios en animales ofrecen mayores posibilidades en cuanto a la obtención de muestras.

Debemos tener en cuenta que la acción farmacológica de una sustancia viene condicionada por la cantidad de fármaco que es capaz de alcanzar el tejido diana, y desgraciadamente, muchas veces no es posible medir de forma directa esta cantidad. Por ello, desde que Marshall y Shannon lo propusieran, se acepta que existe una relación entre la *acción farmacológica/efecto* de una sustancia y sus concentraciones

a nivel de plasma. Los estudios farmacocinéticos se basan, por tanto, en la determinación y representación gráfica de las concentraciones del fármaco en plasma u otros fluidos/tejidos biológicos, obtenidos tras su administración.

Los seres vivos constituyen sistemas complejos, en los que resulta difícil establecer relaciones cuantitativas entre la dosis de fármaco administrada, la vía de administración, la concentración del fármaco en los distintos tejidos y el tiempo transcurrido. Por lo que, para describir la evolución en el tiempo, de los niveles de fármaco administrado, en el organismo, se recurre a *modelos farmacocinéticos*, en los que mediante ecuaciones matemáticas se relacionan las velocidades de los procesos de absorción, distribución y eliminación.

Los *modelos farmacocinéticos compartimentales* son los más utilizados. En este sentido, el concepto de compartimento es un concepto cinético y no anatómico, que engloba a todas aquellas zonas del organismo con propiedades cinéticas semejantes, y en las que se supone una distribución uniforme del fármaco (Doménech Berrozpe, 1997). Un compartimento estará definido, por tanto, por sectores acuosos con un volumen determinado (V_d), que contienen una determinada cantidad de fármaco (Q), de manera que la concentración del fármaco en dicho compartimento (C) vendrá dada por el cociente entre la cantidad de fármaco y el volumen de distribución del mismo: $C = Q/V_d$. Las cinéticas de entrada y salida del fármaco, en un compartimento determinado, pueden responder a una cinética de primer orden, a una cinética de orden cero o a una cinética de Michaelis-Menten. El organismo vivo es muy complejo y teóricamente podría dividirse en gran número de compartimentos, sin embargo, ello llevaría a expresiones matemáticas del modelo muy complejas. Por ello, en la práctica se tiende a simplificar y a considerar al organismo constituido por

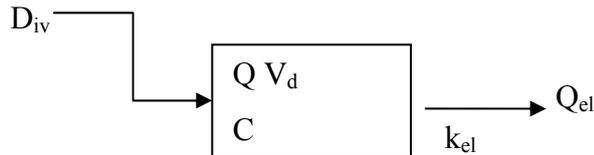
el menor número de compartimentos posibles que permitan una adecuada descripción del comportamiento cinético de la sustancia (Doménech Berrozpe, 1997).

A la hora de elaborar un modelo farmacocinético, lo primero es plantear si se trata de un modelo cinético lineal o no lineal. Aquellos casos en los que existe una proporcionalidad directa entre la concentración del fármaco en los distintos compartimentos y sus velocidades de transferencia, se consideran *modelos lineales*, y en ellos, los procesos cinéticos responderán a una cinética de primer orden, y los valores de los parámetros farmacocinéticos no variarán al variar la dosis administrada. De esta manera, la concentración del fármaco a un determinado tiempo, es directamente proporcional a la dosis administrada, y el área bajo la curva concentración-tiempo (AUC) es función lineal de la dosis administrada. Por otra parte, hablamos de *modelos no lineales* en aquellos casos en los que, al variar la dosis se modifica el valor de uno o más de los parámetros farmacocinéticos. En estos casos la concentración del fármaco a un determinado tiempo no es directamente proporcional a la dosis administrada. Son situaciones en las que los procesos de absorción, distribución y eliminación no responden a una cinética de primer orden, sino que son procesos saturables, con cinética de Michaelis-Menten.

Dentro de la farmacocinética compartimental lineal, pueden establecerse dos modelos cinéticos fundamentales: el monocompartimental y el bicompartimental.

El *modelo cinético monocompartimental* es el más sencillo, y en él se representa al organismo o a la fracción del mismo a la que es capaz de acceder el fármaco, como un compartimento único. Según este modelo existiría una

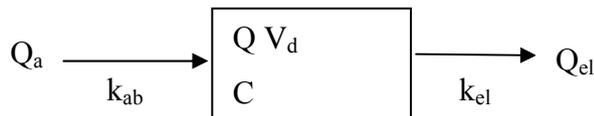
distribución instantánea y uniforme del fármaco tras su administración, con una eliminación del mismo desde tiempo cero, según un proceso cinético de primer orden. La representación esquemática y la ecuación del modelo, suponiendo una administración intravenosa rápida en dosis única, serán las siguientes:



Donde K_{el} es la *constante de eliminación* del fármaco.

$$\frac{dQ}{dt} = -k_{el} \cdot Q$$

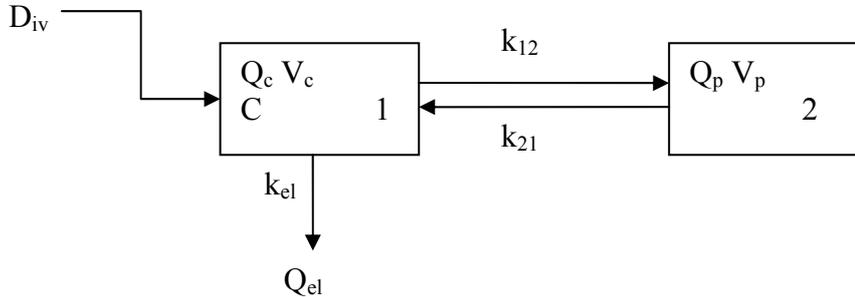
Suponiendo una administración extravasal, deberá considerarse en el modelo el proceso de absorción del fármaco, que tendrá lugar también según una cinética de primer orden, y estará regido por una *constante de absorción* (K_{ab}):



$$\frac{dQ}{dt} = k_{ab} \cdot Q_a - k_{el} \cdot Q$$

Dada la complejidad anatómo-fisiológica de los organismos vivos, en el modelo monocompartimental se simplifica al máximo la evolución temporal del fármaco en el organismo, pero en la práctica, casi ningún fármaco presenta una distribución instantánea y uniforme tras su administración. Para describir el comportamiento cinético de la mayoría de los fármacos suele ser necesario un

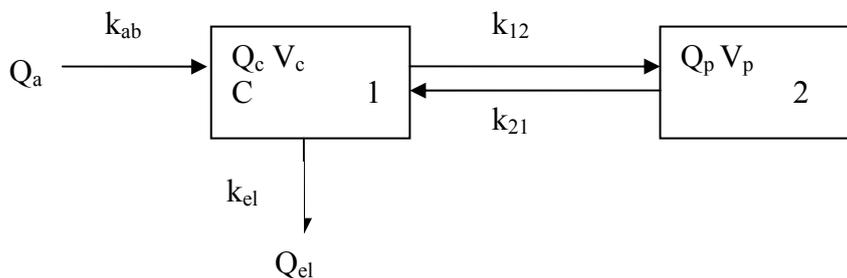
modelo algo más complejo que el monocompartimental. En este sentido, el *modelo bicompartimental* asume el hecho de que la distribución del fármaco tras su administración no es instantánea y que aquellos tejidos con un mayor aporte sanguíneo, alcanzarán más rápidamente el equilibrio en la distribución que aquellos con un menor aporte sanguíneo relativo. De acuerdo con esto, se podrán distinguir dos compartimentos en este modelo, un *compartimento central* que representa aquellos tejidos en los que el equilibrio en la distribución se alcanza rápidamente (pudiendo considerarse una distribución casi instantánea) y un *compartimento periférico*, representado por aquellos tejidos en los que tarda más tiempo en alcanzarse el equilibrio (Doménech-Berrozpe, 1997). El esquema de este modelo, si consideramos una administración endovenosa, será el siguiente:



Donde K_{12} es la *constante de distribución o transferencia* del fármaco desde el compartimento central (1) al compartimento periférico (2), y K_{21} la *constante de retorno* desde el compartimento periférico al central. La ecuación del modelo que describe las variaciones en la cantidad de fármaco en el compartimento central respecto al tiempo será la siguiente:

$$\frac{dQ_c}{dt} = k_{21} \cdot Q_p - k_{12} \cdot Q_c - k_{el} \cdot Q_c$$

Si suponemos una administración extravasal del fármaco, entonces el modelo y su ecuación serán las siguientes (considerando un proceso de absorción de primer orden):



$$\frac{dQ_c}{dt} = k_{ab} \cdot Q_a + k_{21} \cdot Q_p - k_{12} \cdot Q_c - k_{el} \cdot Q_c$$

El interés del modelo monocompartimental reside en el hecho de que un modelo tan simple permite comprender más fácilmente el concepto, los parámetros y las constantes farmacocinéticas utilizadas en modelos compartimentales más complejos. El modelo monocompartimental tiene por tanto un interés didáctico. Además, hay que tener en cuenta, que ningún modelo farmacocinético compartimental, por complejo que sea, es capaz de cuantificar de forma absoluta la evolución temporal del fármaco en los distintos tejidos tras su administración.

Suponiendo un fármaco de comportamiento lineal monocompartimental, se puede considerar que la cantidad de fármaco existente en el organismo a un tiempo dado (Q) vendrá dado por la siguiente ecuación:

$$Q = Q_0 \cdot e^{-kel \cdot t}$$

Y si consideramos una administración endovenosa en dosis única, entonces la cantidad de fármaco en el organismo a tiempo 0 (Q_0) será igual a la dosis administrada (D), y entonces, la ecuación anterior podría escribirse como:

$$Q = D \cdot e^{-kel \cdot t}$$

En el modelo monocompartimental, la concentración del fármaco en el organismo (C), para cualquier tiempo, se puede conocer a partir del cociente entre la cantidad de fármaco en ese instante (Q), y el volumen acuoso en el que se encuentra distribuido (V_d):

$$C = \left(\frac{D}{V_d} \right) \cdot e^{-kel \cdot t}$$

Respecto a las consideraciones generales sobre el modelo monocompartimental, en relación a la significación de sus principales parámetros cinéticos, podemos decir en primer lugar, que al aumentar la dosis administrada (D), aumenta proporcionalmente el valor de C_0 , pero no se modifica el valor de la constante de velocidad de eliminación (K_{el}), es decir, si consideramos una representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones respecto al tiempo, se obtendrán rectas paralelas con la misma pendiente. En segundo lugar, el volumen de distribución (V_d) representa el volumen acuoso del organismo en el cual es capaz de

distribuirse el fármaco, y la sangre se considera una parte alícuota del mismo. En tercer lugar, cuanto menor es el valor de la semivida biológica ($T_{1/2}$) mayor es la pendiente de la curva concentración-tiempo, ya que la semivida es inversamente proporcional a la constante de eliminación (K_{el}). Finalmente, en este tipo de modelo cinético, si se asume un volumen de distribución (V_d) constante, entonces a mayor aclaramiento (C_L) mayor será la pendiente de la curva y por tanto, el valor de la constante de eliminación (K_{el}).

En el modelo bicompartimental por su parte, se asume que existe un desfase en la distribución del fármaco en el organismo tras su administración. Se considera que el organismo o la parte de él a la que es capaz de acceder el fármaco, está constituido por dos compartimentos intercomunicados, uno central (1), de fácil acceso, y otro periférico (2), al que tarda más en llegar el medicamento. En el tratamiento cinético en este tipo de modelos, hay que tener en cuenta una serie de consideraciones aparte, respecto al modelo monocompartimental. En primer lugar, que tras la administración intravenosa, el fármaco se distribuye instantáneamente en el compartimento central, desde el cual pasa al compartimento periférico, de acuerdo con un proceso cinético de primer orden, regido por una constante denominada constante de transferencia (K_{12}); y al mismo tiempo, el fármaco retorna desde el compartimento periférico al compartimento central, también de acuerdo a una cinética de orden uno, regida por la constante de redistribución o retorno (K_{21}). En segundo lugar, la eliminación del fármaco se produce fundamentalmente desde el compartimento central, de acuerdo con una cinética de primer orden, estando regido dicho proceso por la constante de eliminación (K_{el}). Se considera por tanto, que en el

modelo bicompartimental, tras la administración, el fármaco desaparece del compartimento central por dos mecanismos, el de eliminación (K_{el}) y el de transferencia o distribución al compartimento periférico (K_{12}), a los que se denomina en conjunto, proceso de *disposición* (Doménech Berrozpe, 1997). En tercer lugar, la gráfica que se obtiene de la representación de las concentraciones respecto al tiempo en el modelo bicompartimental, presenta un tramo inicial-curvo, seguido de una fracción terminal-recta. La *fracción inicial-curva* de la gráfica corresponde a los procesos de eliminación y distribución del fármaco tras su administración, pero una vez alcanzado el *equilibrio de distribución*, momento en el que se igualan los procesos de distribución y retorno, prácticamente sólo se produce la eliminación del fármaco, correspondiendo ésta a la *fracción terminal-recta* de la gráfica. La gráfica concentración-tiempo es representativa del tránsito del fármaco en el compartimento central, que viene definida por una ecuación matemática bi-exponencial, del tipo:

$$A = A_0 \cdot e^{-\alpha t} + B_0 \cdot e^{-\beta t}$$

Donde α y β se denominan *macroconstantes -rápida y lenta- de disposición*, respectivamente, asumiendo que α rige mayoritariamente el proceso inicial de distribución y en menor grado el proceso de eliminación, y que β rige el proceso de eliminación fundamentalmente y en menor medida el proceso de distribución; por esa razón, a ambas constantes se las conoce también como *constantes híbridas*. Finalmente, debemos tener cuenta que en el modelo bicompartimental se consideran dos volúmenes de distribución, el del compartimento central (V_1) y el del

compartimento periférico (V_2), cuya suma representa el volumen de distribución total del fármaco en el organismo (V_d); tratándose en todos los casos de volúmenes aparentes, no reales.

Aunque se pueden emplear modelos cinéticos más complejos, en la práctica, el modelo bicompartimental permite la adecuada descripción del comportamiento cinético de la mayoría de los fármacos utilizados.

La FDA la define la *biodisponibilidad* como “la velocidad y cantidad, a la cual un fármaco es absorbido a partir de la dosificación que lo contiene y se hace disponible en su lugar de acción”. De ello se deduce, que el concepto de biodisponibilidad hace referencia al acceso y permanencia del fármaco en la biofase. En general, para que un fármaco pueda absorberse debe liberarse de la forma farmacéutica que lo contiene, disolverse en el lugar anatómico de la administración y acceder por difusión al lugar de absorción. La biodisponibilidad es un parámetro biofarmacéutico que cuantifica la disponibilidad fisiológica de un determinado fármaco o principio activo, y depende de factores inherentes a la propia sustancia (propiedades físico-químicas y características farmacocinéticas del principio activo) y a la forma de dosificación que lo contiene, y de las características del sustrato biológico al que va destinado.

Desde el punto de vista de la farmacología ocular, Baños (1994) establece la importancia del concepto de biodisponibilidad en los preparados oftálmicos, haciendo referencia a la capacidad de penetración del fármaco a través de las distintas estructuras oculares, para aquellas drogas cuyo lugar de acción se sitúa en el interior del globo ocular, estableciendo además, su relevancia en aspectos

relacionados con la rapidez y eficacia de la acción farmacológica. De manera que, la biodisponibilidad ocular depende, entre otros aspectos, de la velocidad de absorción y del tiempo de eliminación del fármaco, y sobre ella podrán influir distintos factores de tipo fisiológico como el parpadeo, el drenaje lagrimal o las características de los tejidos a penetrar; y factores relacionados con las propiedades físico-químicas del fármaco y de la formulación que lo contiene, como el coeficiente de reparto o partición, las características del excipiente, el pH de la formulación, el pKa de la sustancia y/o el tiempo de contacto de la sustancia con la superficie de absorción, entre otros. Por tanto, la biodisponibilidad ocular de una sustancia será distinta si se estudia en condiciones fisiológicas o de enfermedad (Doménech-Berrozpe, 1998).

3.2.- FARMACOCINÉTICA OCULAR

3.2.1.- Anatomía del globo ocular

El globo ocular se encuentra protegido por los párpados, por la grasa y la estructura ósea de la órbita, y su superficie es continuamente lavada por la película lagrimal.

Desde el punto de vista farmacocinético, a nivel ocular hay que distinguir dos grandes compartimentos: el *segmento anterior*, que constituye el tercio anterior del globo ocular, formado por la córnea, el humor acuoso, el iris, la pupila, el cuerpo ciliar y el cristalino; y el *segmento posterior*, que constituye los dos tercios posteriores del ojo, y que incluye el humor vítreo, la retina, la esclera, la coroides y el nervio óptico (fig. 8).

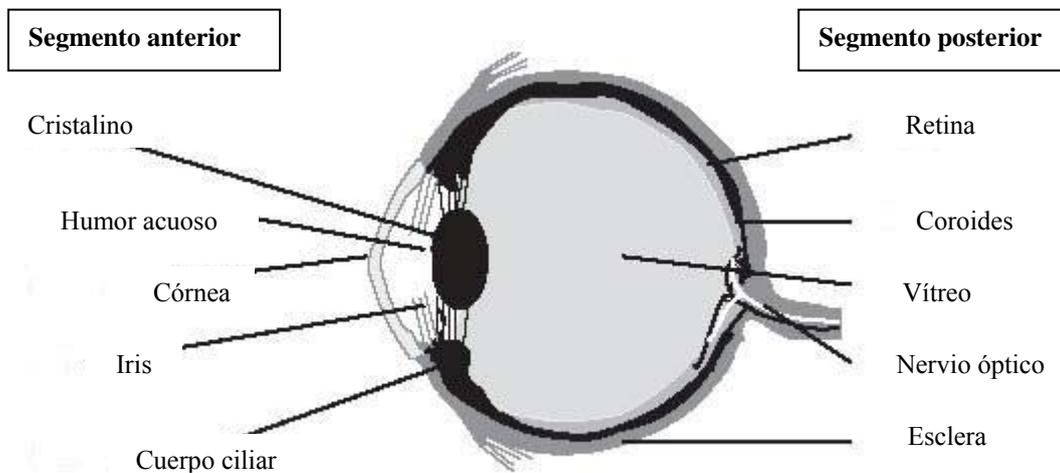


Figura 8: Esquema anatómico: corte sagital del globo ocular. (Traducido de: Loftsson T. et al. *Topical drug delivery to the posterior segment of the eye: anatomical and physiological considerations*. *Pharmazie*. 2008; 63: 171-179).

La *córnea* es una biomembrana transparente constituida por 5 capas: epitelio, membrana de Bowman, estroma (que representa aproximadamente el 90% del grosor de la cornea), membrana de Descemet y endotelio (fig. 9); y constituye una importante barrera para la penetración de fármacos dentro del ojo, dada su alta permeabilidad selectiva. Su espesor en el hombre, es de aproximadamente 0.52 mm en su parte central, existiendo un aumento gradual del grosor en las proximidades del limbo esclero-corneal.

El epitelio corneal es un epitelio poliestratificado, constituido por varias capas de células epiteliales (3-6 capas) con fuertes uniones intercelulares, y es el principal condicionante de la permeabilidad corneal. Posee un carácter lipofílico, lo que le hace altamente permeable para moléculas liposolubles. Los fármacos administrados por vía tópica pueden penetrar a través del epitelio corneal por dos vías: transcelular

o paracelular. La vía transcelular es la empleada por moléculas lipofílicas, mientras que la vía paracelular es la empleada por moléculas hidrofílicas y pequeños iones. La penetración de moléculas por vía paracelular, se hace a través de los poros delimitados por las células epiteliales (poros intercelulares), y estará limitada por el tamaño de la molécula. Se estima un tamaño de poro de entre 1 y 5nm de diámetro, lo que limita el paso por esta vía a moléculas con un Pm menor de 700 Da (Lofsson, 2008). Se cree que la mayoría de las sustancias penetran a través del epitelio corneal por difusión pasiva, a favor de gradiente de concentración, y aunque se han identificado distintos transportadores de membrana y bombas de flujo, en la superficie de las células del epitelio corneal, el papel de éstos en la penetración ocular de fármacos está siendo todavía estudiado. El estroma corneal está constituido por fibras de colágeno embebidas en una matriz de glicosaminoglicanos. A diferencia del epitelio, el estroma es de naturaleza hidrofílica y presenta una baja resistencia a la penetración de sustancias hidrosolubles, constituyendo una barrera relativa para el paso de moléculas lipofílicas que han atravesado fácilmente el epitelio corneal (Ghate, 2006). Por su parte, el endotelio corneal está constituido por una capa única de células endoteliales, con fuertes uniones intercelulares, que al igual que el epitelio posee carácter lipofílico, ofreciendo resistencia al paso de sustancias hidrofílicas (Ghate, 2006). Desde el punto de vista de la penetración ocular de fármacos, la membrana de Bowman y la membrana de Descemet no constituyen un factor limitante de la permeabilidad corneal. El hecho de que la córnea se comporte como una barrera bifásica, evidencia la importancia del balance hidrofilia-lipofilia de las moléculas administradas por vía tópica.

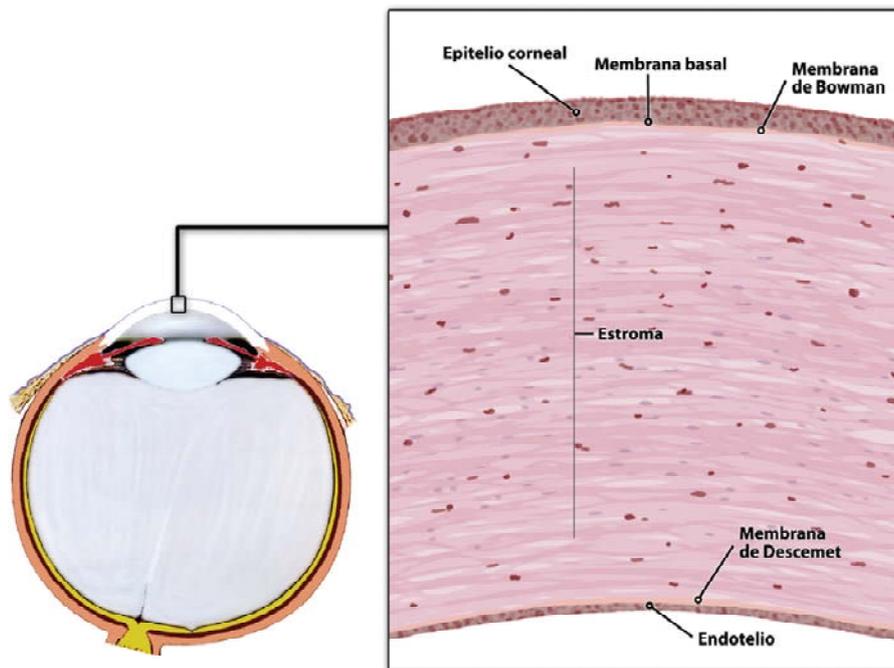


Figura 9: Esquema de un corte histológico de la córnea en el que se representan sus 5 capas. (Reproducido de: *Fernández A. et al. Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques. An Sist Sanit Navar. 2008; 31(1): 53-69.*)

La *conjuntiva* es una membrana mucosa, transparente, que cubre toda la superficie de la esclera (*conjuntiva bulbar*) y que se extiende revistiendo la cara interna de los párpados (*conjuntiva tarsal*). En la conjuntiva bulbar encontramos células caliciformes secretoras de mucina, un importante componente de la película lagrimal (capa mucosa). La conjuntiva es aproximadamente 15-25 veces más permeable que la cornea, presentando una porosidad (densidad de poros intercelulares en su superficie) muy superior a la del epitelio corneal (Loftsson, 2008), lo que se traduce en una importante y rápida absorción conjuntival de las sustancias administradas por vía tópica oftálmica.

La *esclera* es la capa del ojo que se sitúa por debajo de la conjuntiva. A simple vista, la esclera parece un tejido relativamente uniforme, compuesto por colágeno tipo I (componente mayoritario, 75% del peso seco), fibras elásticas y fibroblastos. La matriz extracelular de la esclera está compuesta fundamentalmente por proteoglicanos, que le confieren un aspecto de gel amorfo. Se piensa que estos proteoglicanos son los responsables de la difusión directa de las sustancias hidrofílicas a través de la esclera (Geroski, 2001; Ambati, 2002; Yasukawa, 2004). Se desconoce el papel real del colágeno, pero se cree que la distribución de sus fibras en haces paralelos, dejando espacios libres acuosos entre ellos, proporciona zonas de baja resistencia para la difusión de sustancias a su través, frente a la alta resistencia de la matriz de proteoglicanos. La penetración de fármacos a través de la esclera se produce principalmente por difusión pasiva, y está condicionada por el tamaño y peso molecular de la sustancia (Ambati, 2002); presentando una permeabilidad casi 10 veces superior a la de la córnea (Raghava, 2004). Las experiencias desarrolladas por Kim empleando imágenes de resonancia magnética sugieren que la región pars plana es la zona de mayor permeabilidad de la esclera (Kim, 2004).

El *epitelio pigmentario de la retina* (EPR) a diferencia de la esclera, está compuesto por una monocapa de células con estrechas uniones intercelulares, que actúa a modo de barrera entre las capas más externas de la retina neurosensorial y la coroides, controlando el paso de nutrientes, de residuos del metabolismo celular y de agua a la retina. El paso de solutos a través de esta barrera puede ocurrir por difusión pasiva (transporte para- o transcelular) o por transporte activo-facilitado mediante proteínas transportadoras de membrana. En la última década, se han identificado

numerosos transportadores de nutrientes (para el paso vitaminas, aminoácidos, glucosa e iones, a través de las membranas celulares) en la superficie de las células epiteliales de la conjuntiva y del EPR, que podrían ser aprovechados para el co-transporte activo de fármacos, mejorando la penetración de éstos, especialmente en el caso de moléculas polares (Gaudana, 2009). De todos los transportadores de membrana identificados hasta el momento, solamente unos pocos han resultado útiles como sistemas de liberación de fármacos. Entre ellos, se han propuesto los sistemas de transporte de aminoácidos (como el ATB⁰⁺ en la córnea), de péptidos, de nucleósidos y de cationes orgánicos, como los más efectivos (Gaudana, 2010).

La *coroides* es una capa vascular, situada entre la esclera y la retina, responsable de la nutrición del segmento posterior del ojo. Posee las propiedades del tejido conectivo, pero se diferencia de la esclera, en su mayor componente celular y en la presencia de pigmento melánico, que actúan incrementando la retención de solutos, especialmente de los de tipo catiónico y liposolubles (Cheruvu, 2006). Amrite establece un importante efecto barrera de la coroides en condiciones “in vivo”, al ser un tejido altamente perfundido, lo que contribuye al rápido aclaramiento de las sustancias que han conseguido atravesar la esclera, eliminándolas desde el espacio supracoroideo a la circulación sistémica antes de que éstas puedan difundir a los tejidos profundos (Amrite, 2008).

El *humor vítreo* (HV) es un gel transparente que contiene un 99% de agua. Está constituido por una matriz de fibras de colágeno que se organizan formando una red fibrilar, en la que se encuentran embebidas moléculas de hialuronato, que dan

estabilidad a la misma y le confieren avidez por el agua. El volumen de HV en el ojo humano es de 4 mL, mientras que en el conejo es de 1.4 mL (Cheng, 1999).

El *humor acuoso* (HA) rellena la cámara anterior del ojo y su volumen total en el ojo humano es de 300 μ L, y de 200 μ L en el ojo del conejo (Lofsson, 2008). Es un fluido de baja viscosidad, con una composición química similar a la del plasma sanguíneo, y es continuamente secretado por los procesos ciliares del iris. El HA es responsable del aporte de nutrientes a los tejidos avasculares del ojo, como la córnea y el cristalino, además de contribuir al mantenimiento del tono y la forma del globo ocular.

3.2.2.- Vías de administración en oftalmología

En los últimos años, se han producido importantes avances en el tratamiento de las enfermedades oculares del segmento posterior, en el campo de la farmacología experimental, que han visto obstaculizada su aplicabilidad clínica por limitaciones en la dosificación y biodisponibilidad ocular (Ranta, 2006). Es evidente, que para que un fármaco eficaz *in vitro*, lo sea también *in vivo*, deberá llegar en cantidad suficiente al tejido diana. En este sentido, el tratamiento de las enfermedades del segmento posterior requiere la consecución de altas concentraciones del fármaco en vítreo, de manera que la aplicabilidad clínica de dichas medicaciones pasa por desarrollar vías de administración que permitan superar las barreras anatómicas del ojo, facilitando su penetración, y representa en el momento actual, el principal reto de la

oftalmología, ya que estas patologías son una causa importante de ceguera en millones de personas en todo el mundo.

Existen cuatro vías de administración encaminadas a la consecución de concentraciones eficaces del fármaco en el segmento posterior del ojo: la vía tópica, la sistémica, la intravítrea y la periocular.

La *vía tópica* ha sido la preferida para la administración de fármacos en oftalmología, dada la simplicidad de la técnica y su bajo coste económico. Más del 90% de las formulaciones oftálmicas comercializadas existen en forma de gotas para uso tópico, pero éstas son consideradas ineficaces para el tratamiento de las enfermedades del segmento posterior. Cuando un fármaco es administrado por vía tópica en el ojo (en forma de gotas, suspensiones o pomadas), se estimulan distintos mecanismos como el lagrimeo, el parpadeo, la dilución y el recambio de la película lagrimal, que contribuyen al aclaramiento y/o lavado de la sustancia de la superficie ocular, de manera que la cantidad de fármaco susceptible de atravesar la córnea es muy inferior a la dosis administrada (Urtti, 2006). Se estima que menos de un 5% de la dosis total administrada por vía tópica ocular llega al humor acuoso (Herrero-Vanrell, 2007). La penetración ocular de los fármacos administrados por vía tópica, puede suceder por dos vías: corneal y no corneal, englobando esta última, el paso de la sustancia a través de conjuntiva y esclera (Hughes, 2005) (fig. 10). La preferencia por una u otra vía de penetración dependerá de las propiedades físico-químicas de la sustancia (Gaudana, 2009). La vía corneal es la mayoritaria, y supone paso de la sustancia a través de la córnea (vía transcelular o paracelular) al HA, desde donde se distribuye a los distintos tejidos intraoculares. Una vez que la sustancia ha alcanzado el humor

acuoso, podrá difundir hacia el vítreo y resto de tejidos intraoculares, a favor de gradiente de concentración. Sin embargo, el gradiente de concentración creado tras la administración tópica es débil y transitorio, ya que la concentración de la sustancia en el humor acuoso cae rápidamente, en base a los mecanismos de “turn over” y drenaje del acuoso (Geroski, 2000).

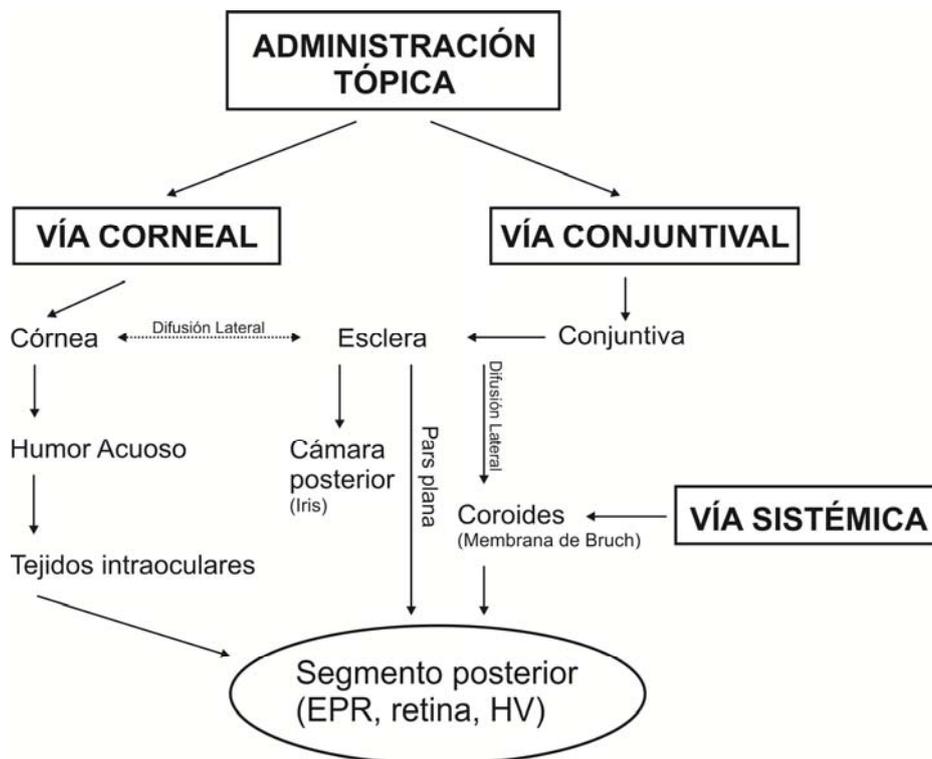


Figura 10: Vías de absorción de fármacos administrados por vía tópica. (Traducido de: Hughes PM. et al. *Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. Adv Drug Deliv Rev. 2005; 57(14): 2010-2032*).

Si se recurre a la administración por *vía sistémica*, las dosis necesarias para alcanzar niveles terapéuticos en el segmento posterior del ojo son muy altas, lo que supone un mayor riesgo de generar efectos adversos no deseados a nivel sistémico (Geroski, 2001). Tras la administración sistémica, la barrera hemato-acuosa (BHA), (constituida por el endotelio de los vasos sanguíneos del iris y del cuerpo ciliar, y por

el epitelio no pigmentado de los procesos ciliares) y la barrera hemato-retiana (BHR) (constituida por el endotelio de los capilares retinianos (BHR-interna) y por la banda del epitelio pigmentario retiniano (BHR-externa)) limitan la penetración de fármacos en el segmento anterior y posterior del ojo respectivamente. Las sustancias administradas por vía sistémica -oral o endovenosa- alcanzan y se distribuyen fácilmente por la coroides, debido a la gran vascularización de esta capa y al carácter fenestrado de los capilares coroideos, pero el EPR constituye una barrera altamente selectiva que restringe el paso de las mismas a la retina neurosensorial. Solamente del 1 al 2% de la dosis total administrada por vía sistémica alcanza el compartimento vítreo (Gaudana, 2010).

Frente a la vía sistémica, el depósito directo del fármaco en el compartimento posterior del ojo mediante *inyección intravítrea*, constituye una alternativa útil, ya que desde el primer momento, se consiguen concentraciones eficaces del principio activo en humor vítreo con mínimos efectos secundarios a nivel sistémico (Herrero-Vanrell, 2007). Así, la administración intravítrea, ha adquirido popularidad en los últimos años gracias a la aplicación de los fármacos anti-VEGF en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) de tipo exudativo. Sin embargo, las inyecciones intravítreas constituyen un método invasivo, no exento de riesgos a nivel ocular, como la formación de cataratas, desprendimientos de retina, hemorragias vítreas, endoftalmitis y/o elevación de la presión intraocular (Raghava, 2004). Otro inconveniente de la vía intravítrea, es que la administración del fármaco se realiza en forma de bolo, lo que resulta ineficaz en el tratamiento de enfermedades crónicas como el glaucoma, siendo necesarias inyecciones repetidas para lograr

concentraciones mantenidas del principio activo en vítreo, que no siempre son bien toleradas por el paciente (Ruiz-Moreno, 2007).

En estos momentos, la dosificación de medicamentos al segmento posterior del ojo está demandando la búsqueda de vías de administración menos lesivas. En este sentido, la *vía periocular* presenta una serie de ventajas frente a las otras vías. A diferencia de la vía sistémica, permite alcanzar altas concentraciones del fármaco en vítreo, ya que la esclera al ser un tejido fibroso, ofrece menor resistencia que las barreras hemato-acuosa y hemato-retiniana, a la penetración de las sustancias (Raghava, 2004), siendo permeable incluso a moléculas de gran tamaño (con un Pm de más de 70 KDa) (Ambati, 2000). Además, la vía periocular proporciona un espacio virtual donde “almacenar” el principio activo, a modo de depot, para su liberación progresiva (Raghava, 2004). Dentro de la vía periocular podemos diferenciar distintas modalidades de inyección, según criterios anatómicos: peribulbar, retrobulbar, yuxtaescleral posterior, subtenon (anterior y posterior) y subconjuntival (fig. 11) (Gaudana, 2009).

Estudios farmacocinéticos con fluoresceína sódica en conejos, han mostrado como tras la administración subtenon posterior (STP) se alcanzan concentraciones más altas y sostenidas en vítreo que tras la inyección retrobulbar o subconjuntival, con una menor absorción sistémica de la sustancia y menor riesgo de efectos secundarios, ya que teóricamente, la administración STP permite el emplazamiento de la sustancia cerca de la esclera y relativamente más alejada de la circulación orbitaria (Ghate, 2007). Además las inyecciones perioculares han mostrado mayor confort y tolerancia para el paciente respecto a las inyecciones intravítreas (Raghava, 2004).

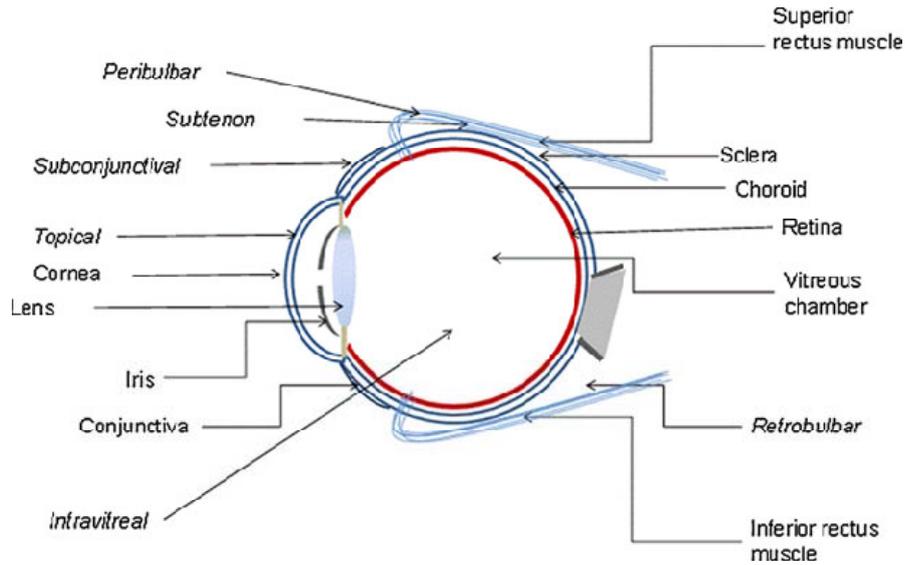


Figura 11: Esquema que ilustra la anatomía y distintas modalidades de administración periocular (Reproducido de: *Gaudana R. et al. Ocular drug delivery. AAPS J. 2010; 12(3): 348-360. Review*).

La administración periocular supone el emplazamiento de la sustancia o de la formulación que la contiene, en el espacio periocular, desde el cual el fármaco puede penetrar en vítreo por una de las siguientes vías: vía hemática, vía transescleral o través de la cámara anterior del ojo (fig. 12).

Penetración a través de la *cámara anterior*: la sustancia administrada periocularmente podrá penetrar en la cámara anterior del ojo, bien directamente, difundiendo a través de la esclera y del cuerpo ciliar y secretándose con el humor acuoso; o indirectamente, por reflujo a través de la conjuntiva y dilución en la película lagrimal, penetrando a través de la córnea. Desde la cámara anterior el fármaco puede difundir a la cámara posterior, y desde allí al humor vítreo superando la barrera del cristalino a través de la zónula.

Penetración por *vía hemática*: la sustancia administrada periocularmente es absorbida a nivel de los vasos sanguíneos conjuntivales, episclerales, coroideos, pasando a la circulación sistémica y retornando a los tejidos intraoculares con el flujo sanguíneo retiniano.

Penetración directa *vía transescleral*: supone la absorción directa de la sustancia administrada, debiendo atravesar los tejidos oculares subyacentes, esclera, coroides, membrana de Bruch-EPR y retina neurosensorial, para alcanzar el vítreo. Este proceso de absorción se denomina *difusión lateral*, y en él, la permeabilidad del EPR será el principal condicionante de la penetración de la sustancia; ofreciendo una menor resistencia para moléculas liposolubles (Ambati, 2000).

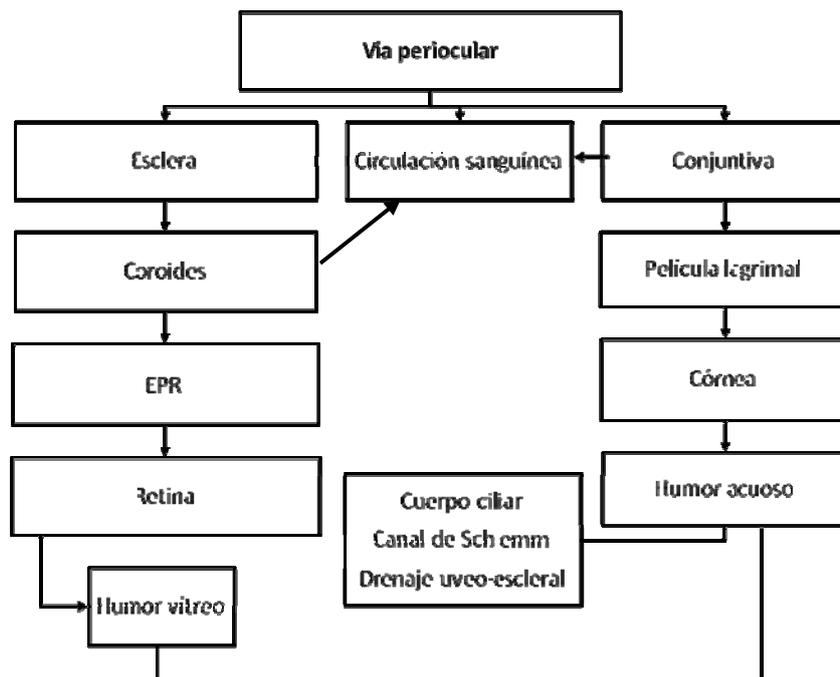


Figura 12: Esquema que ilustra las 3 vías de penetración tras la administración periocular (Traducido de: *Raghava S. et al. Periocular routes for retinal drug delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2004; 1(1): 99-114*).

La importancia relativa de cada una de estas vías en la penetración de fármacos administrados periocularmente, ha sido estudiada in vivo en animales de experimentación, para distintas sustancias: prednisolona (Tsuji, 1988) y manitol (Lee, 2001) administrados por vía subconjuntival en conejos, y celecoxib administrado por vía subconjuntival en ratas (Ayalasomayajula, 2004); concluyendo que la penetración directa desde el espacio periocular, a través de la esclera y los tejidos subyacentes, es la vía preferente. Weijtens y colaboradores llevaron a cabo un ensayo clínico comparativo sobre liberación vítreo-retiniana de dexametasona tras administración subconjuntival, peribulbar y oral, en pacientes que iban a ser vitrectomizados, llegando a la conclusión de que tras la administración subconjuntival y peribulbar, la penetración directa transescleral es la vía fundamental en la consecución de niveles vítreos (Weijtens, 2000). Estos autores describieron, además, un fenómeno de redistribución del fármaco, como resultado de su paso a sangre, al ser absorbido a nivel de la circulación sanguínea conjuntival y episcleral, que justificaría la presencia de niveles detectables en el ojo contralateral tras la administración local (Weijtens, 2000). Así mismo, se ha visto que cuando un fármaco se inyecta periocularmente, puede producirse cierto reflujo de la sustancia a través del punto de inyección, con redistribución de la misma en la película lagrimal y posibilidad de penetración a través de la córnea (Amrite, 2008).

Ahmed (1985) propuso la vía transescleral como alternativa frente a la administración sistémica, la vía tópica y las inyecciones intravítreas, en la administración de fármacos al segmento posterior de ojo. La esclera presenta un área de superficie extensa y un alto grado de hidratación, lo que facilita el paso de

sustancias hidrofílicas a su través. Además, es un tejido hipocelular, que posee escasas enzimas proteolíticas, y su permeabilidad no parece disminuir con la edad; características por las que el tejido escleral presenta una permeabilidad superior a la de la córnea (Ahmed, 1985). En base a las características ultraestructurales de la matriz de colágeno del estroma escleral, el paso de moléculas vía transescleral se produce por difusión a través de poros. Ambati (2000) demostró “in vitro”, trabajando con esclera de conejo, que la permeabilidad del tejido escleral disminuye exponencialmente con el radio y peso molecular de la sustancia, siendo por su parte, el radio molecular mejor predictor de la permeabilidad escleral que el Pm de la sustancia. Para dos sustancias con Pm similar, la permeabilidad del tejido escleral dependerá del radio molecular, siendo mayor para proteínas globulares (tipo inmunoglobulina, seroalbumina) que para moléculas de estructura lineal (tipo dextrano), en base al menor radio molecular de las primeras y a la mayor interacción de las moléculas lineales con las fibras de colágeno del estroma escleral (Ambati, 2000). Por otra parte, en el caso de sustancias de peso y radio molecular similar, el paso transescleral estará condicionado por su carga iónica y grado de hidrofilia (Cheruvu, 2006). El tejido escleral es más permeable a compuestos hidrosolubles y moléculas cargadas negativamente, ya que la matriz escleral contiene proteoglicanos y glicosaminoglicanos que presentan cargas negativas a pH fisiológico, de manera que las moléculas aniónicas serán menos retenidas (Cheruvu, 2006; Ranta, 2006).

Por todo ello, la vía transescleral puede considerarse válida para la liberación de fármacos al segmento posterior del ojo, de hecho, se han ensayado distintos sistemas de liberación sostenida transescleral a base de nano- y micropartículas (Kompella, 2003), implantes epiesclerales (Kato, 2004) o matrices colágenas (Gilbert, 2003). Sin

embargo, no podemos olvidar el obstáculo interpuesto por los tejidos y estructuras circundantes a la esclera, como la presión intraocular, el flujo acuoso uveo-escleral, el flujo sanguíneo coroideo y/o la interfase coroides-membrana de Bruch-EPR. La permeabilidad escleral se encuentra limitada en gran medida por la interfase membrana de Bruch-EPR, considerada una barrera ocular altamente restrictiva, tal y como demuestran los estudios desarrollados por Cheruvu (2006). Según este autor, el paso de moléculas a través de la membrana de Bruch-EPR se ve más condicionado por la lipofilia y carga iónica de la sustancia que el paso transescleral, presentando alta resistencia al paso de moléculas hidrosolubles y moléculas polares (Cheruvu, 2006). Los resultados de los estudios de administración subtenon de triamcinolona, llevados a cabo por Robinson (2006) en conejos, con creación de un tapete conjuntival para aislar la zona de la inoculación de la circulación sanguínea conjuntival o con aplicación de crioterapia para bloqueo de la circulación coroidea, sugieren que la circulación sanguínea conjuntival constituye un obstáculo más potente que la circulación coroidea en la penetración transescleral de las sustancias administradas periocularmente (Robinson, 2006).

3.3.- NUEVAS FORMULACIONES OFTÁLMICAS

La administración de fármacos en solución hace que la duración del efecto sea corta, ya que depende directamente de la semivida del principio activo, siendo difícil mantener concentraciones locales dentro del rango terapéutico. Por esta razón, desde los años 80, las líneas de investigación se centran en el diseño y análisis de

nuevas formulaciones y sistemas, encaminados a mejorar la biodisponibilidad del principio activo, bien aumentando el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular, bien facilitando la penetración del fármaco en su forma libre o bien permitiendo una liberación sostenida y controlada del fármaco al incluirlo en algún vehículo o dispositivo (Herrero-Vanrell, 2007).

3.3.1.- Pro-fármacos

La denominación de profármaco hace referencia a aquellos “derivados biorreversibles” que experimentan una biotransformación en el organismo en cual son administrados antes producir el efecto terapéutico esperado. En general, un profármaco no es activo "per se", sino que se activa en el organismo como resultado de un proceso metabólico en el que se regenera el producto de partida. La mayoría de los pro-fármacos se obtienen por esterificación del principio activo, confiriéndole mediante modificación sus características físico-químicas, mayor estabilidad, posibilidad de administración por distintas vías, mayor velocidad de absorción, menor metabolismo por efecto primer paso e incluso menores efectos secundarios.

En el campo de la oftalmología, la utilización de pro-fármacos ha permitido aumentar la permeabilidad y penetración ocular de principios activos, mejorando su biodisponibilidad y tolerancia. Entre ellos podemos nombrar dos profármacos lipídicos, el ODG-PFA pro-fármaco de foscarnet (Cheng, 1999) y el HDP-P-GCV pro-fármaco de ganciclovir (Cheng, 2000), los cuales, formulados como liposomas para administración intravítrea, se han ensayado en modelos animales como sistemas de liberación sostenida en el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus (CMV),

mostrando un buen perfil de seguridad y eficacia. Se ha desarrollado también un profármaco hidrosoluble de la ciclosporina A (CsA) el OPPH 088, para uso tópico en el tratamiento de enfermedades oculares de base autoinmune (como algunas formas graves de ojo seco). Este profármaco ha mostrado una alta biodisponibilidad en tejidos oculares tanto del segmento anterior como posterior tras su administración tópica, superior a la de la emulsión comercializada (Restasis[®]), y con un mejor perfil de seguridad (Rodríguez-Aller, 2012), ya que el carácter altamente hidrofóbico de la CsA obliga a que sea formulada en emulsión con distintos aceites vegetales, los cuales condicionan una deficiente tolerancia local para el paciente.

3.3.2.- Polímeros bioadhesivos y agentes viscosizantes

La coadministración del principio activo con polímeros de alta viscosidad permite aumentar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular, incrementando, de esta manera, la cantidad de principio activo susceptible de penetrar dentro del ojo, aunque sin efecto directo sobre la absorción del mismo (Zimmer, 1995). Los agentes viscosizantes más empleados son, entre otros, el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona, los polímeros derivados de la celulosa (metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa), los polímeros derivados de ácidos poliacrílicos (carbopol, ácido hialurónico), el dextrano 70, la gelatina, la glicerina, el polietilenglicol y el propilenglicol, el poloxamer 407 y el polisorbato 80. La limitación clínica fundamental de estas formulaciones es que producen visión borrosa (Doménech-Berrozpe, 1998).

La *metilcelulosa* (MC), es un polímero derivado de la celulosa, con un único grupo/éster metilo (-CH₃) que actúa como agente aglutinante confiriendo homogeneidad a los distintos componentes de la formulación. La MC también tiene la propiedad de actuar como agente de recubrimiento dentro de los llamados “polímeros formadores de films”. Al igual que otros ésteres de la celulosa, es soluble en agua pero no en medios ácidos, siendo útil en la producción de comprimidos con cubierta gastroresistente. Los “polímeros formadores de films” pueden ser utilizados como recubrimientos de superficie de sistemas reservorio, controlando la permeabilidad al agua y la velocidad de liberación del principio activo encapsulado. La MC tiene la capacidad añadida de incrementar la viscosidad de determinadas formulaciones (emulsiones y suspensiones), siendo útil para la estabilización de las mismas. Además, este incremento de viscosidad puede modificar el índice de absorción del principio activo, al variar la cantidad de fármaco libre disuelto que puede ser absorbido (Kalász, 2006).

La *polivinilpirrolidona* (PVP) es un polímero no iónico, soluble en agua perteneciente al grupo de los llamados “transportadores poliméricos”, con capacidad para modificar las propiedades farmacocinéticas de la molécula con la que se conjuga, de manera que el compuesto resultante adoptará las propiedades cinéticas del polímero, consiguiendo una liberación controlada y órgano-específica. Frente a otros polímeros no iónicos-solubles en agua, del mismo peso molecular, como el polietilenglicol (PEG₅₀₀₀), el alcohol polivinílico (PVA) o la polidimetilacrilamida (PDAAm), el PVP presenta un tiempo de residencia media (MRT) en sangre tras su administración intravenosa, más largo, con un aclaramiento renal y un volumen de distribución tisular muy bajos, presentando mínima retención a nivel del bazo y de

las células del sistema retículo-endotelial hepático. Estas características cinéticas convierten al PVP en un polímero ideal para la obtención de bioconjugados en la industria farmacéutica, frente a los bioconjugados a base de polisacáridos, altamente retenidos a nivel del sistema retículo-endotelial (Kaneda, 2004).

3.3.3.- Sistemas coloidales y vesiculares

La encapsulación del principio activo en vehículos tipo coloide permite mejorar la absorción del fármaco, lograr una liberación órgano-específica y facilitar una liberación sostenida del principio activo. Dentro de los sistemas coloidales estudiados para su aplicación oftálmica se encuentran las nano- y micropartículas, los liposomas, las microemulsiones, los dendrímeros, los niosomas y los ciclodextranos.

Las *nanopartículas* (1-1000 nm) y las *micropartículas* (1-1000 μm) son vehículos coloidales sólidos constituidos por polímeros naturales o sintéticos, en los que el principio activo se encuentra encapsulado, disuelto o adsorbido en la superficie. En función de su estructura reciben el nombre de nanocápsulas o nanoesferas. Las nanocápsulas tienen una estructura tipo reservorio, formada por un núcleo que contiene el fármaco y una cubierta polimérica, mientras que en las nanoesferas el fármaco se encuentra disperso en el polímero formando una matriz. Estos nano- y microsistemas permiten una liberación controlada del fármaco que contienen durante periodos de tiempo más prolongados que las formulaciones convencionales, y poseen la ventaja adicional de poder ser administrados como una simple inyección intravítrea o en colirio (Kompella, 2003). Estos sistemas son capaces de

aumentar el paso transescleral de moléculas poco permeables, disminuir la degradación enzimática y disminuir el aclaramiento de la sustancia del lugar de la administración (Amrite, 2005). Por todo ello, la tecnología de las nano- y micropartículas ofrece la posibilidad de mejorar la dosificación de fármacos al segmento posterior del ojo, haciendo más razonable la estrategia de tratamiento de las enfermedades retinianas crónicas. Dentro de los polímeros empleados para la elaboración de estos sistemas se encuentran los derivados polialquílicos del ácido acrílico, el ácido láctico o la albúmina. En este tipo de formulaciones, el tamaño de la nanopartícula es importante, ya que va a condicionar el aclaramiento de la formulación del lugar de la administración. En estos sistemas, el índice de liberación del principio activo estará condicionado por la interacción existente entre las cargas de superficie del polímero y las del fármaco, justificando así los parámetros de rendimiento del sistema (Sahoo, 2008). Se han desarrollado y evaluado nanopartículas sintéticas de ácido poliláctico-glicólico (PLGA) cargadas con acetato de dexametasona administradas mediante inyección intravítrea en modelos de neovascularización coroidea en ratas (Xu, 2007). También se han ensayado nanopartículas lipídicas cargadas con tobramicina para administración tópica, que han demostrado en estudios *in vivo* una liberación sostenida del antibiótico al ser retenidas en el fondo de saco conjuntival (Cavalli, 2002).

Las *microemulsiones* son dispersiones con una fase acuosa y una fase orgánica-oleosa, formadas por la combinación del principio activo con distintas sustancias utilizadas como surfactante/co-surfactante. Estos sistemas tienen la ventaja de presentar alta estabilidad termodinámica y la posibilidad de ser administradas en micro-gotas. Las microemulsiones permiten mejorar la solubilidad de sustancias altamente lipofílicas y facilitar su absorción corneal, consiguiendo en

algunos casos, una liberación sostenida del fármaco. Se han desarrollado microemulsiones de pilocarpina para uso tópico que han demostrado en modelos animales, una reducción en la frecuencia de instilación respecto a las formulaciones convencionales de pilocarpina en solución. Se han probado también, microemulsiones de timolol y cloramfenicol, con buenos resultados en cuanto a estabilidad y biodisponibilidad. A pesar de ello, estos sistemas tienen una utilidad clínica limitada por la dificultad para encontrar buenas combinaciones surfactante/co-surfactante y por la potencial toxicidad de estos componentes si se usan en altas concentraciones (Vandamme, 2002).

Los *liposomas* son sistemas vesiculares constituidos por uno o varios núcleos acuosos rodeados de bicapas fosfolipídicas organizadas como las membranas celulares. Estas vesículas pueden incorporar tanto sustancias hidrofílicas en el núcleo acuoso como lipofílicas en las bicapas. Los liposomas han sido muy utilizados en el campo de la farmacología ocular experimental. Entre otros, se han desarrollado y estudiado liposomas de ganciclovir (GCV) administrados mediante inyección intravítrea en modelos animales en los que han demostrado mejorar la biodisponibilidad ocular del GCV frente a su administración en solución acuosa (Cheng, 2000). También se ha formulado ciprofloxacino en liposomas para su administración tópica, lográndose una mayor permanencia de la formulación en contacto con la superficie corneal y una liberación sostenida del antibiótico (Budai, 2007). Las últimas líneas de investigación se centran en la elaboración de liposomas recubiertos con la envoltura de virus inactivados.

Los *dendrimeros* son compuestos macromoleculares de estructura ramificada, con un núcleo central, en el que va encapsulado el fármaco. Son polímeros líquidos o

semi-sólidos que incorporan distintos grupos amino-, carboxilo- o hidroxilo- en su superficie, en número creciente según la generación. Su tamaño de partícula, su Pm, su fácil preparación y la posibilidad de funcionalizar su superficie (seleccionando un grupo funcional u otro), los convierte en vehículos útiles para la administración de fármacos. Estos vehículos pueden incorporar tanto moléculas hidro- como liposolubles, bien encapsuladas dentro de la estructura del dendrímero o bien unidas covalentemente a la superficie del mismo (Sahoo, 2008). Se han ensayado con éxito dendrímeros para la liberación ocular de oligonucleótidos anti-VEGF (ODN-1) en el tratamiento de la neovascularización coroidea en ojos de rata (Marano, 2005). También se han probado dendrímeros de pilocarpina y tropicamida, que incorporando grupos carboxilo e hidroxilo en distinta densidad en su superficie, consiguen mejorar la biodisponibilidad del fármaco y mantener una liberación sostenida del mismo (Vandamme, 2005).

Los *niosomas* son sistemas vesiculares elaborados a partir de surfactantes no iónicos, que presentan la ventaja de poder encapsular en su núcleo tanto compuestos hidro- como liposolubles, mejorando la biodisponibilidad de éstos. Con los años, se ha mejorado el rendimiento de estos sistemas, aumentando el tamaño de las vesículas mediante la incorporación surfactantes de mayor peso molecular, lo que ha permitido disminuir el aclaramiento sanguíneo y prolongar el tiempo de residencia en los fondos de saco conjuntival cuando se administran por vía tópica. Se han probado formulaciones niosomales de maleato de timolol en modelos experimentales de glaucoma en conejos, en los que han mostrado una mayor eficacia hipotensora frente a la formulación convencional en solución (Kaur, 2004).

Los *ciclodextranos* (CDs) son un grupo de oligosacáridos cíclicos (hidroxipropil β -ciclodextranos: HP- β -CD) capaces de formar complejos de inclusión con moléculas lipofílicas de baja solubilidad en agua (Sahoo, 2008). Estos complejos permiten aumentar la permeabilidad corneal de sustancias hidrofóbicas, mejorando la biodisponibilidad ocular de éstas tras su administración tópica en gotas. Se han probado complejos HP- β -CD de dexametasona y dorzolamida que han demostrado una biodisponibilidad superior a la de las formulaciones convencionales en solución, sin los problemas de irritabilidad ocular y toxicidad corneal de las formulaciones convencionales que asocian el cloruro de benzalconio (BAK) como conservante (Lofsson, 2008).

3.3.4.- Iontoforesis ocular

La iontoforesis ocular ha ganado interés en el campo de la oftalmología, por ser un método no invasivo, que permite la liberación eficaz de fármacos tanto al segmento anterior (*iontoforesis transcorneal*) como al segmento posterior del ojo (*iontoforesis transescleral*), sin los efectos adversos asociados a las inyecciones intravítreas y/o a los implantes intraoculares. Aunque las primeras aplicaciones de la técnica datan de principios del siglo XX, es a finales de los años 80, cuando se desarrollan estudios controlados y reglados. En la iontoforesis ocular, mediante la aplicación de una corriente eléctrica se consigue la penetración de moléculas ionizadas (fármacos ionizados) en los tejidos oculares, colocando en contacto con el ojo, un electrodo donante que contiene el fármaco a administrar, y en otro punto de la superficie corporal el electrodo de retorno que cierra el circuito eléctrico.

La iontoforesis transescleral presenta una serie de ventajas frente a la iontoforesis transcorneal. Por una parte, evita la barrera del cristalino permitiendo alcanzar altas concentraciones del fármaco en humor vítreo, por otra, permite una mayor superficie de aplicación pudiendo disminuir el tiempo y la dosis aplicadas, y por último, el tejido escleral ofrece una mayor tolerancia a la corriente y cualquier alteración en su estructura no afectaría a la visión (Maurice, 2001). A pesar de que la técnica de la liberación iontoforética ha sido ampliamente estudiada para la administración transdérmica, su aplicación en el terreno de la farmacología ocular sigue siendo un reto, ya que la estructura de la esclera no es comparable a la de la piel, el tiempo de aplicación está limitado por la tolerancia ocular a la corriente y existe la necesidad de diseñar dispositivos y sondas adaptados para su aplicación ocular. Algunos de los sistemas diseñados para iontoforesis transescleral tratan de superar dichas limitaciones, incorporando un aplicador con un electrodo dispersivo y un controlador de dosis. La técnica de la iontoforesis ocular ha sido ensayada con éxito en la liberación de antibióticos (ciprofloxacino, gentamicina, amikacina, vancomicina) y corticoides (dexametasona y metilprednisolona) (Gaudana, 2010).

El inconveniente fundamental de la administración intraocular de las formulaciones convencionales reside en la imposibilidad de su empleo en tratamientos prolongados, en los que serían necesarios inyecciones repetidas para conseguir mantener concentraciones del fármaco dentro del rango terapéutico, con el consiguiente riesgo de complicaciones oculares (hemorragias conjuntivales, induración escleral en el punto de la inyección, aumentos de la PIO, cataratas, hemorragias vítreas, desprendimientos de retina y endoftalmitis). Además, si

tenemos en cuenta el bajo índice terapéutico de algunos de los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades del segmento posterior, no sería improbable alcanzar concentraciones tóxicas para la retina. Por todo ello, se trabaja en el desarrollo de nuevos sistemas, adaptados para la administración intraocular a modo de *implantes intravítreos*, capaces de lograr una liberación sostenida del fármaco durante periodos de tiempo prolongados, evitando la problemática de las reinyecciones sucesivas. Estos sistemas se pueden preparar a partir de polímeros no biodegradables o de polímeros biodegradables.

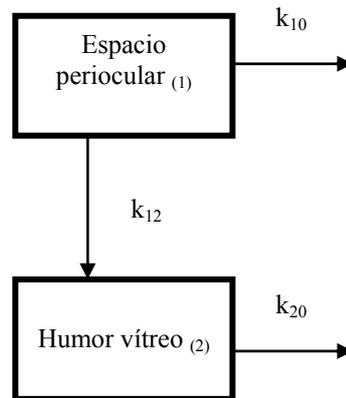
Dentro de los implantes intravítreos no biodegradables, podemos encontrar: Vitrasert[®] (1996) un dispositivo de ganciclovir empleado en el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus, Retisert[®] (2005) un dispositivo de acetónido de fluocinolona aprobado para el tratamiento de las uveítis intermedias y posteriores no infecciosas, Iluvien[®] (2010) un dispositivo de acetónido de fluocinolona probado en ensayos clínicos en fase III para el tratamiento del edema macular diabético y del edema macular secundario a oclusiones venosas retinianas, y el implante NT-501 un dispositivo de células epiteliales retinianas humanas modificadas liberadoras de CNTF que ha sido probado en ensayos clínicos en fase II para el tratamiento de la DMAE atrófica y de la retinosis pigmentaria (Kuno, 2010). Los polímeros no biodegradables empleados con mayor frecuencia en la elaboración de estos sistemas son la silicona, el alcohol polivinílico y el acetato de etilvinilo. La principal desventaja de los implantes no biodegradables, es que deben ser extraídos quirúrgicamente una vez que se ha agotado su efecto, por el riesgo de producir reacciones de rechazo tipo cuerpo extraño, lo que conlleva un mayor riesgo de

complicaciones locales tipo hemorragias vítreas, desprendimiento de retina, endoftalmitis y edema macular quístico (Kuno, 2010). Se ha diseñado un implante intraescleral no biodegradable, preparado a partir de un copolímero de acetato de etileno y vinilo para la liberación de betametasona, que funciona a modo de reservorio, y con posibilidad de recarga (Kato, 2004).

Entre los dispositivos intraoculares biodegradables se encuentra Ozurdex[®] (2011), un implante intravítreo de liberación sostenida de dexametasona que ha sido aprobado para el tratamiento del edema macular secundario a obstrucciones venosas retinianas y de las uveítis intermedias o posteriores no infecciosas (London, 2011). Los polímeros biodegradables empleados en la elaboración de estos sistemas se clasifican en hidrofóbicos de origen sintético e hidrofílicos de origen natural. Dentro de los polímeros hidrofóbicos sintéticos los más empleados son el ácido poli-láctico, el ácido poli-glicólico y sus copolímeros, siendo el ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) el material más empleado en la elaboración de implantes intraoculares biodegradables. En todos ellos, las cadenas poliméricas se rompen por hidrólisis y los productos resultantes son metabolizados mediante el ciclo de Krebs. Gracias a la maleabilidad de estos polímeros, han sido utilizados en la fabricación de implantes biodegradables con formas diversas (varillas, clavos esclerales, pellets, discos, láminas).

3.4.- MODELIZACIÓN CINÉTICA OCULAR

Para la administración subconjuntival, Lee y Robinson (2004) propusieron un modelo cinético simple de paso directo de la sustancia desde el espacio periocular al compartimento vítreo, con dos constantes de eliminación independientes, una desde el compartimento vítreo (K_{20}) y otra desde el propio espacio periocular (K_{10}):



En el que K_{12} representa la constante de transferencia o distribución de la sustancia a vítreo, K_{20} representa la constante de eliminación del fármaco desde el compartimento vítreo y K_{10} la constante de eliminación desde el espacio periocular. Según este modelo, la biodisponibilidad vítreo de la sustancia (F_{Hv}), es decir, la fracción de dosis administrada que alcanza el compartimento vítreo desde el espacio periocular, vendrá dada por la siguiente ecuación:

$$F_{Hv} = \left(\frac{K_{12}}{K_{12} + K_{10}} \times 100 \right)$$

Siendo los valores de biodisponibilidad vítrea resultantes demasiado bajos, como consecuencia de la pérdida adicional de sustancia desde el lugar de la administración (K_{10}), que reduciría la cantidad de fármaco disponible para alcanzar el vítreo (Lee, 2004(II)).

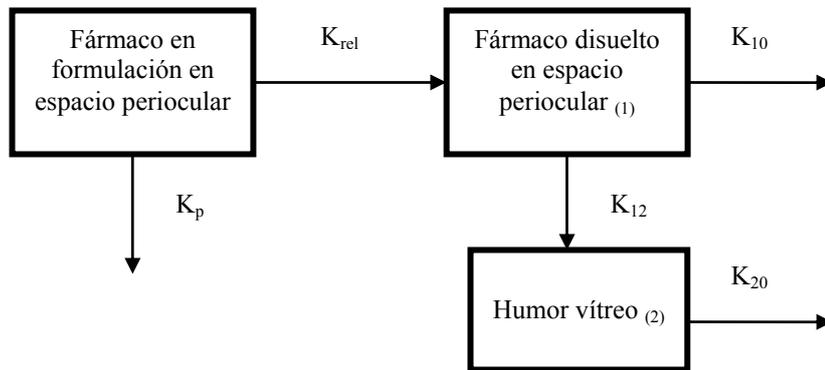
En consecuencia, existirían dos formas de incrementar la biodisponibilidad de la sustancia administrada, bien aumentando la penetración de la sustancia (K_{12}) o bien reduciendo el aclaramiento de la sustancia del lugar de la inyección (K_{10}).

La pérdida de sustancia del lugar de la inyección (K_{10}) es un factor limitante de la eficacia de la vía transescleral en la liberación de fármacos al segmento posterior del ojo. Los mecanismos implicados en esta pérdida, como el reflujo postinyección o el aclaramiento sanguíneo y linfático conjuntival, han sido analizados por varios autores. Conrad y Robinson (1980) estudiaron el comportamiento cinético de la pilocarpina tras su administración subconjuntival, llegando a la conclusión de que cuando inyectaban volúmenes altos, por encima de los 200 μL , se producía reflujo de la solución a través de la zona de punción, con la consiguiente pérdida de dosis administrada (Conrad, 1980). Kim y colaboradores desarrollaron estudios de liberación “in vivo” de Gd-DTPA a partir un implante epiescleral, y mediante técnicas de RMN pudieron identificar la acumulación gradual de la sustancia en ganglios linfáticos de la cadena peribucal, lo que confirmaría el papel determinante del drenaje linfático conjuntival y orbitario en el aclaramiento de sustancias administradas periocularmente (Kim, 2004). Por su parte, Robinson y colaboradores estudiaron las barreras oculares en la penetración transescleral del acetónido de triamcinolona tras su administración subtenon, analizando el papel de la circulación sanguínea conjuntival, epiescleral y coroidea; deduciéndose de sus

experiencias la importante contribución de la circulación conjuntival al lavado de la sustancia del lugar de la administración, al constatar niveles vítreos inferiores cuando no se controlaba este factor (Robinson, 2006).

Cuando una sustancia es administrada periocularmente en forma de solución, el tiempo de permanencia en el lugar de la inyección es muy corto y no se puede esperar una liberación sostenida de la misma (Li, 2004). Por esta razón, se han ensayado distintos métodos dirigidos a reducir el aclaramiento de la sustancia del lugar de la inyección, bien minimizando el reflujo de la formulación a través de la zona de punción mediante la aplicación de técnicas y volúmenes de inyección apropiados (Robinson, 2006) o bien incrementando el tiempo de contacto del fármaco con la superficie escleral mediante la utilización de formulaciones en suspensión o de medios viscosos-semisólidos (Gilbert, 2003) o bien minimizando el aclaramiento sanguíneo de la formulación mediante la utilización de formulaciones a base de micro- y/o nanopartículas (Kompella, 2003, Ayalasonmayajula, 2004), de implantes oculares (Yasukawa, 2004) o de bombas osmóticas.

El modelo farmacocinético inicial, propuesto por Lee y Robinson podría ser utilizado para describir la cinética de sustancias administradas en solución. Sin embargo, cuando se trabaja con formulaciones retardantes que buscan una liberación sostenida del principio activo la situación se hace más compleja. En estos casos, sólo el fármaco disuelto y liberado desde la formulación, podrá absorberse, y en consecuencia, el modelo cinético anterior deberá incluir un nuevo compartimento, el *compartimento disolución*:



En el que K_{rel} representa la *constante de liberación* del fármaco desde la formulación que lo contiene y K_p la *constante de eliminación de la formulación* del lugar de la inyección. Considerando este modelo, la mayor biodisponibilidad del fármaco en vítreo, es debida a una mayor retención de la sustancia en el lugar de la administración y a una liberación más lenta de ésta desde su formulación, siendo que K_p es menor que K_{rel} (Ranta, 2006).

III

JUSTIFICACION, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1.- JUSTIFICACIÓN

Durante décadas, el tratamiento del glaucoma ha estado dirigido al descenso de la presión intraocular (PIO) mediante fármacos o cirugía, siendo las terapias hipotensoras la única modalidad de tratamiento con evidencia clínicamente probada. Sin embargo, aunque una reducción de la PIO frena la progresión de la enfermedad en la mayoría de los pacientes, hay un grupo, en el que el deterioro visual continúa incluso a pesar de la reducción significativa de la PIO o con cifras de PIO normales (Levin, 2003).

Se cree que la sobreactivación de los receptores NMDA del glutamato es responsable de la neurotoxicidad calcio-dependiente asociada a procesos de daño cerebral hipóxico-isquémico, traumatismo cerebral, epilepsia y a diversas enfermedades de tipo neurodegenerativo, y en el caso del glaucoma, a la pérdida de células ganglionares retinianas (CGRs) (Nucci, 2005). Por esta razón, se ha investigado el potencial terapéutico de los antagonistas de los receptores tipo NMDA del glutamato, en el tratamiento del glaucoma.

Pese a los alentadores resultados mostrados en condiciones experimentales (modelos animales y/o cultivos celulares), por algunos agentes neuroprotectores, no se dispone de ensayos clínicos en humanos que confirmen su eficacia en el glaucoma (Danesh-Meyer, 2009), bien por sus efectos adversos o por la pérdida de eficacia de estas sustancias cuando se prueban en condiciones reales de enfermedad (Levin, 2008).

La aplicación clínica de fármacos neuroprotectores, como memantina, en el tratamiento de enfermedades oculares neurodegenerativas como el glaucoma, se ha visto condicionada, hasta el momento, por las altas concentraciones requeridas por vía sistémica, para que el fármaco alcanzase en cantidad suficiente el tejido diana, en este caso, la capa de células ganglionares retinianas (CGRs), con el consiguiente riesgo de aparición de efectos secundarios sistémicos no deseados. Por ello, uno de los principales retos de la oftalmología en el tratamiento de las enfermedades del segmento posterior, es el desarrollo de sistemas y formulaciones capaces de liberar el fármaco en concentración suficiente y de forma sostenida a la retina, con el objeto de prolongar la permanencia del principio activo en el tejido diana. Para el diseño de estos dispositivos, es fundamental conocer las propiedades físico-químicas y el comportamiento cinético de la sustancia a nivel ocular, y ensayar vías de administración alternativas, que aprovechando las ventajas de la absorción transescleral, permitan superar las restricciones de permeabilidad de la córnea y de la BHR-interna (endotelio de los capilares retinianos).

Memantina ha sido aprobada por la FDA para tratamiento sintomático de pacientes con enfermedad de Alzheimer moderada-severa, demencia vascular leve-moderada y demencias de tipo mixto (Reisberg, 2003); y administrada por vía sistémica, ha mostrado capacidad específica para frenar la pérdida de CGRs en modelos animales de isquemia retiniana aguda (Lagrèze, 1998), compresión mecánica del NO (WoldeMussie, 2002) y en modelos experimentales de hipertensión ocular-glaucoma (Hare, 2004 (IyII)).

Sobre la base de una posible eficacia terapéutica de memantina, un estudio farmacocinético experimental es fundamental en la investigación de nuevos usos

terapéuticos (Doménech-Berrozpe, 1997) y como fase previa al desarrollo de cualquier ensayo clínico, ya que a partir del mismo, se obtienen datos preliminares que ayudarán en el diseño del estudio y en la definición de las pautas de dosificación, los tiempos y las vías de administración más adecuados (Levin, 2008).

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a lo anteriormente expuesto, pensamos que un mejor conocimiento y evaluación del comportamiento cinético de memantina a nivel ocular, son fundamentales para poder ensayar su eficacia clínica como tratamiento neuroprotector en el glaucoma y poder ayudar en el diseño y análisis de nuevos dispositivos y formulaciones que permitan su liberación sostenida al segmento posterior del ojo.

Para ello, hemos elegido la vía periocular, concretamente la vía subtenon posterior (STP), como alternativa a la administración intravítrea, del ojo, ya que proporciona un espacio virtual donde “almacenar” el principio activo a modo de depot, logrando una liberación más progresiva y con menor riesgo de complicaciones oculares que las inyecciones intravítreas (Raghava, 2004; Gaudana, 2009). Además, la administración subtenon, permite mantener el inóculo más aislado del drenaje sanguíneo y linfático orbitario que otras modalidades de inyección periocular, posibilitando un aclaramiento más lento de la sustancia del lugar de la administración (Ghate, 2007).

En base a lo anteriormente expuesto, los objetivos de nuestro trabajo han sido:

1. Desarrollo, optimización y validación de la metodología analítica para la determinación de memantina en muestras biológicas de humor vítreo y plasma.
2. Adaptación de la metodología de inyección periocular subtenon posterior (STP) para la administración de distintas formulaciones de memantina en conejo.
3. Estudio de la farmacocinética ocular y biodisponibilidad vítrea de memantina tras su administración periocular-subtenon posterior en conejo, comparando los resultados de ésta, con las vías intravítrea y sistémica endovenosa.
4. Estudio comparativo de la cinética y biodisponibilidad vítrea de memantina al modificar cualitativamente su formulación mediante la adición de agentes viscosizantes teóricamente retardantes.
5. Diseño de un modelo cinético teórico sobre el comportamiento ocular de memantina tras su administración periocular subtenon posterior, a partir de los datos experimentales del estudio.
6. Estudio de la seguridad y tolerancia ocular de memantina tras su administración intravítrea en conejo.
7. Elaboración y caracterización in vitro de una nueva formulación de liberación sostenida de memantina, a partir de nanopartículas de Gantrez AN[®].

8. Estudio de la seguridad y tolerancia ocular de nanopartículas blancas (no cargadas con medicación) de Gantrez AN[®] tras su administración periocular-subtenon e intravítrea en ojos de conejo.

III

MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL

1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

El estudio se ha realizado en conejos albinos de raza Neo-zelandesa, hembras adultas, con pesos comprendidos entre los 2-3 Kg, a los que diversos controles analíticos y clínicos permitieron asegurar su idoneidad para la inclusión en este proyecto. Los animales fueron proporcionados por el Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal (SAEA) de la Universidad de Zaragoza.

El cuidado y manipulación de los animales se realizó de acuerdo con la resolución 86/609 de la ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), sobre la regulación del uso de animales de experimentación. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Zaragoza (PI 07/07).

Se utilizaron un total de 129 animales, de los cuales 123 fueron empleados en el estudio farmacocinético y los otros 6 en el estudio de toxicidad ocular de memantina.

Las experiencias y actividades de este proyecto se desarrollaron en las instalaciones del Laboratorio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

1.2.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Hemos trabajado con memantina (1-amino-3,5-cloruro de dimetiladamantina) en forma de clorhidrato, al 98.8%, suministrada por los laboratorios Sigma Aldrich (St Louis, MO). Como estándar interno en el análisis cromatográfico se utilizó rimantadina, también en su forma clorhidrato, al 97%, proporcionada también por los laboratorios Sigma Aldrich (St Louis, MO).

Se utilizaron distintas formulaciones de memantina obtenidas a partir de la disolución de ésta en solución salina de ClNa al 0.9%, solución de metilcelulosa al 0.5% (p/v) (Sigma Aldrich St Louis, MO, USA) y solución de polivinilpirrolidona al 1% (p/v) (Sigma Aldrich St Louis, MO, USA); obteniendo concentraciones de memantina de 15 mg/mL.

En la fase de extracción y cuantificación de las muestras, se utilizaron los siguientes reactivos: 9-fluoroenilmetil cloroformiato (FMOC-Cl) como agente derivatizante proporcionado por los laboratorios Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), acetonitrilo calidad HPLC de los laboratorios Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, España), metanol y otros solventes calidad HPLC, como ácido acético glacial, ácido fórmico 99% y ácido fosfórico 99.99% (85 w/v) de los laboratorios Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, España) y N₂ gas-Alphagaz™ de los laboratorios Air Liquide (Zaragoza, España).

Las soluciones de almacenamiento de memantina y del estándar interno (rimantadina) se prepararon mediante disolución de los compuestos en agua purificada Mili-Q, hasta una concentración de 100 µg/mL. De la misma manera se obtuvieron las soluciones de trabajo, mediante dilución de las soluciones madre,

hasta alcanzar concentraciones entre los 0.2-20 µg/mL en el caso de memantina, y 1 µg/mL para rimantadina. Se preparó una solución de FMOC-Cl 90 mM, mediante adición de acetonitrilo, en condiciones de oscuridad, y una solución de glicina 0.1M en agua purificada. Todas las soluciones fueron almacenadas a -20° C hasta su posterior utilización.

En las fases de administración del fármaco y extracción de muestras biológicas, se utilizaron los siguientes fármacos: Ketamina (Imalgene 500[®]) de los laboratorios Merial (Barcelona, España) y Xilacina (Xilagesic[®] 2%) de los laboratorios Calier SA (Barcelona, España) para la sedación-anestesia del animal; colirio Colircusí Anestésico Doble[®] de tetracaína 0.1% y oxibuprocaína 0.4% de los laboratorios Alcon Cusi SA (Barcelona, España) para la anestesia tópica en gotas, colirio Colircusí Cicloplégico[®] de los laboratorios Alcon Cusi SA (Barcelona, España) como midriático para el estudio fundoscópico, Pentobarbital sódico (Dolehtal[®]) de los laboratorios Vetoquinol (Madrid, España) para el sacrificio de los animales, anticoagulante de Heparina de los laboratorios Analema (Vigo, España) para las muestras de sangre, y formaldehído al 10% como solución de fijación en la preparación de las muestras de tejido para el análisis histopatológico.

1.3.- MATERIAL DE LABORATORIO

1.3.1 – Material general

- Agitador magnético SBD A-06.
- Agitador vibrador de tubos Vibra Mix Ovan.
- Agitador de balanceo. Rotabit. JP SELECTA, SA.

- Balanza analítica de precisión. Modelo GMBH. Sartorius.
- Baño termostatzado con agitación. Modelo Unitronic-320. P-SELECTA, SA.
- Centrífuga refrigerada X-22R, Beckman Allegra.
- Centrífuga Centromix-II BL. P SELECTA, SA.
- Bomba de infusión. Modelo M312. Wilson.
- Bomba de vacío. Modelo ST-21-SD.
- Bombona de nitrógeno N45. Air Liquide.
- Estufa P Selecta.
- Frigorífico Eco Tropic. Edesa.
- Congelador -20°C. Whirpool
- Congelador -20°C. Zanussi.
- pH metro digital. Modelo HI 9021. Hana.
- Purificador de agua. Millipore Simplicity.
- Vortex-Genie 2 Digital. Scientific Industries, Inc.

1.3.2.- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

- Columna Nova-Pak C-18, 4 μm (3.9 x 150 mm).
- Precolumna Nova-Pak C-18, (3.9 x 20 mm ID, 4 μm tamaño de partícula).
- Columna Nova-Pak C-18, fase reversa (3.9 x 150 mm ID, 4 μm)
- Bombas de alta presión. Modelo 515. Waters Associates.
- Inyector automático. Modelo 717. Waters Associates.
- Programador de gradientes. Waters Associates.
- Detector de fluorescencia de onda variable. Modelo 474. Waters Associates.

- Equipo informático de control del sistema cromatográfico. Ordenador IBM (Millennium Integration, System 2000) con software de integración Em Power Waters Associates (Milford, MA, USA).

1.3.3.- Material para la administración del fármaco y toma de muestras biológicas

- Microscopio quirúrgico. Zeiss[®]. West Germany.
- Sistemas de contención de conejos Letica.
- Cánulas Valu-Set 25G ³/₄. Becton Dickinson, SA (tipo mariposa).
- Cánulas Venofix 21G x 10-20mm. Braun.
- PTFE Radiopaque catheter 22G x 1mm. NITRO.
- Agujas estériles desechables 20G 0.9x25mm, 21G 0.8x40mm, 25G 0.5x16mm, 30G 0.3x13mm.
- Jeringas estériles desechables de 2 mL, 5 mL y 10 mL. Becton Dickinson, SA.
- Jeringas estériles desechables de insulina 1 mL con aguja y jeringas de 1 mL BD con aguja Microfine.
- Pipetas automáticas GILSON P5000 (1-5 µL), P10 (1-10 µL); P200 (200-1000 µL); y Biohit Proline pipette (5-50 µL) y (50-200µL).
- Puntas de pipeta 200-1000 µL. Daslab[®].
- Gradillas de almacenamiento de tubos de ensayo.
- Tubos Eppendorf. Daslab[®].
- Tubos de ensayo de plástico de fondo redondo, 15 mL.
- Frascos lavadores PE, 50 mL y frascos-contenedores de orina, 125 mL.

1.3.4.- Material para obtención de muestras de estudio de toxicidad ocular

- Instrumental de microcirugía ocular. Moria[®].
- Microscopio quirúrgico. Zeiss, West Germany.
- Oftalmoscopio indirecto binocular. Zeiss[®].
- Lente de 20D (Volk[®], double aspheric AG081620).
- Tonómetro de rebote Tonovet, Tiolat-Oy[®].
- Material fungible diverso.

2.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1.- ESTUDIO FARMACOCINETICO

2.1.1.- Administración periocular-subtenon posterior

Para estudiar el comportamiento cinético de memantina tras la administración periocular STP, se utilizaron 54 animales, distribuidos en tres grupos de 18 individuos, uno para cada una de las formulaciones ensayadas (salina, metilcelulosa 0.5% y polivinilpirrolidona 1%). Se obtuvieron muestras de humor vítreo a los 10, 60, 120, 240, 480 y 1440 minutos postadministración del ojo administrado y del ojo contralateral. Así mismo, se obtuvieron muestras de plasma a los 5, 10, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos postadministración. Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

La técnica utilizada para la administración en el espacio subtenon posterior (STP) fue la descrita por Pradeep-Venkatesh para la inyección de corticoides, en la

que utilizando un catéter intravenoso flexible de politetrafluoroetileno (PTFE), se consigue el correcto emplazamiento del fármaco en dicho espacio virtual (Venkatesh, 2002).

La administración se realizó en todo los casos bajo sedación-anestesia del animal, mediante inyección intramuscular de 10-20 mg/Kg de ketamina (Imalgene500[®]) y 2 mg/Kg de xilacina al 2% (Xilagesic[®]), y anestesia tópica en gotas, mediante instilación de colirio Colircusí Anestésico Doble[®] (tetracaína 0,1% y oxibuprocaina 0,4%. Alcon Cusí S.A. Barcelona). Con ayuda de un blefarostato, para conseguir la adecuada exposición del ojo, y bajo control microscópico, se procedió a realizar la inyección. Con ayuda de una pinza levantamos un pellizco de conjuntiva, aproximadamente a 3 mm del limbo esclero-corneal, lateralmente al músculo recto superior, y penetrando por el cuadrante temporal-superior en el espacio subtenon, introducimos un catéter de PTFE de 23Gs, deslizándolo unos milímetros dentro del espacio subtenon. Después, avanzamos el catéter unos 3-5 mm al tiempo que se retira lentamente la guía hacia atrás, y finalmente deslizamos el catéter, con un suave movimiento de rotación, unos 12-15 mm superando el ecuador del globo ocular; siempre con cuidado de no presionar con fuerza la cánula para evitar que ésta pueda doblarse.

La dosis de memantina administrada por esta vía fue de 4.5mg/animal (en dosis única), en un volumen de 0.3 mL de la correspondiente formulación de memantina 15 mg/mL. Dicho volumen había sido fijado en pruebas preliminares como el volumen máximo capaz de ser emplazado en el espacio subtenon posterior sin problemas de reflujo tras la inyección.

2.1.2.- Administración intravítrea

Para estudiar el comportamiento cinético tras la administración intravítrea se utilizaron 45 animales, distribuidos en tres grupos de 15 animales, correspondientes a cada una de las formulaciones. Se tomaron muestras de humor vítreo del ojo administrado a los 120, 240, 480, 1440 y 2880 minutos y muestras de sangre a los 5, 10, 60, 120, 240, 360 y 480 minutos postadministración.

La administración intravítrea se realizó también bajo sedación-anestesia (ketamina + xilacina) del animal y cobertura anestésica tópica en gotas. Previa a la inyección se realizó una paracentesis con aguja de 30Gs, para la evacuación de humor acuoso de la cámara anterior del ojo, con el objeto de evitar problemas de reflujo por hiperpresión. La inyección intravítrea se realizó con aguja de 30Gs en el cuadrante temporal-superior, a 2.5-3 mm del limbo esclero-corneal según la técnica descrita por Barza en sus experiencias (Barza, 1993).

La dosis de memantina administrada por esta vía fue de 1.5 mg/animal (en dosis única) en un volumen de 0.1 mL de la correspondiente formulación de memantina 15 mg/mL. Volumen establecido a partir de pruebas preliminares, como el máximo volumen inyectable en cavidad vítrea sin problemas de reflujo.

2.1.3.- Administración endovenosa

2.1.3.1.- Dosis única

Para el estudio cinético de memantina tras la administración sistémica por vía endovenosa, en dosis única, se utilizaron 21 animales. Se administraron 0.3 mL de

una solución de memantina de 15 mg/mL (equivalentes a la administración de 4.5 mg/animal) a cada animal a través de la vena marginal de la oreja del conejo.

La toma de muestras de humor vítreo se realizó a los 5, 15, 30, 60, 120, 360 y 480 minutos postadministración y las muestras de sangre se obtuvieron a los 5, 15, 30, 60 y 120 minutos, mediante canulación de la vena mediana de la oreja contraria a la de la administración.

2.1.3.2.- Infusión endovenosa

Se utilizaron 3 animales, a los que se administró una solución de memantina por vía endovenosa en infusión, a través de la vena marginal de la oreja, usando una bomba de infusión convenientemente calibrada, para alcanzar niveles plasmáticos en equilibrio estacionario. En pruebas preliminares, habíamos calculado que el tiempo necesario para lograr dicho equilibrio estacionario era de 200 minutos. Se utilizaron dos disoluciones de memantina, a distintas concentraciones: la primera como disolución de choque (150 ng/mL) administrada durante los primeros 30 minutos de la infusión y la segunda, como disolución de mantenimiento (75 ng/mL) administrada hasta los 200 minutos de la experiencia. Las velocidades de infusión (V_{inf}) fueron de 0.4 mL/minuto para los primeros 30 minutos y de 0.2 mL/minuto para el último tramo de la experiencia. Dichas velocidades de infusión se obtuvieron a partir de la siguiente ecuación:

$$V_{inf} = C_{ss} \times C_L$$

Donde C_{ss} representa la concentración de memantina que nos interesaba alcanzar en plasma en la fase de equilibrio estacionario y C_L el aclaramiento plasmático de

memantina, cuyo valor se obtuvo a partir de los resultados de la experiencia previa de administración endovenosa en dosis única.

Las muestras de sangre se obtuvieron a los tiempos de 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 y 200 minutos, desde el inicio de la experiencia. A los 200 minutos, alcanzado el equilibrio estacionario de memantina en plasma, se obtuvieron también muestras de humor vítreo de los dos ojos del animal.

2.1.4.- Obtención de muestras

2.1.4.1.- Muestras de humor vítreo

Tras la administración, los animales fueron sacrificados de acuerdo con los puntos cinéticos establecidos para la obtención de las curvas concentración/tiempo, mediante inyección intravenosa de pentobarbital sódico al 20% (30 mg/Kg de peso) en la vena marginal de la oreja del conejo. Tras la muerte del animal, se procedió a la enucleación de ambos ojos y a su conservación en frío a -20° C para la posterior obtención del vítreo.

La toma de muestras de humor vítreo (1 mL) se hizo con los ojos congelados, realizando una sección transversal del globo ocular, justo por delante de la línea del ecuador, con hoja de bisturí del 11, desechando el cristalino y la córnea. Con ayuda de pinzas se separó el molde vítreo del casquete escleral con cuidado de no dejar restos de coriorretina adheridos. El molde vítreo obtenido es después fraccionado en dos mitades e incluido en tubos Eppendorf debidamente rotulados, almacenándose a -20° C hasta su posterior procesamiento analítico. El periodo de almacenamiento de las muestras no superó los 30 días en ninguno de los casos.

2.1.4.2.- Muestras de plasma

Se obtuvieron en todos los casos muestras de sangre de 2 mL, mediante canulación de la arteria mediana de la oreja del animal con catéter intravenoso tipo mariposa de 25Gs, a los tiempos cinéticos establecidos para cada experiencia. En el caso de la infusión endovenosa, las muestras se obtuvieron mediante canulación de la arteria mediana de la oreja contraria a la de la administración.

Las muestras de sangre recogidas en tubos con anticoagulante de heparina, se centrifugaron a 3700 rpm durante 4 minutos, para la obtención del plasma sobrenadante mediante pipeteado. Las muestras de plasma obtenidas fueron almacenadas en tubos Eppendorf previamente rotulados, a -20° C, hasta el momento de su análisis. El período de almacenamiento de las muestras no superó los 30 días en ninguno de los casos.

2.1.5.- Metodología analítica

La metodología analítica desarrollada para la determinación de memantina en plasma y humor vítreo, se basó en la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia, derivatización pre-columna con FMOC-Cl como agente derivatizante, descrito previamente por Hare y colaboradores para la cuantificación de memantina en plasma y humor vítreo de monos (Hare, 2004); extracción líquido-líquido del analito y utilización de rimantadina como estándar interno.

Se optimizaron los parámetros de las reacciones de derivatización y extracción, así como los diferentes parámetros cromatográficos, validándose el

método analítico para su aplicación en la determinación de memantina en muestras biológicas de humor vítreo y plasma, y posterior utilización en el estudio de biodisponibilidad de memantina, tal y como se recoge en el apartado correspondiente del Anexo I (Puente B, 2011).

2.1.5.1.- Técnica y metodología de extracción

Todas las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente, protegidas de la incidencia de la luz solar, y homogeneizadas mediante adición de 200 μ L de PBS y posterior agitación.

La reacción de derivatización tuvo lugar a 30°C, mediante la adición a las muestras de una solución de FMOC-Cl 1.5 mM y una mezcla de tampón borato/acetonitrilo 1:1, llevando la reacción a pH de 8.5 mediante la adición de tampón borato 0.1 M. La reacción se detuvo a los 20 minutos mediante la adición de solución de glicina 5 mM.

Tras la reacción de derivatización, las muestras fueron preparadas para el análisis cromatográfico, por un procedimiento de extracción líquido-líquido con n-hexano, adición de rimantadina como estándar interno y llevadas a sequedad. Los residuos obtenidos fueron reconstituidos en fase móvil de acetonitrilo/agua 73:27 v/v y analizados por duplicado.

2.1.5.2.- Preparación de la fase móvil

Se utilizó una fase móvil de acetonitrilo: agua (73:27 v/v) con una velocidad de flujo de 1.2 mL/minuto, tanto para las muestras de plasma como de humor vítreo.

2.1.5.3.- Condiciones cromatográficas

La columna utilizada para la detección y cuantificación de memantina fue la columna Nova-Pak C-18 fase reversa (3.9 x 150 mm ID, 4 μm). Las longitudes de onda seleccionadas fueron de 260 nm y 315 nm, como longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) del compuesto respectivamente, con un flujo de la fase móvil a 1.2 mL/minuto, y un volumen de muestra inyectada de 20 μL , a temperatura ambiente de 24° C.

2.1.5.4.- Validación del método analítico

2.1.5.4.a.- *Rectas de calibración*

Las rectas de calibración se construyeron a partir de muestras añadidas de plasma y humor vítreo (blancos de plasma y humor vítreo a los que se adicionaron distintos volúmenes de las soluciones de trabajo de memantina). La cuantificación de memantina se realizó usando la relación del cociente entre las alturas de los picos del cromatograma del analito (memantina) y del estándar interno (rimantadina). A partir de dicha de relación, por el método de mínimos cuadrados, se obtuvieron las rectas de calibración. Se utilizaron siete puntos, en un intervalo de concentraciones de memantina de 10-1000 $\mu\text{g/mL}$.

Las rectas de calibración obtenidas estuvieron definidas por tres parámetros: el coeficiente de regresión, la pendiente de la recta y la ordenada en el origen.

2.1.5.4.b.- Linealidad

Para el estudio de linealidad se utilizaron muestras añadidas de memantina y rimantadina, siendo el intervalo de concentraciones estudiado de 10-1000 µg/mL para memantina.

Las soluciones se prepararon cada día por sextuplicado, y cada solución se inyectaba por duplicado, determinándose el área bajo la curva cromatográfica media y su desviación estándar, para cada concentración. Los resultados se procesaron mediante regresión lineal obteniéndose la ecuación que define la relación entre las distintas concentraciones ensayadas y la respuesta observada.

2.1.5.4.c.- Precisión y exactitud

La *precisión* hace referencia a la proximidad entre las diferentes medidas estimadas para una misma concentración problema, y viene definida por el coeficiente de variación de las medidas:

$$\text{Precisión (\%)} = (DE/medida) \times 100$$

Donde DE es la desviación estándar de las mediciones.

Se determinó la precisión de cada medición dentro del mismo día (repetibilidad) y en distintos días de estudio (reproducibilidad), considerando que para cada nivel de concentración la variabilidad de valores estimados no debía ser superior al 15%, excepto para el límite de cuantificación en que podía ser de hasta el 20%.

La *exactitud* hace referencia a la proximidad de los resultados obtenidos por el método respecto al verdadero valor o concentración teórica:

$$\text{Exactitud (\%)} = (\text{concentración}_{\text{experimental}} / \text{concentración}_{\text{teórica}}) \times 100$$

Y cuyo valor debe encontrarse entre el 80-120%.

Los coeficientes de variación –intradía e interdía- se calcularon para cinco concentraciones distintas (10, 50, 125, 500, 1000 ng/mL) que fueron analizadas por triplicado (intradía) en tres días distintos (interdía).

2.1.5.4.d.- Reproducibilidad

La reproducibilidad del método analítico se determinó a partir del cálculo de los coeficientes de variación intra- e interdía, utilizando los valores de área bajo la curva cromatográfica de cuatro soluciones acuosas de memantina de distinta concentración (soluciones de trabajo de memantina).

2.1.5.4.e.- Límite de detección y de cuantificación

El *límite de detección* (LD) indica la mínima concentración del fármaco analizado que puede ser detectada con el método utilizado; y fue calculado como la concentración más baja capaz de producir un ratio de alturas pico señal/ruido (S/N) igual a 3.

El *límite de cuantificación* (LQ) hace referencia a la sensibilidad del método y corresponde a la concentración más baja del analito que puede cuantificarse empleando dicho método, de manera reproducible, con una variabilidad menor del 20% y una exactitud del 80-120%.

2.1.5.4.f.- Robustez

La robustez de un método analítico hace referencia a la capacidad para que las mediciones no se vean alteradas por pequeñas variaciones en alguno de los parámetros o condiciones cromatográficas.

El estudio de robustez se realizó comparando la desviación estándar (DE) de las distintas mediciones, obtenidas al introducir modificaciones en las condiciones cromatográficas, como por ejemplo, en el tiempo de almacenamiento de las soluciones, en el tiempo de centrifugación, en la velocidad de flujo de la fase móvil o en la proporción de acetonitrilo; utilizando ocho soluciones acuosas de memantina (500 ng/mL).

2.1.6.- Ajuste de datos y tratamiento cinético

Los datos experimentales de concentración de memantina fueron ajustados mediante un programa de regresión no lineal al modelo cinético compartimental más simple (monocompartimental o bicompartimental) dentro de los predeterminados en la librería del programa Phoenix WinNonlin[®] versión 6.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA), que mejor describiese el comportamiento de la sustancia tras su administración por cada una de las vías. El mejor ajuste farmacocinético fue seleccionado en función del aspecto visual de las curvas y según criterios estadísticos de bondad del ajuste, como el coeficiente de correlación (r), tomando como mejor ajuste aquel que arrojase el valor del coeficiente de correlación más próximo a la unidad.

Se procesaron y ajustaron de forma individual los datos experimentales de cada animal (trabajando con triplicados para cada tiempo cinético $n= 3$), y posteriormente se calcularon la media y la desviación estándar (DE) de los valores de los parámetros farmacocinéticos estimados por el programa para cada una de las tripletas de ensayo.

Los datos de concentración obtenidos de las experiencias, se utilizaron para desarrollar un modelo farmacocinético vítreo teórico, que permitiese describir la disposición de memantina tras su administración periocular-subtenon.

2.1.7.- Biodisponibilidad

El cálculo de la biodisponibilidad absoluta tras la administración subtenon (F) se realizó según la siguiente ecuación:

$$F = AUC_{0-\infty} \times Cl / D$$

El cálculo de la biodisponibilidad vítrea relativa de las vías subtenon ($F_{stp/int}$) y endovenosa ($F_{env/int}$) respecto a la vía intravítrea, se realizó usando las siguientes ecuaciones:

$$F_{stp/int} = AUC_{0-\infty stp} \times D_{int} / AUC_{0-\infty int} \times D_{stp}$$

$$F_{env/int} = AUC_{0-\infty env} \times D_{int} / AUC_{0-\infty int} \times D_{env}$$

Donde $AUC_{0-\infty stp}$ y $AUC_{0-\infty env}$ representan el área bajo la curva de niveles en vítreo desde el tiempo 0 hasta infinito (∞), para la vía subtenon y endovenosa respectivamente, D_{int} es la dosis administrada por vía intravítrea, $AUC_{0-\infty int}$ es el área bajo la curva de niveles en vítreo desde el tiempo 0 hasta infinito (∞) para la vía intravítrea; y D_{stp} y D_{env} equivalen a la dosis de memantina administrada por vía subtenon y endovenosa respectivamente, y que en esta experiencia fueron equivalentes.

Así mismo, se calculó la biodisponibilidad vítrea relativa de memantina para la administración periocular subtenon respecto a la administración sistémica endovenosa, en función de la ecuación (Ayalasomayajula, 2004):

$$F_{stp/env} = AUC_{0-\infty stp} / AUC_{0-\infty env}$$

Finalmente el cálculo de la biodisponibilidad vítrea de memantina respecto a los niveles plasmáticos se realizó utilizando la siguiente ecuación (Ayalasomayajula, 2004):

$$F_{Hv/Pl} = AUC_{0-\infty Hv-env} / AUC_{0-\infty Pl-env}$$

Donde $AUC_{0-\infty Hv-env}$ corresponde al área bajo la curva de niveles vítreos desde el tiempo 0 hasta infinito (∞) tras la administración endovenosa en dosis única y $AUC_{0-\infty Pl-env}$ es el área bajo la curva de niveles plasmáticos para esta misma vía.

2.1.8.- Características cinéticas globales de la administración periocular subtenon

2.1.8.1.- Absorción subtenon

La proporción de fármaco administrado que es absorbido localmente, es decir que alcanza directamente el compartimento vítreo, ya sea por difusión transescleral, penetración a través de pars plana o difusión a partir del humor acuoso, fue calculado aplicando la siguiente ecuación (Ayalasomayajula, 2004):

$$\% \text{ absorción-local} = (AUC_{0-\infty (Hv-ipsi)} - AUC_{0-\infty (Hv-contr)}) \times 100 / AUC_{0-\infty (Hv-ipsi)}$$

Siendo $AUC_{0-\infty} (Hv-ipsi)$ el área bajo la curva de niveles vítreos en el ojo administrado y $AUC_{0-\infty} (Hv-contra)$ el área bajo la curva de niveles vítreos del ojo contralateral, tras la administración subtenon posterior.

2.1.8.2.- Pérdida de sustancia del lugar de la administración

Esta experiencia se diseñó siguiendo el modelo establecido por Ghate (2007) y Carcaboso (2007). En ella se utilizaron 4 animales, previamente sacrificados mediante inyección intravenosa de pentobarbital sódico, a los que se administró una dosis de 4.5 mg/animal de memantina, en formulación salina (15 mg/mL) por vía subtenon. Se obtuvieron muestras de humor vítreo a los 60 y 120 minutos postadministración y los niveles vítreos obtenidos se compararon con los alcanzados a los mismos tiempos cinéticos en animales vivos.

2.1.8.3.- Modelo cinético ocular

Usando los datos cinéticos vítreos y plasmáticos obtenidos en los distintos apartados de este trabajo, diseñamos un modelo compartimental para describir el comportamiento cinético periocular global de memantina.

2.2.- ESTUDIO DE TOLERANCIA OCULAR DE MEMANTINA

El estudio de tolerancia tuvo como objetivo evaluar la seguridad y toxicidad ocular de memantina administrada en inyección intravítrea.

2.2.1.- Administración del fármaco

Para el estudio de toxicidad ocular de memantina se utilizaron 6 animales, distribuidos en dos grupos de análisis. Un primer grupo, en el que se incluyeron 2 animales, cuyos ojos fueron analizados a las 24 horas de la inyección, y un segundo grupo de 3 animales, cuyos ojos se analizaron 7 días después de la administración. Como control utilizamos 1 animal cuyos ojos fueron examinados clínicamente a ambos tiempos y procesados histológicamente una vez transcurridos los 7 días.

Se administraron por vía intravítrea 0.1 mL de una solución de memantina 5mg/ml, lo que equivaldría a testar la toxicidad de 0.5 mg/animal de memantina, según la técnica descrita anteriormente para el estudio farmacocinético, bajo sedación-anestesia del animal y aplicación de anestésico tópico en gotas, administrando idéntica dosis a los dos ojos de cada conejo. Se utilizaron como controles 2 ojos, a los que se administró el mismo volumen (0.1 mL) de una solución salina al 0.9% sin principio activo.

Previa a la inyección, y con el animal todavía despierto, se realizó medida de la presión intraocular (PIO) basal y evaluación macroscópica del ojo, para asegurar la viabilidad de los mismos y la ausencia de malformaciones preexistentes. Todos aquellos ojos que presentaron opacidad de medios o lesiones retinianas fueron excluidos del estudio.

2.2.2.- Evaluación clínica

En todos los ojos se realizó medida de la presión intraocular (PIO) en condiciones basales y a los tiempos de seguimiento (24 horas y 7 días postadministración) con el tonómetro de rebote Tonovet[®], que realiza 6 mediciones consecutivas y proporciona el valor promedio de éstas, sin necesidad de anestesia tópica y con el animal despierto.

Se sometió a todos los ojos a una inspección macroscópica, antes del sacrificio, que incluyó biomicroscopía (BMC) del segmento anterior y oftalmoscopia indirecta. En la biomicroscopía del segmento anterior se analizaron los siguientes parámetros: grado de hiperemia y quemosis conjuntival, grado de ingurgitación de los vasos iridianos, y presencia de catarata, especificando el tipo de catarata (nuclear, cortical, subcapsular posterior), la extensión (focal, difusa) y la densidad de la misma. La densidad de la catarata se codificó de 0-3, de la siguiente manera: 0= cristalino transparente, 1= leve opacidad del cristalino que permite visualizar con claridad los detalles del fondo de ojo, 2= opacidad cristaliniiana moderada con oscurecimiento de la visión de los detalles retinianos, y 3= opacidad total del cristalino que impide la visualización de los detalles del fondo de ojo. El examen del fondo de ojo mediante oftalmoscopia indirecta, tras la instilación de una gota de colirio midriático (Colircusí Cicloplégico[®]), incluyó la evaluación de la claridad vítrea, codificada de 0-4 según la escala Vitreous Clarity Score (Cheng, 1999) (que toma como referencia la escala de Nussenblatt de graduación de la turbidez vítrea en las uveítis posteriores en humanos), estableciendo: 0= vítreo claro; 1= turbidez vítrea que produce leve oscurecimiento de los detalles retinianos, 2= turbidez vítrea

moderada que permite visualización de pequeños vasos retinianos, 3= turbidez vítrea importante que sólo permite la visualización de grandes vasos retinianos del polo posterior, 4= importante turbidez vítrea con intuición de la papila óptica. Se analizaron también la presencia de hemorragia vítrea, desprendimientos de retina, hemorragias retinianas, focos de infiltración retiniana, edema de papila y/o signos de fibrosis retiniana.

2.2.3.- Examen histológico

Tras el estudio macroscópico, los animales fueron sacrificados mediante inyección intravenosa de pentobarbital sódico 20% (30 mg/Kg) en la vena mediana. Se enuclearon los dos ojos de cada animal, habiendo marcado previamente con un punto escleral de seda 6/0, el meridiano de las XII-VIh. Una vez libres de tejidos perioculares (músculo, conjuntiva y cápsula de Tenon) y tras su lavado en suero fisiológico, los ojos se incluyeron individualmente en solución de formaldehído al 10%, realizando previamente una inyección intraocular de 0.1 mL de la solución de fijación. Los especímenes fueron enviados al laboratorio de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza para su procesamiento y posterior análisis microscópico.

El estudio histopatológico mediante microscopía óptica y tinción básica con hematoxilina-eosina (H-E), incluyó el análisis de la arquitectura y proporciones de las distintas estructuras del globo ocular, así como la evaluación de la presencia de fenómenos displásicos e inflamatorios, especificando tipos e intensidad de los

mismos, la valoración y cuantificación de fenómenos degenerativos o necróticos, y la presencia de crecimientos celulares anómalos como atrofas o hiperplasias. Finalmente se realizó un análisis comparativo “de visu” de los espesores de las distintas capas celulares de la retina entre los ojos administrados y los ojos control, incluyendo el espesor global de la retina neurosensorial (medida desde la capa de los fotorreceptores a la capa de fibras nerviosas de la retina), y específicamente los espesores de la capa de células ganglionares de la retina (CGR), de la capa nuclear externa (CNE) y de la capa nuclear interna (CNI).

2.3.- NUEVA FORMULACIÓN OFTÁLMICA

Los materiales y metodología utilizados para la elaboración de las nanopartículas de Gantrez AN[®], así como para su caracterización y estudios de rendimiento de encapsulación y liberación in vitro, se muestran en apartado correspondiente del Anexo II.

Así mismo, en el anexo II se describe la metodología seguida en el estudio de tolerancia ocular de las nanopartículas, y se especifica el número de animales destinados a esta parte del estudio, y que no han sido incluidos en el cómputo total, referenciado en párrafos anteriores.

2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los datos experimentales de concentración y los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron expresados como media y desviación estándar

(DE). El análisis estadístico de los resultados se realizó con los programas SPSS 18.0 para Windows, a partir de la importación de los mismos desde una base de datos creada en Excel 2007.

Se verificó si las variables seguían una distribución normal mediante la aplicación de los tests de Kolmogorov-Smirnov y Saphiro-Wilk.

Para la comparación de medias de los parámetros farmacocinéticos entre los grupos se utilizó el test de ANOVA de análisis de la varianza, aplicando un procedimiento de comparaciones múltiples post hoc, con todos los pares de combinaciones posibles, basado en el test de Scheffé o en el test de Dunnett, en función de si las varianzas (evaluadas mediante el test de Levene) entre los grupos eran o no homogéneas. En el caso de los tiempos de vida media de eliminación ($T_{1/2-e}$) y de absorción ($T_{1/2-ab}$), puesto que dichos parámetros no siguieron una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para la comparación de las medias.

Parámetros farmacocinéticos como el volumen de distribución (V_d) o el aclaramiento (C_L) (vítreo y plasmático) fueron normalizados (Pk_{stp_n} y Pk_{int_n}) respecto a la dosis para poder hacer comparaciones entre la vía subtenon y la intravítrea, ya que como se ha mencionado, la dosis de memantina administrada por cada una de ellas fue distinta.

Normalización de los parámetros cinéticos resultantes de la administración subtenon (stp):

$$Pk_{stp_n} = Pk_{stp} \times D_{int}/D_{stp}$$

Normalización de los parámetros cinéticos resultantes de la administración intravítrea (int):

$$Pk_{int_n} = Pk_{int} \times D_{stp}/D_{int}$$

Un nivel de significación $p < 0.05$ ha sido considerado como estadísticamente significativo para todos los análisis.

IV

RESULTADOS

1.- METODOLOGÍA ANALÍTICA

Todos los datos sobre la metodología analítica empleada para la determinación de memantina en plasma y humor vítreo se recogen en el artículo que figura como Anexo I, y que significó la puesta a punto del método analítico, imprescindible como paso previo al desarrollo del estudio farmacocinético.

La base de la analítica fue la aplicación de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con reacción de derivatización precolumna con FMOC-CL y utilización de rimantadina como estándar interno. Se optimizaron la reacción de derivatización y las condiciones de extracción, y se validó el método analítico en términos de selectividad, linealidad, reproducibilidad, precisión, exactitud, robustez y estabilidad; para su posterior utilización en la determinación de memantina en muestras de humor vítreo y plasma.

Brevemente, los resultados que se presentan, muestran que las condiciones óptimas de derivatización con FMOC-Cl (fluoroenilmetil cloroformiato) fueron: una concentración de FMOC-Cl de 1.5 mM, un tiempo de reacción de 20 minutos a 30° C de temperatura, llevando la reacción a un pH de 8.5 mediante la adición de tampón borato.

Una vez realizada la reacción de derivatización, en las condiciones antes reseñadas, las muestras de plasma y humor vítreo fueron extraídas usando n-hexano, evaporadas a sequedad y reconstituidas en acetonitrilo. Las condiciones cromatográficas fueron: columna Novapack C18, fase móvil acetonitrilo/agua 73:27 (v/v) a un flujo de 1.2 mL/minuto, y detección por fluorescencia (λ_{ex} = 260 nm y λ_{em} = 315 nm) usando rimantadina como estándar interno, siendo los tiempos de retención 10.5 y 12 minutos para memantina y rimantadina, respectivamente. El tiempo total de análisis no excedió en ningún caso los 15 minutos.

Las rectas de calibración se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados de los valores del cociente entre la altura-pico del cromatograma para memantina y la altura-pico del cromatograma de rimantadina, para un rango de concentraciones de memantina comprendido entre 10-1000 ng/mL, dando lugar a las siguientes ecuaciones:

$$y = 0.0272 x - 0.3475 (r^2 = 0.9971); \text{ para humor vítreo}$$

$$y = 0.0198 x - 0.0087 (r^2 = 0.9987); \text{ para plasma}$$

La relación entre las distintas concentraciones de memantina y el cociente de alturas-pico memantina/rimantadina en el cromatograma, resultó lineal en el intervalo de concentraciones ensayadas (10-1000 ng/mL).

Los resultados del estudio de precisión y exactitud del método analítico a las diferentes concentraciones ensayadas (10-1000 ng/mL) pueden observarse en la tabla II del Anexo I, destacando que los coeficientes de variación intra- e interensayo no

superaron el 10% en ninguno de los casos (plasma y/o humor vítreo), y que la exactitud del método se encontró entre el 94-105.5%.

El límite de detección (LD) fue determinado como la concentración más baja de memantina capaz de producir una ratio señal/ruido de 3 (S/N= 3), resultando un LD para memantina de 3 ng/mL.

El límite de cuantificación (LQ) del método analítico (S/N= 10) calculado para memantina, en plasma y humor vítreo, fue de 10 ng/mL.

Los resultados del estudio de robustez del método analítico se recogen en la tabla III del Anexo I, en la que se muestra cómo modificaciones menores en las condiciones cromatográficas no indujeron variaciones significativas en los resultados de las mediciones, si tenemos en cuenta que la desviación estándar obtenida para las distintas condiciones probadas (10.87) fue inferior a la propia variabilidad inducida por el método analítico (12.5 en el caso de humor vítreo y 33.9 en el caso de plasma) (tabla II del Anexo I); resultando por tanto un método suficientemente robusto.

2.- FARMACOCINÉTICA PERIOCLAR

2.1.- CINÉTICA VÍTREA

2.1.1.- Ojos Administrados

Las figuras 13, 14 y 15 muestran la evolución de las concentraciones de memantina en humor vítreo para cada una de las formulaciones ensayadas, solución salina (Ss), metilcelulosa 5% (Mc) y polivinilpirrolidona 1% (Pvp), tras la

administración de una dosis de memantina de 4.5 mg/animal, por vía periocular-subtenon posterior (STP).

Las tablas 3, 4 y 5 muestran el valor de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras el ajuste de los datos experimentales a un modelo monocompartimental con absorción, para cada una de las formulaciones, expresados como media y desviación estándar (DE).

En el análisis de los niveles vítreos tras la administración subtenon, vemos como en el caso de la formulación Ss, los niveles de memantina en humor vítreo del ojo administrado, a los 480 minutos, se encontraron por debajo del límite de cuantificación del método analítico, no detectando niveles a los 1440 minutos postinyección. Para la formulación Mc tampoco se detectaron niveles de memantina en vítreo a los 1440 minutos, siendo la concentración media alcanzada a los 480 minutos baja, del orden de los 14 ng/mL. Sólo en el caso de la formulación Pvp se obtuvieron niveles de memantina en vítreo a los 1440 minutos del análisis, situándose éstos entorno a los 20 ng/mL.

Se muestra una cinética vítrea tras la administración subtenon centrada en un modelo monocompartimental con absorción, siendo el proceso de absorción muy rápido para las tres formulaciones. El tiempo de vida media de absorción ($T_{1/2-ab}$) de memantina desde el espacio subtenon a vítreo no superó los 2 minutos en ninguno de los casos (1.1, 1.2 y 0.9 minutos, para la formulación Ss, Mc y Pvp, respectivamente). Las concentraciones máximas (C_{max}) de memantina alcanzadas en vítreo se situaron entre los 35-38 $\mu\text{g/mL}$, siendo el tiempo requerido para su

consecución (T_{\max}) inferior a los 5 minutos, para las tres formulaciones. Los parámetros medios de eliminación también mostraron una rápida eliminación vítrea de memantina tras la administración subtenon, con tiempos de vida media de eliminación ($T_{1/2\text{-el}}$) inferiores a los 15 minutos en los tres casos. Las cifras de aclaramiento vítreo de memantina (C_L) fueron inferiores a los 10 mL/minuto, y los valores medios de las áreas bajo la curva de niveles vítreos ($AUC_{0-\infty}$) estuvieron próximos a los 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ para las tres formulaciones, con volúmenes de distribución (V_d) entorno a los 100 mL.

La comparación estadística de los parámetros farmacocinéticos vítreos, entre las tres formulaciones tras la administración subtenon, no mostró diferencias significativas para ninguno de ellos, destacando el hecho de no encontrar significación estadística entre las formulaciones para los parámetros cinéticos de absorción y de eliminación, respectivamente.

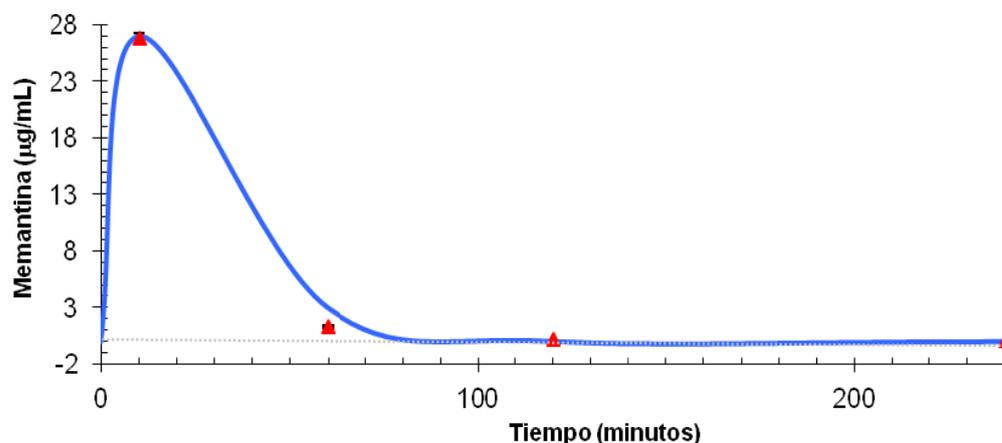


Figura 13: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Ss. (▲) Concentraciones observadas (n=3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Ss						
Parámetro	Unidades	1	2	3	Media	DE
V_d	mL	106.05	94.91	100.25	100.40	5.6
K_{ab}	1/min	0.82	0.82	0.43	0.69	0.2
K_{el}	1/min	0.0535	0.0651	0.0647	0.0611	0.007
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	792.78	728.59	693.90	738.42	50.2
$T_{1/2-ab}$	min	0.85	0.84	1.62	1.10	0.4
$T_{1/2-el}$	min	12.95	10.65	10.72	11.44	1.3
C_{max}	ug/mL	35.06	38.14	32.08	35.09	3.0
T_{max}	min	3.57	3.34	5.19	4.03	1.0
C_L	mL/min	5.68	6.18	6.49	6.11	0.4

Tabla 3: Parámetros farmacocinéticos vítreos tras administración subtenon de memantina en formulación Ss.

* V_d = volumen de distribución; K_{ab} = constante de absorción; K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ y $T_{1/2-el}$ = tiempos de vida media de absorción y eliminación, respectivamente; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento vítreo.

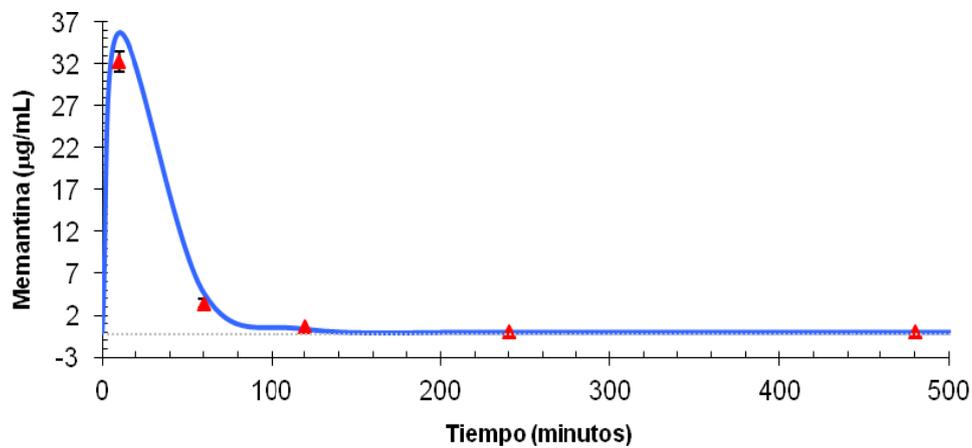


Figura 14: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Mc. (▲) Concentraciones observadas (n=3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Mc						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	89.37	124.20	79.48	97.68	23.5
K_{ab}	1/min	0.33	0.95	0.86	0.71	0.3
K_{el}	1/min	0.0419	0.0470	0.0472	0.0454	0.003
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	1200.89	771.57	1200.11	1057.52	247.6
$T_{1/2-ab}$	min	2.13	0.73	0.80	1.22	0.8
$T_{1/2-el}$	min	16.53	14.76	14.69	15.33	1.0
C_{max}	ug/mL	37.18	30.97	47.87	38.67	8.5
T_{max}	min	7.23	3.34	3.56	4.71	2.2
C_L	mL/min	3.75	5.83	3.75	4.44	1.2

Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos vítreos tras administración subtenon de memantina en formulación Mc.

* V_d = volumen de distribución; K_{ab} = constante de absorción; K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ y $T_{1/2-el}$ = tiempos de vida media de absorción y eliminación, respectivamente; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento vítreo.

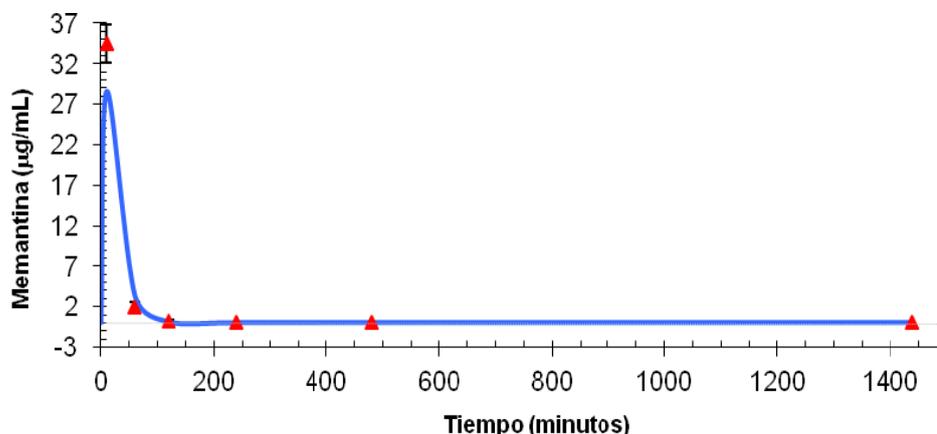


Figura 15: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Pvp. (▲) Concentraciones observadas (n=3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Pvp						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	101.40	112.68	89.79	101.29	11.4
K_{ab}	1/min	0.77	0.98	0.69	0.82	0.1
K_{el}	1/min	0.0507	0.0486	0.0640	0.0545	0.008
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	875.56	820.97	782.53	826.35	46.7
$T_{1/2-ab}$	min	0.89	0.71	1.01	0.87	0.2
$T_{1/2-el}$	min	13.68	14.25	10.82	12.92	1.8
C_{max}	ug/mL	36.67	34.14	39.29	36.70	2.6
T_{max}	min	3.77	3.22	3.80	3.60	0.3
C_L	mL/min	5.14	5.48	5.75	5.46	0.3

Tabla 5: Parámetros farmacocinéticos vítreos tras administración subtenon de memantina en formulación Pvp.

* V_d = volumen de distribución; K_{ab} = constante de absorción; K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ y $T_{1/2-el}$ = tiempos de vida media de absorción y eliminación, respectivamente; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento vítreo.

2.1.2.- Ojos contralaterales

En las figuras 16, 17 y 18 se muestra la evolución de las concentraciones de memantina alcanzadas en humor vítreo de los ojos contralaterales tras la administración periocular STP (4.5 mg/animal) de las distintas formulaciones (Ss, Mc y Pvp); representando las concentraciones medias de memantina, observadas para los distintos tiempos de muestreo. Los datos experimentales de concentración en los ojos contralaterales fueron muy bajos, y los tiempos de muestreo con niveles detectables limitados, lo que no permitió realizar el ajuste de los datos a un modelo cinético concreto.

En las tablas 6, 7 y 8 se muestran parámetros cinéticos básicos de eliminación (K_{el} , $T_{1/2-el}$, C_L) calculados matemáticamente, así como los valores de concentración máxima (C_{max}) y de área bajo la curva de niveles vítreos ($AUC_{0-\infty}$), para cada una de las formulaciones, expresados como media y desviación estándar (DE).

Tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal de memantina sólo se detectaron niveles en vítreo de los ojos contralaterales hasta los 240 minutos postadministración, con las tres formulaciones. Los parámetros medios de eliminación denotaron una eliminación vítrea de memantina en los ojos contralaterales más lenta que en los ojos administrados, con tiempos de vida media de eliminación ($T_{1/2-el}$) entorno a las 1.5-2.5 horas, no encontrando diferencias significativas entre las formulaciones. Así mismo, observamos que las

concentraciones máximas (C_{\max}) de memantina alcanzadas en vítreo de los ojos contralaterales fueron muy bajas, del orden de los 50-70 ng/mL, y que los valores medios de los AUC's de niveles vítreos también fueron bajos, entre 7-12 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre las tres formulaciones, en ninguno de los casos.

Cuando se comparan los resultados de los parámetros cinéticos vítreos entre los ojos administrados y los contralaterales tras la administración subtenon, vemos cómo en los ojos contralaterales la cinética de eliminación vítreo de memantina es más lenta, con existencia de diferencias significativas respecto a los ojos administrados, en el valor medio de las constantes de eliminación (K_{el}) (IC 95% [0.038, 0.071] para la formulación Ss, [0.024, 0.057] para la formulación Mc y [0.027, 0.061] para Pvp), y de los tiempos de vida media ($T_{1/2-el}$) ($p=0.050$), para las tres formulaciones. Por su parte, los valores medios de C_{\max} mostraron diferencias significativas entre los ojos administrados y los contralaterales, siendo éstos menores en el caso de los ojos contralaterales (IC 95% [23.00, 47.05], [26.60, 50.65] y [24.60, 48.66] para cada una de las formulaciones Ss, Mc y Pvp, respectivamente); y los valores de los AUC's de niveles vítreos fueron también menores en los ojos contralaterales (IC 95% [440.11, 1014.10], [-368.12, 2460.51], [551.85, 1086.29] para cada una de las formulaciones), justificándose la ausencia de significación estadística para la formulación Mc por la variabilidad de los datos experimentales en la administración subtenon, que hace que el valor medio de dicho parámetro se vea arrastrado por los valores extremos de los sujetos 1 y 3. Las cifras de aclaramiento (C_L) vítreo de memantina en los ojos contralaterales fueron muy superiores a las de los ojos administrados, situándose

entre los 400-650 mL/minuto, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos para las tres formulaciones (IC 95% [-682.11, -142.87], [-674.53, -135.29], [-913.20, -373.96] para las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente).

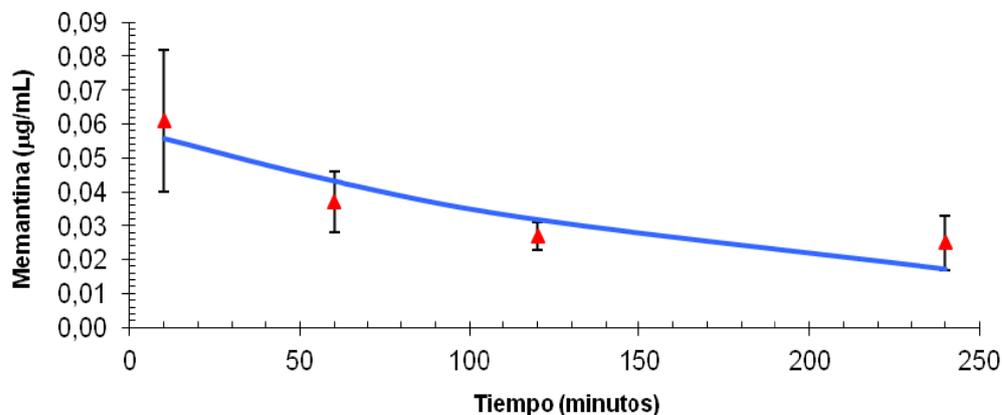


Figura 16: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo de los ojos contralaterales, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Ss. (▲) Concentraciones observadas (n=3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Ss						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
K_{el}	1/min	0.0044	0.0092	0.0062	0.0066	0.002
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	13.85	8.07	12.04	11.32	3.0
$T_{1/2-el}$	min	156.10	75.56	112.00	114.55	40.3
C_{max}	ug/mL	0.062	0.074	0.075	0.070	0.007
C_L	mL/min	324.91	557.31	373.61	418.61	122.6

Tabla 6: Parámetros farmacocinéticos tras administración subtenon de memantina en formulación Ss, en vítreo de los ojos contralaterales.

* K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; C_{max} = concentración máxima; y C_L = aclaramiento vítreo.

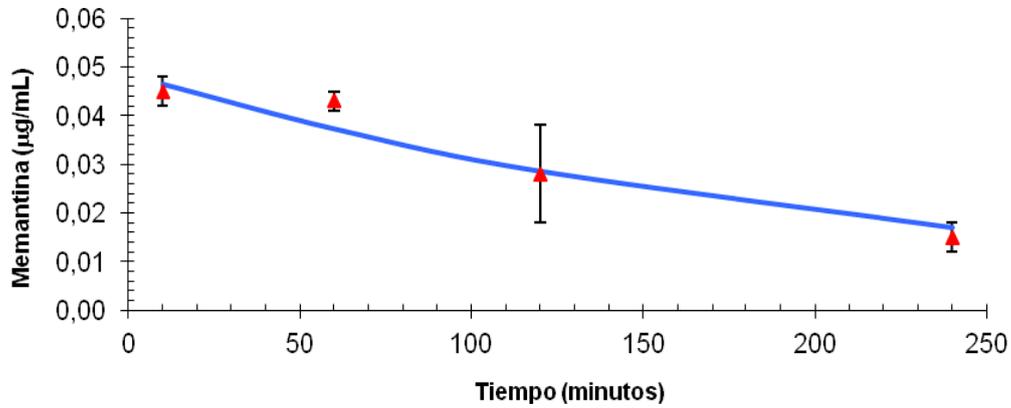


Figura 17: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo de los ojos contralaterales, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Mc. (▲) Concentraciones observadas (n=3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Mc						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
K_{el}	1/min	0.0036	0.0055	0.0042	0.0044	0.001
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	14.12	9.31	10.56	11.33	2.5
$T_{1/2-el}$	min	194.82	125.84	164.11	161.59	34.6
C_{max}	ug/mL	0.050	0.051	0.045	0.049	0.003
C_L	mL/min	318.59	483.30	426.16	409.35	83.6

Tabla 7: Parámetros farmacocinéticos tras administración subtenon de memantina en formulación Mc, en vítreo de los ojos contralaterales.

* K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; C_{max} = concentración máxima; y C_L = aclaramiento vítreo.

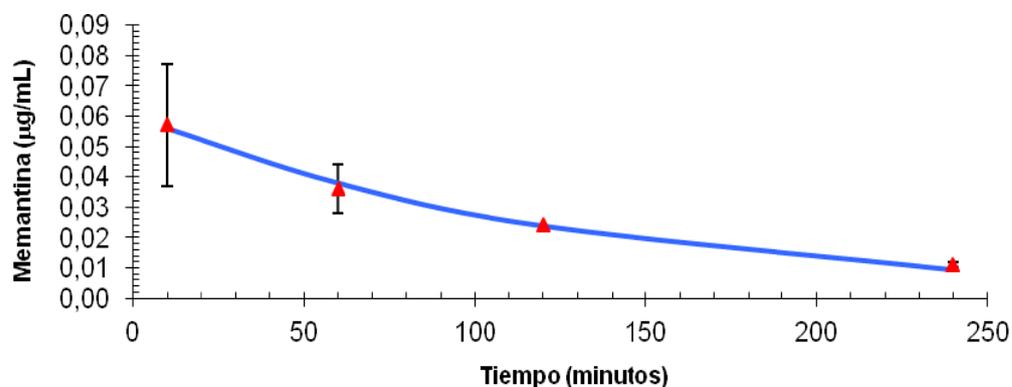


Figura 18: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo de los ojos contralaterales, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Pvp. (▲) Concentraciones observadas (n=3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Pvp						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
K_{el}	1/min	0.0048	0.0090	0.0162	0.0100	0.006
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	9.55	6.67	5.62	7.28	2.0
$T_{1/2-el}$	min	144.33	77.30	42.82	88.15	51.6
C_{max}	ug/mL	0.046	0.060	0.091	0.065	0.023
C_L	mL/min	471.07	674.82	801.21	649.03	166.6

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos tras administración subtenon de memantina en formulación Pvp, en vítreo de los ojos contralaterales.

* K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; C_{max} = concentración máxima; y C_L = aclaramiento vítreo.

2.2.- CINÉTICA PLASMÁTICA

En las figuras 19, 20 y 21 se muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas de memantina tras la administración de una dosis de 4.5 mg/animal por vía subtenon posterior, para cada una de las formulaciones ensayadas (Ss, Mc y Pvp), ajustadas a un modelo bicompartimental con absorción. Las tablas 9, 10 y 11 recogen los parámetros farmacocinéticos resultantes de dicho ajuste, para cada una de las formulaciones, expresados como media y desviación estándar (DE).

La cinética plasmática de memantina tras la administración STP respondió a un modelo bicompartimental con absorción, mostrando un paso rápido de la sustancia a sangre, con tiempos de vida media de absorción ($T_{1/2-ab}$) que se situaron entorno a los 2 minutos para la formulación Ss (2.1 minutos) y los 5 minutos para las formulaciones Mc y Pvp (4.8 y 4.9 minutos, respectivamente). Las concentraciones máximas (C_{max}) de memantina en plasma tras la administración subtenon fueron muy bajas, y oscilaron entre los 150-230 ng/mL, siendo el tiempo requerido para alcanzar dichas concentraciones máximas (T_{max}) de 7-15 minutos aproximadamente. Las semividas de eliminación plasmática ($T_{1/2-\beta}$) dieron lugar a valores medios aproximados de 387, 703 y 895 minutos, para las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente; no encontrando diferencias significativas en las cinéticas de absorción y eliminación plasmática entre las tres formulaciones ensayadas.

La comparación de los datos medios de los AUC's de niveles plasmáticos de memantina tras la administración subtenon, los cuales se situaron próximos a los 30-35 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ para las formulaciones Ss y Mc y a los 70 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ para la formulación Pvp, no mostró diferencias significativas entre ellas, al igual que tampoco se encontraron diferencias significativas en los aclaramientos plasmáticos (C_L), cuyas cifras no superaron los 200 mL/minuto con ninguna de las formulaciones. Las constantes de transferencia y retorno (K_{12} y K_{21}) mostraron una alta velocidad de distribución de memantina del compartimento central al periférico tras la administración subtenon, de acuerdo con el resultado del cociente K_{12}/K_{21} cuyos valores medios oscilaron entre 2-5, observando una distribución más rápida para la formulación Ss respecto a las otras dos formulaciones, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

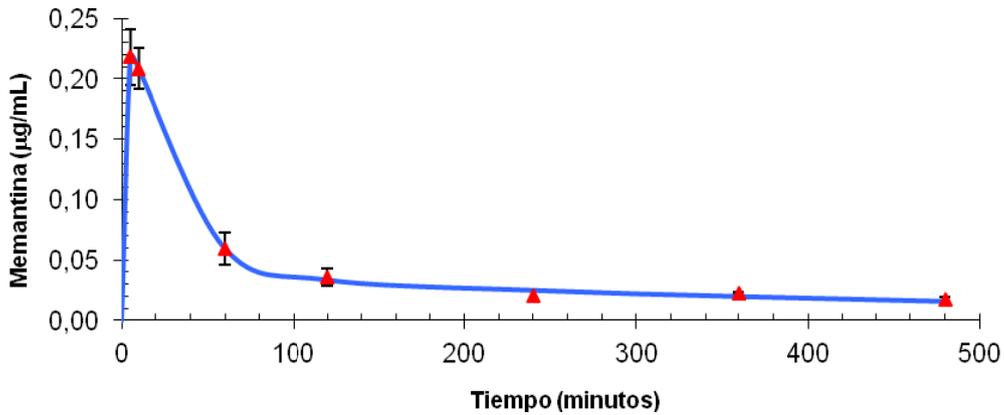


Figura 19: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en plasma, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Ss. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos Formulación Ss						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
K_{ab}	1/min	0.34	0.43	0.26	0.34	0.1
K_{12}	1/min	0.095	0.016	0.028	0.046	0.043
K_{21}	1/min	0.020	0.004	0.006	0.010	0.009
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	23.92	29.02	26.72	26.56	2.6
$T_{1/2-ab}$	min	2.06	1.61	2.65	2.11	0.5
α	1/min	0.13	0.03	0.04	0.07	0.1
β	1/min	0.0027	0.0014	0.0017	0.0019	0.001
$T_{1/2-\alpha}$	min	5.32	25.45	15.43	15.40	10.1
$T_{1/2-\beta}$	min	255.67	498.08	406.31	386.69	122.4
A	ug/mL	0.59	0.23	0.35	0.39	0.2
B	ug/mL	0.06	0.03	0.03	0.04	0.015
V_1	mL	10704.42	18224.78	13959.24	14296.15	3771.5
V_2	mL	50763.29	64079.33	61993.30	58945.30	7162.2
C_{max}	ug/mL	0.24	0.21	0.23	0.23	0.018
T_{max}	min	5.04	7.11	8.55	6.90	1.8
C_L	mL/min	188.10	155.05	168.40	170.52	16.6

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos tras administración subtenon de memantina en formulación Ss.

* K_{ab} = constante de absorción; K_{12} = constante de transferencia o distribución del compartimento central al compartimento periférico; K_{21} = constante de retorno del compartimento periférico al central; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva de niveles plasmáticos entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ = tiempo de vida media de absorción; α = constante rápida de distribución/eliminación; β = constante lenta de eliminación/distribución; $T_{1/2-\alpha}$ = tiempo de vida media de distribución y $T_{1/2-\beta}$ = tiempo de vida media de eliminación; A y B= coeficientes de la ecuación de ajuste; V_1 = volumen de distribución del compartimento central; V_2 = volumen de distribución del compartimento periférico; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento plasmático.

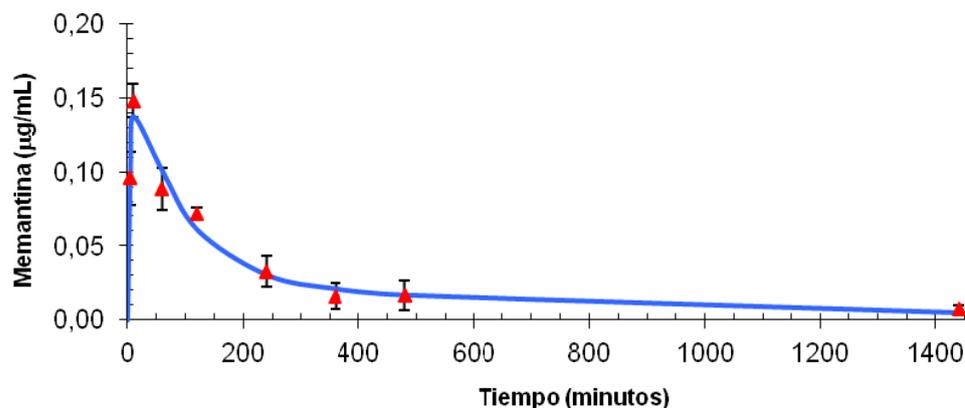


Figura 20: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en plasma, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Mc. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos Formulación Mc						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
K_{ab}	1/min	0.08	0.16	0.46	0.23	0.2
K_{12}	1/min	0.022	0.006	0.001	0.010	0.011
K_{21}	1/min	0.013	0.001	0.001	0.005	0.007
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	30.81	40.96	25.64	32.47	7.8
$T_{1/2-ab}$	min	8.42	4.36	1.50	4.76	3.5
α	1/min	0.043	0.011	0.007	0.020	0.02
β	1/min	0.0031	0.0006	0.0011	0.0016	0.001
$T_{1/2-\alpha}$	min	16.22	61.87	97.84	58.64	40.9
$T_{1/2-\beta}$	min	221.42	1246.12	640.79	702.78	515.2
A	ug/mL	0.478	0.187	0.127	0.264	0.2
B	ug/mL	0.083	0.014	0.009	0.035	0.041
V_1	mL	14544.40	23885.75	33748.72	24059.63	9603.3
V_2	mL	24565.60	102351.48	34183.39	53700.16	42406.8
C_{max}	ug/mL	0.17	0.16	0.13	0.15	0.024
T_{max}	min	19.90	18.42	9.31	15.88	5.7
C_L	mL/min	146.05	109.87	175.49	143.81	32.9

Tabla 10: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos tras administración subtenon de memantina en formulación Mc.

* K_{ab} = constante de absorción; K_{12} = constante de transferencia o distribución del compartimento central al compartimento periférico; K_{21} = constante de retorno del compartimento periférico al central; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva de niveles plasmáticos entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ = tiempo de vida media de absorción; α = constante rápida de distribución/eliminación; β = constante lenta de eliminación/distribución; $T_{1/2-\alpha}$ = tiempo de vida media de distribución y $T_{1/2-\beta}$ = tiempo de vida media de eliminación; A y B= coeficientes de la ecuación de ajuste; V_1 = volumen de distribución del compartimento central; V_2 = volumen de distribución del compartimento periférico; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento plasmático.

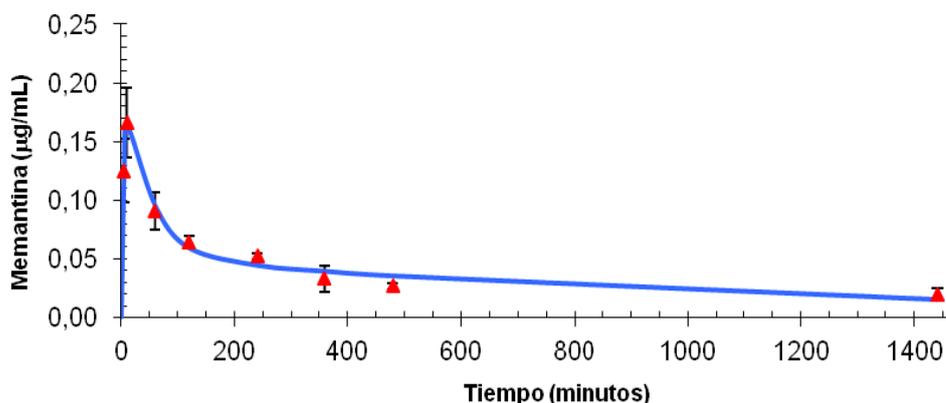


Figura 21: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en plasma, tras la administración subtenon de 4.5 mg/animal en formulación Pvp. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos Formulación Pvp						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
K_{ab}	1/min	0.14	0.32	0.09	0.18	0.1
K_{12}	1/min	0.010	0.014	0.047	0.023	0.020
K_{21}	1/min	0.006	0.005	0.011	0.007	0.003
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	62.15	98.32	52.49	70.98	24.2
$T_{1/2-ab}$	min	5.02	2.15	7.78	4.98	2.8
α	1/min	0.018	0.020	0.065	0.034	0.027
β	1/min	0.0011	0.0004	0.0014	0.0010	0.001
$T_{1/2-\alpha}$	min	39.23	35.01	10.67	28.30	15.4
$T_{1/2-\beta}$	min	647.26	1555.48	481.32	894.69	578.2
A	ug/mL	0.159	0.156	1.404	0.573	0.7
B	ug/mL	0.059	0.041	0.068	0.056	0.014
V_1	mL	22846.82	24068.35	10060.10	18991.76	7759.1
V_2	mL	36740.74	71088.82	42983.18	50270.91	18297.0
C_{max}	ug/mL	0.155	0.161	0.210	0.175	0.03
T_{max}	min	19.43	9.96	14.95	14.78	4.7
C_L	mL/min	72.41	45.77	85.73	67.97	20.3

Tabla 11: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos tras administración subtenon de memantina en formulación Pvp.

* K_{ab} = constante de absorción; K_{12} = constante de transferencia o distribución del compartimento central al compartimento periférico; K_{21} = constante de retorno del compartimento periférico al central; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva de niveles plasmáticos entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ = tiempo de vida media de absorción; α = constante rápida de distribución/eliminación; β = constante lenta de eliminación/distribución; $T_{1/2-\alpha}$ = tiempo de vida media de distribución y $T_{1/2-\beta}$ = tiempo de vida media de eliminación; A y B= coeficientes de la ecuación de ajuste; V_1 = volumen de distribución del compartimento central; V_2 = volumen de distribución del compartimento periférico; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento plasmático.

3.- FARMACOCINÉTICA INTRAVÍTREA

3.1.- CINÉTICA VÍTREA

Los niveles de memantina alcanzados en vítreo tras administración intravítrea de las distintas formulaciones (Ss, Mc y Pvp) han sido ajustados a un modelo monocompartimental sin absorción. Las figuras 22, 23 y 24 representan la evolución en el tiempo de las concentraciones vítreas correspondientes a cada una de ellas; y en las tablas 12, 13 y 14 se muestran los parámetros farmacocinéticos vítreos resultantes, para cada una de las formulaciones, expresados como media y desviación estándar (DE).

Los niveles vítreos alcanzados tras la administración intravítrea de 1.5 mg/animal de memantina, experimentaron un rápido descenso hasta los 120 minutos, manteniendo después niveles más estables, aunque bastante inferiores a los iniciales, entre los 480 minutos y las 24 horas postadministración.

Se alcanzaron tiempos de vida media de eliminación ($T_{1/2-el}$) próximos a los 110 minutos para la formulación Ss (105.5 minutos), a los 50 minutos para la formulación Mc (47.8 minutos) y a los 60 minutos para la formulación Pvp (60.1 minutos), no encontrando diferencias significativas entre las formulaciones al comparar los parámetros cinéticos de eliminación (K_{el} y $T_{1/2-el}$), y observando una cinética de eliminación más lenta para la formulación Ss respecto a las otras dos

formulaciones. Los AUC's de niveles vítreos tras la administración intravítrea mostraron valores altos que oscilaron entre los 49-70 mg*min/mL, con cifras de aclaramiento vítreo (C_L) muy bajas para las tres formulaciones, del orden de los 30 μ L/minuto, coincidiendo con unos volúmenes de distribución (V_d) muy bajos, que no alcanzaron los 10 mL en ninguno de los casos, no encontrando diferencias significativas entre las formulaciones para ninguno de estos parámetros.

Al comparar la cinética vítreo de memantina tras la administración subtenon e intravítrea se encontraron diferencias significativas en el valor medio de los parámetros de eliminación, K_{el} y $T_{1/2-el}$ (IC 95% para K_{el} [0.038, 0.071], [0.014, 0.047], [0.025, 0.058] para las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente; y $p=0.008$ para $T_{1/2-el}$), mostrando una eliminación más lenta de la sustancia tras la administración intravítrea, con las tres formulaciones. Las cifras de aclaramiento vítreo normalizadas por la dosis (C_{L_n}) tras la administración subtenon (2.04, 1.48, 1.82 para las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente) fueron superiores a las de la vía intravítrea (0.097, 0.068, 0.094 para cada una de las formulaciones respectivamente), encontrando diferencias significativas entre ambas vías (C_{L_n}) (IC 95% [1.37, 2.52], [0.84, 1.99], [1.15, 2.30] para las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente). Por su parte, los volúmenes de distribución normalizados por la dosis (V_{d_n}) obtenidos tras la administración intravítrea (15.41, 4.73, 8.52 mL/minuto para las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente) fueron inferiores a los alcanzados tras la administración subtenon (33.47, 32.56, 33.76 mL/ μ g respectivamente), encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambas vías para las formulaciones Mc y Pvp (IC 95% [-0.21, 36.32], [9.56, 46.10],

[6.98, 43.51] para las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente). La ausencia de significación estadística para esta diferencia en el caso de la formulación Ss se justifica por la variabilidad de los datos experimentales para esta formulación en la administración intravítrea, que hace que el valor medio de dicho parámetro se vea arrastrado por los valores extremos de los sujetos 1 y 2.

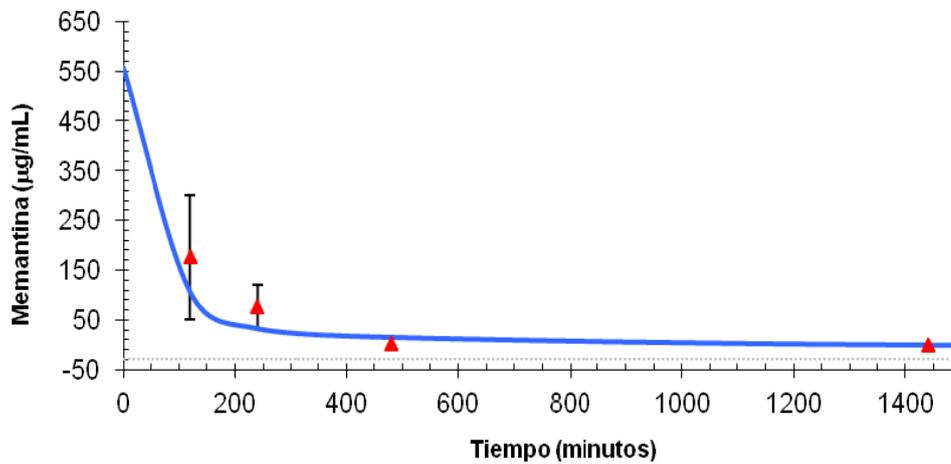


Figura 22: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo, tras la administración intravítrea de 1.5 mg/animal en formulación Ss. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Ss						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	7.43	6.24	1.74	5.14	3.0
K_{el}	1/min	0.005	0.007	0.008	0.007	0.001
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	37908.81	35318.16	105210.12	59479.03	39625.5
$T_{1/2-el}$	min	130.14	101.85	84.37	105.45	23.1
C_L	mL/min	0.040	0.043	0.014	0.032	0.016

Tabla 12: Parámetros farmacocinéticos vítreos de memantina tras administración intravítrea en formulación Ss.

* V_d = volumen de distribución; K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; y C_L = aclaramiento vítreo.

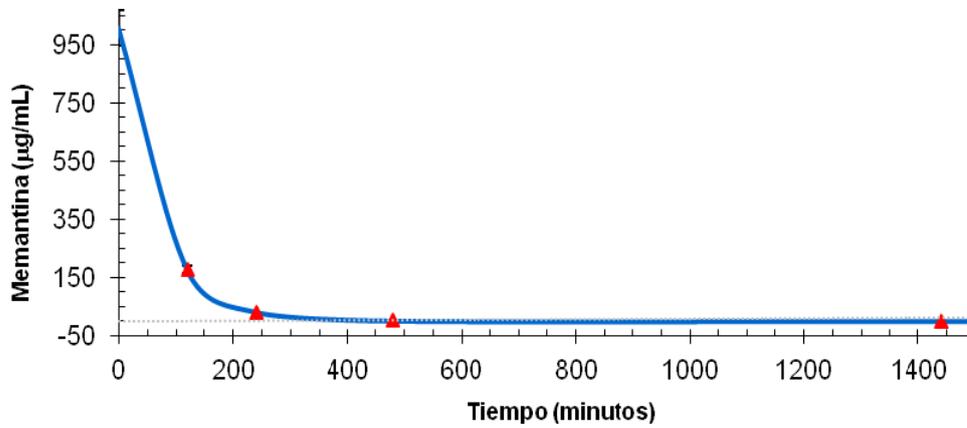


Figura 23: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo, tras la administración intravítrea de 1.5 mg/animal en formulación Mc. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Mc						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	1.67	2.03	1.03	1.58	0.5
K_{el}	1/min	0.016	0.013	0.015	0.015	0.002
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	55548.44	57594.89	98262.15	70468.49	24091.8
$T_{1/2-el}$	min	42.76	54.07	46.69	47.84	5.7
C_L	mL/min	0.027	0.026	0.015	0.023	0.007

Tabla 13: Parámetros farmacocinéticos vítreos de memantina tras administración intravítrea en formulación Mc.

* V_d = volumen de distribución; K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; y C_L = aclaramiento vítreo.

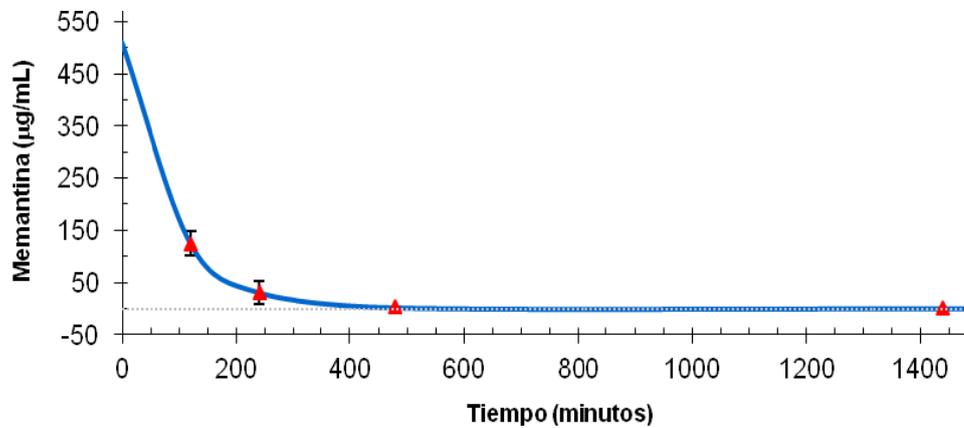


Figura 24: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en vítreo, tras la administración intravítrea de 1.5 mg/animal en formulación Pvp. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos Formulación Pvp						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	2.16	4.93	1.43	2.84	1.8
K_{el}	1/min	0.016	0.007	0.016	0.013	0.005
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	43180.76	41570.27	64138.35	49629.79	12590.6
$T_{1/2-el}$	min	43.16	94.80	42.45	60.13	30.0
C_L	mL/min	0.035	0.036	0.023	0.031	0.007

Tabla 14: Parámetros farmacocinéticos vítreos de memantina tras administración intravítrea en formulación Pvp.

* V_d = volumen de distribución; K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; y C_L = aclaramiento vítreo.

3.2.- CINÉTICA PLASMÁTICA

Los datos de concentraciones plasmáticas tras la administración intravítrea de cada una de las tres formulaciones se representan en las figuras 25, 26 y 27 tras el ajuste de los niveles a un modelo monocompartimental con absorción. Las tablas 15, 16 y 17 muestran los resultados de los parámetros farmacocinéticos resultantes de dichos ajustes, expresados como media y desviación estándar (DE).

El perfil cinético plasmático de memantina tras la administración intravítrea mostró un paso rápido de la sustancia a sangre, con tiempos de vida media de absorción ($T_{1/2-ab}$) inferiores a los 15 minutos para las tres formulaciones. Las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) alcanzadas tras la administración intravítrea fueron muy bajas, oscilando entre los 19.2-35.5 ng/mL, siendo los tiempos requeridos para su consecución (T_{max}) inferiores a los 50 minutos, en los tres casos.

La cinética comparativa entre las tres formulaciones no estableció diferencias significativas en la absorción plasmática de memantina tras la administración intravítrea, siendo esta más lenta para la formulación Ss que para las otras dos formulaciones. Respecto a la eliminación, la formulación Mc fue la que presentó la cinética de eliminación plasmática más lenta de las tres formulaciones, con un tiempo de vida media de eliminación ($T_{1/2-el}$) próximo a las 10 horas, no existiendo significación estadística en esta diferencia respecto a las otras dos formulaciones. El aclaramiento plasmático (C_L) de memantina tras la administración intravítrea fue alto, alcanzando casi los 300 mL/minuto para la formulación Ss, los 90 mL/minuto

para la formulación Mc y los 200 mL/minuto para la formulación Pvp, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas. El valor medio del AUC de niveles plasmáticos obtenido para la formulación Mc fue superior al de las otras dos formulaciones (5.9, 17.5 y 8.4) $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ para la formulación Ss, Mc y Pvp respectivamente), no siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Al comparar la cinética plasmática de memantina tras la administración subtenon e intravítrea, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de absorción (K_{ab} y $T_{1/2-ab}$) entre ambas vías, siendo más lenta la absorción plasmática de memantina tras la administración intravítrea que tras la administración subtenon. Por su parte, la cinética de eliminación plasmática de memantina tras la administración intravítrea fue también más lenta que tras la administración subtenon, si bien, en este caso tampoco se encontraron diferencias significativas en los parámetros de eliminación plasmática (K_{el} y $T_{1/2-el}$) entre ambas vías, para ninguna de las formulaciones ensayadas.

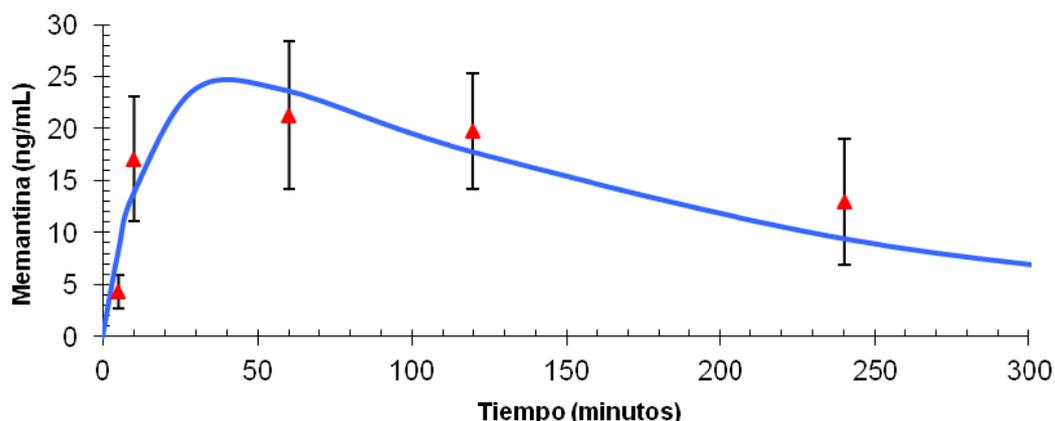


Figura 25: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en plasma, tras la administración intravítrea de 1.5 mg/animal en formulación Ss. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos Formulación Ss						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	36304.89	50647.91	67316.96	51423.25	15520.6
K_{ab}	1/min	0.057	0.066	0.065	0.063	0.005
K_{el}	1/min	0.0059	0.0042	0.0064	0.0055	0.001
$AUC_{0-\infty}$	min*ng/mL	6969.75	7128.48	3499.13	5865.79	2051.1
$T_{1/2-ab}$	min	12.17	10.56	10.62	11.12	0.9
$T_{1/2-el}$	min	116.93	166.84	108.85	130.87	31.4
C_{max}	ng/mL	31.77	24.58	17.33	24.56	7.2
T_{max}	min	44.34	44.89	39.52	42.92	3.0
C_L	mL/min	215.22	210.42	428.68	284.77	124.6

Tabla 15: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos tras administración intravítrea de memantina en formulación Ss.

* V_d = volumen de distribución; K_{ab} =constante de absorción; K_{el} = constante de eliminación $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ = tiempo de vida media de absorción; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento plasmático.

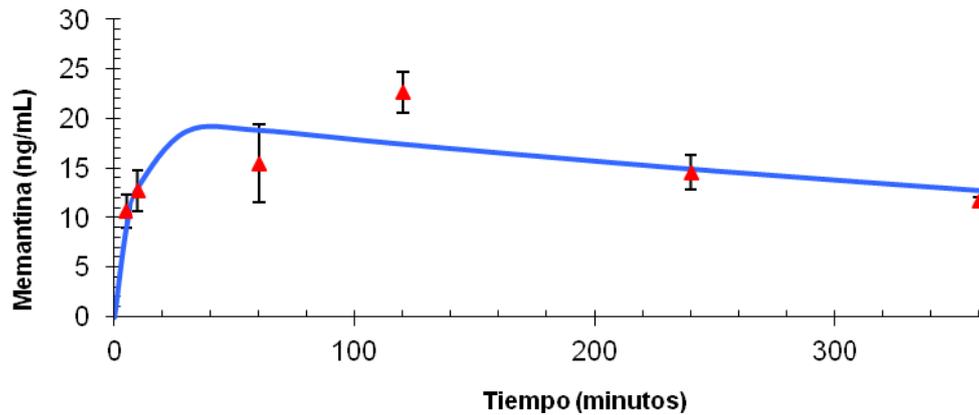


Figura 26: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en plasma, tras la administración intravítrea de 1.5 mg/animal en formulación Mc. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos Formulación Mc						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	94571.94	73213.57	61571.43	76452.31	16737.0
K_{ab}	1/min	0.131	0.136	0.103	0.123	0.018
K_{el}	1/min	0.0007	0.0014	0.0017	0.0013	0.001
$AUC_{0-\infty}$	min*ng/mL	23730.93	14732.27	14157.70	17540.30	5368.9
$T_{1/2-ab}$	min	5.29	5.09	6.72	5.70	0.9
$T_{1/2-el}$	min	1037.08	498.42	402.82	646.10	342.0
C_{max}	ng/mL	15.44	19.54	22.73	19.24	3.7
T_{max}	min	40.52	34.01	40.35	38.29	3.7
C_L	mL/min	63.21	101.82	105.95	90.33	23.6

Tabla 16: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos tras administración intravítrea de memantina en formulación Mc.

* V_d = volumen de distribución; K_{ab} =constante de absorción; K_{el} = constante de eliminación $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ = tiempo de vida media de absorción; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento plasmático.

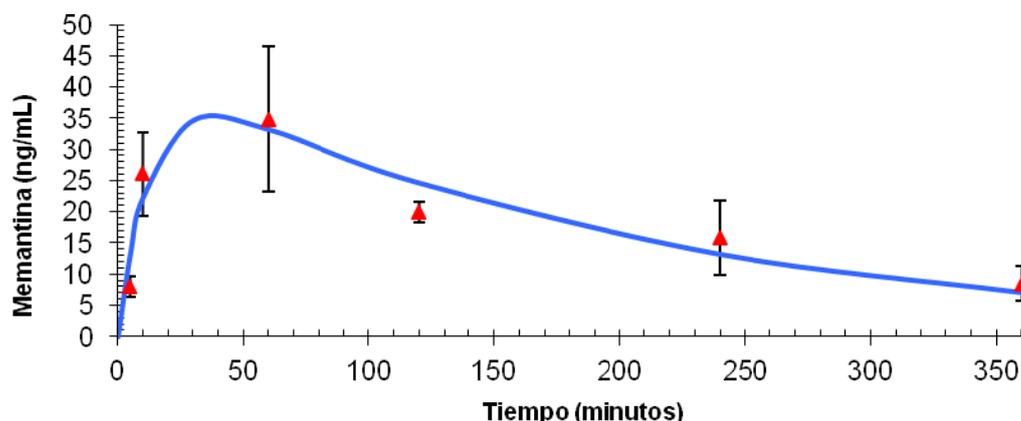


Figura 27: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en plasma, tras la administración intravítrea de 1.5 mg/animal en formulación Pvp. (▲) Concentraciones observadas (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos Formulación Pvp						
Parámetro	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	37326.79	25457.62	46786.94	36523.78	10687.3
K_{ab}	1/min	0.075	0.067	0.095	0.079	0.014
K_{el}	1/min	0.0038	0.0072	0.0050	0.0053	0.002
$AUC_{0-\infty}$	min*ng/mL	10645.61	8127.73	6403.20	8392.18	2133.5
$T_{1/2-ab}$	min	9.19	10.35	7.32	8.95	1.5
$T_{1/2-el}$	min	183.62	95.61	138.44	139.22	44.0
C_{max}	ng/mL	34.32	44.98	27.21	35.50	8.9
T_{max}	min	41.81	37.23	32.77	37.27	4.5
C_L	mL/min	140.90	184.55	234.26	186.57	46.7

Tabla 17: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos tras administración intravítrea de memantina en formulación Pvp.

* V_d = volumen de distribución; K_{ab} =constante de absorción; K_{el} = constante de eliminación $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ = tiempo de vida media de absorción; $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de eliminación; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento plasmático.

4.- FARMACOCINÉTICA ENDOVENOSA: DOSIS ÚNICA

4.1.- CINÉTICA VÍTREA

Los datos de concentración de memantina en vítreo tras la administración de una dosis única de memantina de 4.5 mg/animal en formulación salina (Ss) por vía endovenosa, se ajustaron a un modelo monocompartimental con absorción. La figura 28 muestra la evolución de las concentraciones de memantina en vítreo a los distintos tiempos de muestreo, tras la administración sistémica endovenosa en bolo. La tabla 18 muestra los parámetros farmacocinéticos vítreos resultantes del ajuste, expresados como media y desviación estándar (DE).

El perfil cinético vítreo de memantina tras la administración sistémica endovenosa respondió a un modelo monocompartimental con una rápida absorción, que mostró tiempos de vida media de absorción ($T_{1/2-ab}$) próximos a los 7 minutos. La concentración máxima (C_{max}) de memantina en vítreo tras la administración endovenosa estuvo próxima a los 100 ng/mL, siendo el tiempo requerido para su consecución (T_{max}) aproximadamente de 30 minutos. Por esta vía, se obtuvo un alto volumen de distribución (V_d) de casi 42.5 L, con cifras de aclaramiento altas (173.4 mL/minuto) y una semivida de eliminación ($T_{1/2-el}$) de casi 3 horas. El valor medio del AUC de niveles vítreos tras la administración endovenosa fue bajo, aproximadamente 30 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$.

La comparación de las cinéticas de absorción vítrea de memantina tras la administración subtenon y endovenosa, no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre ellas en cuanto a los parámetros de absorción (K_{ab} y $T_{1/2-ab}$). La concentración máxima (C_{max}) de memantina en vítreo tras la administración subtenon (35.1 $\mu\text{g/mL}$) fue muy superior a la alcanzada tras la administración endovenosa (0.09 $\mu\text{g/mL}$), y además, el tiempo requerido para alcanzar dichas concentraciones (T_{max}) fue menor en el caso de la administración subtenon (4.0 minutos tras la administración subtenon frente a 29.7 minutos tras la administración endovenosa), resultando de la comparación de dichos parámetros diferencias estadísticamente significativas entre ambas vías (IC 95% C_{max} : [22.97, 47.02] y IC 95% T_{max} [-45.75, -5.54]). Respecto a la eliminación vítrea de memantina, la pendiente de la curva de niveles vítreos (K_{el}) fue mayor en el caso de la administración subtenon (0.06 minutos^{-1}) que en el de la vía endovenosa (0.0043 minutos^{-1}), resultando esta diferencia estadísticamente significativa (IC 95% [0.04, 0.07]). Por su parte, el valor de K_{el} tras la administración endovenosa fue similar al encontrado en los ojos contralaterales tras la administración subtenon (0.0066 minutos^{-1}), no encontrando diferencias significativas en este caso. El valor de semivida biológica ($T_{1/2-el}$) de memantina en vítreo tras la administración endovenosa, próximo a las 3 horas, fue superior al obtenido tras la administración subtenon, inferior a 15 minutos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.005$). El valor medio de los AUC's de niveles vítreos de memantina en los ojos administrados tras la administración subtenon fue mayor que el obtenido tras la administración endovenosa en dosis única, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (IC 95% [424.50, 999.50]), si bien, no se encontraron diferencias significativas en el valor de los

AUC's de niveles vítreos entre la administración endovenosa y los ojos contralaterales. Las cifras de aclaramiento vítreo (C_L) de memantina tras la administración endovenosa (173.4 mL/minuto) resultaron ser significativamente superiores a las observadas para la administración subtenon (6.1 mL/minuto) (IC 95% [-240.57, -94.07]).

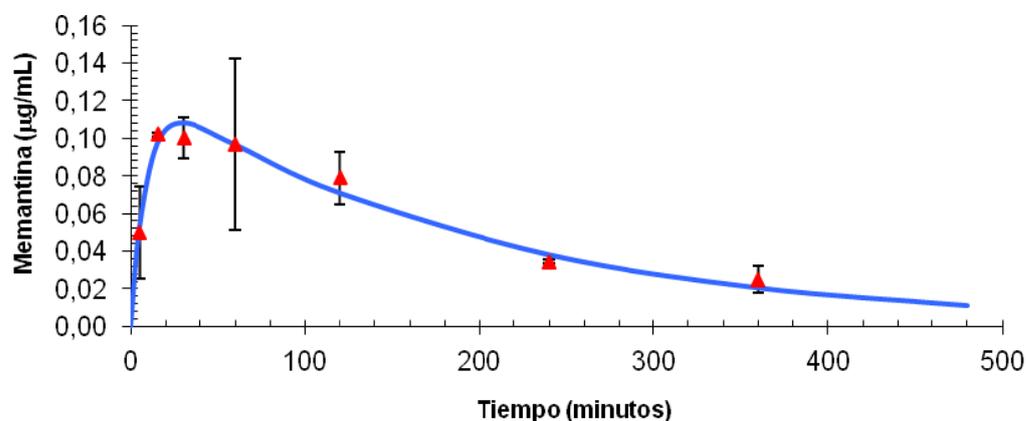


Figura 28: Representación normal de las concentraciones de memantina en vítreo tras la administración endovenosa de 4.5 mg/animal, en dosis única. (▲) concentraciones medias (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos vítreos						
Parámetros	Unidades	1	2	3	media	DE
V_d	mL	28946.28	48862.25	48936.36	42248.29	11519.9
K_{ab}	1/min	0.06	0.28	0.12	0.15	0.1
K_{el}	1/min	0.0056	0.0031	0.0042	0.0043	0.001
$AUC_{0-\infty}$	min*ug/mL	27.55	29.94	21.78	26.42	4.2
$T_{1/2-ab}$	min	11.70	2.44	5.82	6.65	4.7
$T_{1/2-el}$	min	122.82	225.34	164.14	170.77	51.6
C_L	mL/min	163.36	150.30	206.65	173.44	29.5
T_{max}	min	43.85	16.09	29.08	29.68	13.9
C_{max}	ug/mL	0.121	0.088	0.081	0.097	0.022

Tabla 18: Parámetros farmacocinéticos vítreos de memantina tras administración endovenosa en dosis única.

* V_d = volumen de distribución; K_{ab} = constante de absorción; K_{el} = constante de eliminación; $AUC_{0-\infty}$ = área bajo la curva entre 0 y ∞ ; $T_{1/2-ab}$ y $T_{1/2-el}$ = tiempo de vida media de absorción y eliminación, respectivamente; C_{max} = concentración máxima; T_{max} = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; y C_L = aclaramiento vítreo.

4.2.- CINÉTICA PLASMÁTICA

La figura 29 muestra la evolución en el tiempo de las concentraciones plasmáticas de memantina tras su administración endovenosa en dosis única (4.5 mg/animal), y la tabla 19 muestra los valores de los parámetros farmacocinéticos plasmáticos tras el ajuste de los datos a un modelo monocompartimental sin absorción.

El perfil farmacocinético plasmático de memantina tras la administración endovenosa en dosis única, mostró un comportamiento monocompartimental, con tiempos de vida media de eliminación ($T_{1/2-el}$) de aproximadamente 38 minutos. El volumen de distribución (V_d) fue elevado, alcanzando casi los 32 L, con cifras de aclaramiento plasmático (C_L) también altas, de 600 mL/minuto. El valor medio del AUC de niveles plasmáticos tras la administración endovenosa fue bajo, del orden de los 7.7 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$.

La comparación de la cinética plasmática tras la administración subtenon y endovenosa mostró diferencias estadísticamente significativas en el valor de los parámetros de eliminación K_{el} y $T_{1/2-el}$, entre ambas vías (IC 95% K_{el} [-0.031, -0.005] y $p= 0.011$ para $T_{1/2-el}$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores medios de los AUC's de niveles plasmáticos entre ambas vías, ni en las cifras de aclaramiento plasmático (C_L), si bien éstas últimas fueron mayores en el caso de la administración endovenosa.

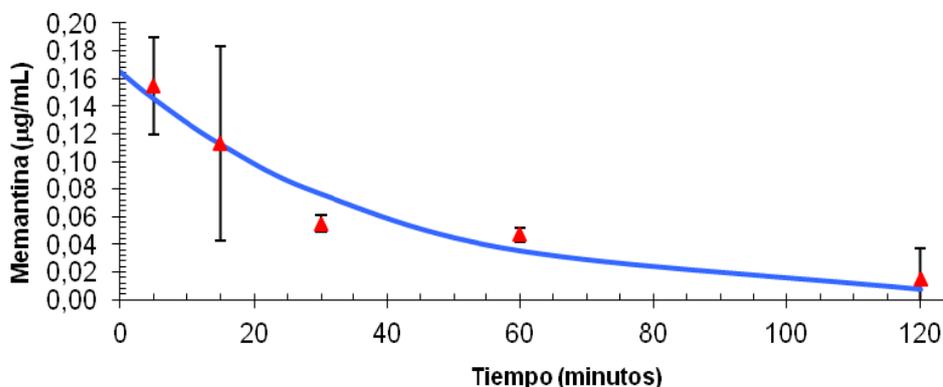


Figura 29: Representación normal de las concentraciones medias de memantina en plasma tras la administración endovenosa de 4.5 mg/animal, en dosis única. (▲) concentraciones medias (n= 3), (—) concentraciones teóricas.

Parámetros farmacocinéticos plasmáticos						
Parámetros	Unidades	1	2	3	media	DE
V _d	mL	18428.63	33645.21	43804.28	31959.37	12771.5
K _{el}	1/min	0.032	0.022	0.011	0.022	0.01
AUC _{0-∞}	min*ug/mL	7.70	6.13	9.16	7.66	1.5
T _{1/2-el}	min	21.85	31.76	61.80	38.47	20.8
C _L	mL/min	584.50	734.30	491.29	603.36	122.6

Tabla 19: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos de memantina tras administración endovenosa en dosis única.

*V_d= volumen de distribución; K_{el} = constante de eliminación; AUC_{0-∞}= área bajo la curva entre 0 y ∞; T_{1/2-el} = tiempo de vida media de eliminación; y C_L= aclaramiento plasmático.

5.- BIODISPONIBILIDAD VÍTREA

5.1.- ADMINISTRACIÓN PERIOCLAR

5.1.1.- Biodisponibilidad vítrea absoluta

Los datos de biodisponibilidad absoluta tras la administración subtenon (F) fueron calculados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$F = AUC_{0-\infty} \times CI / D$$

En la tabla 20 se recogen los resultados del cálculo de biodisponibilidad absoluta, individuales y medios, tras la administración STP, para cada una de las formulaciones ensayadas, expresados como porcentaje (%).

Biodisponibilidad absoluta en humor vítreo					
Formulación	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Media (%)	DE
Ss	100.07	100.06	100.08	100.07	0.01
Mc	100.07	99.96	100.01	100.01	0.06
Pvp	100.01	99.98	99.99	99.99	0.02

Tabla 20: Biodisponibilidad absoluta de memantina en humor vítreo tras administración subtenon, expresadas como porcentaje (%).

Los resultados mostraron una alta biodisponibilidad vítrea de memantina tras la administración subtenon, similar para las tres formulaciones ensayadas, no encontrando diferencias significativas entre ellas

5.1.2.- Biodisponibilidad vítrea relativa

5.1.2.a.- Frente a la administración intravítrea

La biodisponibilidad vítrea relativa de la vía subtenon respecto a la intravítrea ($F_{stp/int}$) fue calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$F_{stp/int} = AUC_{0-\infty\ stp} \times D_{int} / AUC_{0-\infty\ int} \times D_{stp}$$

En la tabla 21 se muestran los resultados de biodisponibilidad relativa, individuales y medios, expresados como porcentaje (%), para cada una de las formulaciones ensayadas.

Biodisponibilidad Vítrea Relativa Subtenon frente a Intravítrea					
Formulación	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Media (%)	DE
Ss	0.70	0.69	0.22	0.53	0.27
Mc	0.72	0.45	0.41	0.52	0.17
Pvp	0.68	0.66	0.41	0.58	0.15

Tabla 21: Resultados de biodisponibilidad vítrea relativa de la administración subtenon respecto a la intravítrea, expresadas como porcentaje.

Los resultados mostraron valores bajos de biodisponibilidad vítrea de memantina para la vía subtenon respecto a la intravítrea (considerada como vía de administración de referencia) con las tres formulaciones, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

5.1.2.b.- Frente a la administración endovenosa en dosis única

Los datos de biodisponibilidad vítrea relativa de memantina tras administración subtenon respecto a la administración sistémica endovenosa ($F_{stp/env}$), fueron determinados según la siguiente ecuación (Ayalasomayajula, 2004):

$$F_{stp/env} = AUC_{0-\infty stp} / AUC_{0-\infty env}$$

En la tabla 22 se muestran los resultados, individuales y medios, de su cálculo para la formulación salina (Ss), expresados como cociente de áreas bajo la curva.

Biodisponibilidad Vítrea Relativa Subtenon frente a Endovenosa					
Formulación	1	2	3	Media	DE
Ss	28.78	24.34	31.86	28.32	3.78

Tabla 22: Resultados de biodisponibilidad vítrea relativa de la administración subtenon respecto a la vía endovenosa, expresadas como cociente.

Los resultados mostraron una biodisponibilidad vítrea de memantina tras la administración subtenon superior a la de la vía sistémica endovenosa, para una misma dosis administrada de memantina.

5.2.- ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA ENDOVENOSA

5.2.1.- Biodisponibilidad vítrea relativa

5.2.1.a.- Frente a la administración intravítrea

Los cálculos de biodisponibilidad vítrea relativa de la administración endovenosa respecto a la vía intravítrea ($F_{env/int}$), para la formulación salina (Ss), se realizaron en base a la siguiente ecuación:

$$F_{env/int} = AUC_{0-\infty env} \times D_{int} / AUC_{0-\infty int} \times D_{env} \quad (1)$$

En la tabla 23 se muestran los valores, individuales y medios, resultantes de su cálculo, expresados como porcentaje (%).

Los resultados mostraron una biodisponibilidad vítrea relativa de memantina por vía sistémica endovenosa muy baja respecto a la administración intravítrea, considerada como vía de referencia.

5.2.1.b.- Respecto a plasma

Se calculó la tasa de penetración vítrea de memantina tras la administración sistémica endovenosa en dosis única, de acuerdo con la siguiente ecuación

(Ayalasomayajula, 2004):

$$F_{Hv/Pl} = AUC_{0-\infty Hv} / AUC_{0-\infty Pl} \quad (2)$$

Cuyos resultados, individuales y medios, se muestran en la tabla 23, expresados como cociente.

Biodisponibilidad vítrea tras administración endovenosa					
	1	2	3	media	DE
⁽¹⁾ Respecto a intravítrea (%)	0.02	0.03	0.01	0.02	0.00
⁽²⁾ Respecto a plasma	3.58	4.88	2.38	3.61	1.25

Tabla 23: Biodisponibilidad vítrea relativa de la vía endovenosa respecto a la administración intravítrea (⁽¹⁾ como porcentaje (%)) y ⁽²⁾ respecto a plasma (como cociente), tras la administración endovenosa en dosis única.

Los resultados evidenciaron una tasa de penetración vítrea de memantina tras la administración sistémica endovenosa en dosis única superior a la unidad.

5.2.2.- Infusión endovenosa. Equilibrio estacionario

La figura 30 muestra la evolución en el tiempo de los niveles plasmáticos de memantina tras infusión endovenosa. El equilibrio estacionario se alcanzó a los 200 minutos de la infusión, siendo la concentración plasmática media de memantina alcanzada en esta fase próxima a los 60 ng/mL.

Se detectaron niveles altos de memantina en humor vítreo tras la administración endovenosa en infusión, una vez alcanzada la fase de equilibrio estacionario plasmático, encontrando niveles de memantina en vítreo 2 veces mayores que los plasmáticos, lo que se traduciría en un paso importante de la sustancia al compartimento vítreo desde sangre, tras la administración endovenosa en infusión.

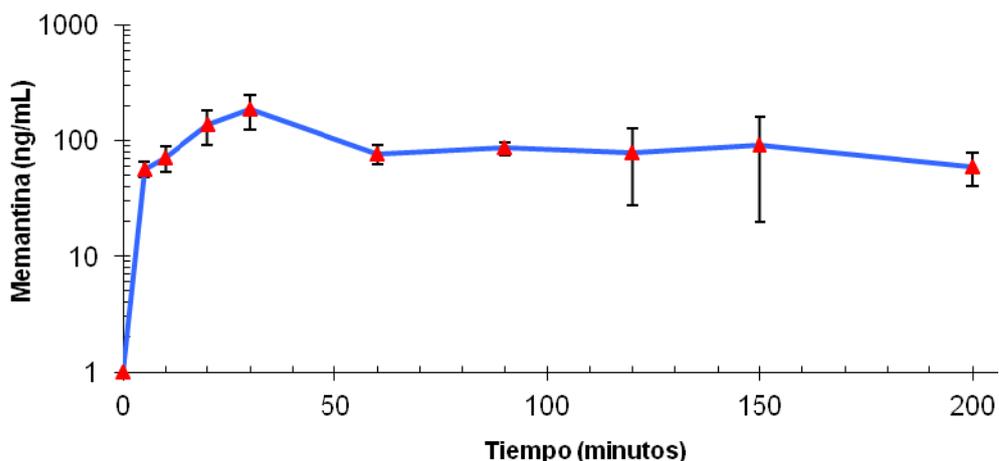


Figura 30: Representación semilogarítmica de las concentraciones medias de memantina en plasma tras la administración endovenosa en infusión.

Infusión endovenosa					
	1	2	3	Media	DE
Plasma (ng/mL)	44.20	52.10	79.90	58.73	18.75
Vítreo O_{drch} (ng/mL)	71.43	174.91	125.50	123.95	51.76
Vítreo O_{izq} (ng/mL)	102.56	93.75	203.00	133.10	60.69
* R1	1.62	3.36	1.57	2.11	
* R2	2.32	1.80	2.54	2.27	

Tabla 24: Concentraciones plasmáticas y vítreas de memantina en la fase de equilibrio estacionario, tras la administración endovenosa en infusión.

*R1 y R2= Relación entre las concentraciones de memantina en vítreo y plasma (ng/mL) en el estado de equilibrio estacionario, para cada uno de los ojos. O_{drch}: ojo derecho; O_{izq}: Ojo izquierdo.

La tabla 24 muestra los resultados, individuales y medios, del cálculo de la relación entre las concentraciones de memantina en vítreo y plasma, en la fase de equilibrio estacionario, siendo la concentración media de memantina en plasma en la

fase de equilibrio estacionario (C_{ss}) de aproximadamente 60 ng/mL, y la tasa de penetración de memantina a vítreo tras la administración endovenosa en infusión superior a la unidad.

6.- CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS GLOBALES DE LA ADMINISTRACIÓN PERIOULAR

6.1.- ABSORCIÓN LOCAL

La proporción de fármaco administrado por vía subtenon que es absorbido localmente, es decir que alcanza directamente el compartimento vítreo desde el espacio perioular, fue calculada a partir de la siguiente ecuación (Ayalasomayajula, 2004):

$$\% \text{ absorción-local} = (AUC_{0-\infty} (Hv\text{-ipsi}) - AUC_{0-\infty} (Hv\text{-contra})) \times 100 / AUC_{0-\infty} (Hv\text{-ipsi})$$

Este cálculo da una idea de la proporción de la sustancia administrada perioularmente que penetra en el compartimento vítreo mediante absorción local, ya sea por difusión directa transescleral, penetración a través de pars-plana o difundiendo desde la cámara anterior del ojo, frente a la contribución de la vía hemática.

En la tabla 25 se muestran los resultados del cálculo de absorción local, individuales y medios, expresados como porcentaje (%), para cada una de las formulaciones ensayadas.

Absorción Local					
Formulación	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Media (%)	DE
Ss	98.2	98.8	98.3	98.4	0.32
Mc	98.8	98.8	99.0	98.9	0.11
Pvp	98.9	99.2	99.3	99.1	0.21

Tabla 25: Proporción de memantina administrada que penetra en vítreo mediante absorción local tras la administración periocular subtenon para cada una de las formulaciones ensayadas.

Los resultados mostraron un alto porcentaje de absorción local de memantina, frente a la contribución de la vía hemática a los niveles vítreos tras la administración subtenon, que fue similar para las tres formulaciones ensayadas, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

6.2.- PÉRDIDA DE SUSTANCIA DEL LUGAR DE LA ADMINISTRACIÓN

La realización de experiencias en condiciones ex vivo, supuso la administración periocular del fármaco en las mismas condiciones descritas en el apartado de material y métodos, pero en animales previamente sacrificados, para anular la pérdida de dosis del lugar de la administración, debida al aclaramiento linfático y sanguíneo conjuntival y epiescleral (Ghate 2007, Carcaboso 2007).

Los resultados de dichas experiencias se recogen en la tabla 26.

Absorción Hemática		
Tiempo (min)	Hv _{Exvivo} (µg/mL)	Hv _{Invivo} (µg/mL)
60	22.088	1.307
120	27.971	0.205

Tabla 26: Niveles de memantina en vítreo tras la administración subtenon en animales vivos frente a los niveles alcanzados con su administración en animales muertos (D= 4.5 mg de memantina/animal).

Los niveles de memantina alcanzados en vítreo del ojo administrado, en condiciones ex vivo, a las 2 horas de la inyección fueron de 27.97 µg/mL, situándose muy por encima de las concentraciones alcanzadas tras la administración STP in vivo, para este mismo tiempo de análisis (0.21 µg/mL).

No se detectaron o estuvieron por debajo del límite de cuantificación, niveles de memantina en los ojos contralaterales, tras la administración subtenon en condiciones ex vivo.

6.3.- MODELO CINÉTICO VÍTREO TRAS LA ADMINISTRACIÓN PERIOcular

Utilizando los parámetros farmacocinéticos resultantes de este trabajo, se diseñó un modelo de cuatro compartimentos para describir la cinética vítrea de memantina tras su administración periocular subtenon posterior (STP).

En las figuras 31, 32 y 33, se muestran los esquemas de los modelos cinéticos teorizados a partir de los resultados obtenidos, para cada una de las formulaciones ensayadas.

Se describe un modelo de cuatro compartimentos: *espacio periocular*, *vítreo*, *plasma* y un cuarto compartimento denominado *distribución*, de localización teórica, en el que se incluirían el resto de tejidos oculares y los ojos contralaterales. Respecto a la cinética de absorción vítrea, el modelo teórico propuesto estuvo caracterizado por una rápida velocidad de absorción de memantina a vítreo desde el espacio periocular, que estuvo definida por la constante K_{ab-v} . Existió también un paso rápido de memantina a la circulación sistémica desde el lugar de la administración, que vendría definido por la constante K_{ab-p} , siendo la absorción plasmática de memantina desde el espacio periocular superior a la alcanzada desde el compartimento vítreo, calculada a partir del cociente de los AUC's de niveles plasmáticos tras la administración periocular e intravítrea. Por su parte, la velocidad de absorción de memantina a vítreo desde el compartimento plasmático, calculada únicamente para la formulación salina (Ss), fue también rápida, definida por la constante K_{ab-pv} , con un tiempo de vida media de absorción ($T_{1/2-ab}$) de aproximadamente 7 minutos. El análisis comparativo de la absorción vítrea de memantina desde el espacio subtenon y desde plasma, mostró una absorción más rápida desde el espacio periocular respecto a la contribución de la vía hemática. Por su parte, la eliminación de memantina desde el compartimento vítreo, definida por la constante de eliminación vítrea (K_{el-v}) ocurrió también de forma relativamente rápida, siendo más lenta para la formulación salina (Ss) respecto a las otras dos formulaciones.

Dos compartimentos caracterizaron el comportamiento plasmático de memantina tras la administración periocular STP, con un compartimento central (*plasma*) y un compartimento periférico (*distribución*). A partir del análisis de los resultados del cociente entre las constantes de transferencia y retorno (K_{12}/K_{21}), vemos como la velocidad de transferencia de memantina desde plasma al teórico compartimento de distribución, fue de 2-5 veces superior a la velocidad de retorno desde dicho compartimento, lo que justificaría una cierta tendencia a la retención de la sustancia en el compartimento periférico de distribución.

El análisis comparativo entre las tres formulaciones (Ss, Mc y Pvp) mostró una importante rapidez en el paso de memantina a vítreo desde el espacio periocular para las tres formulaciones, y una rápida absorción plasmática desde el lugar de administración, superior en el caso de la formulación Ss respecto a las otras dos formulaciones. Por su parte, el análisis comparativo entre las tres formulaciones mostró una velocidad de eliminación de memantina desde el compartimento vítreo más lenta para la formulación Ss, que a su vez fue la que presentó el paso más lento de memantina a plasma desde el compartimento vítreo (aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones).

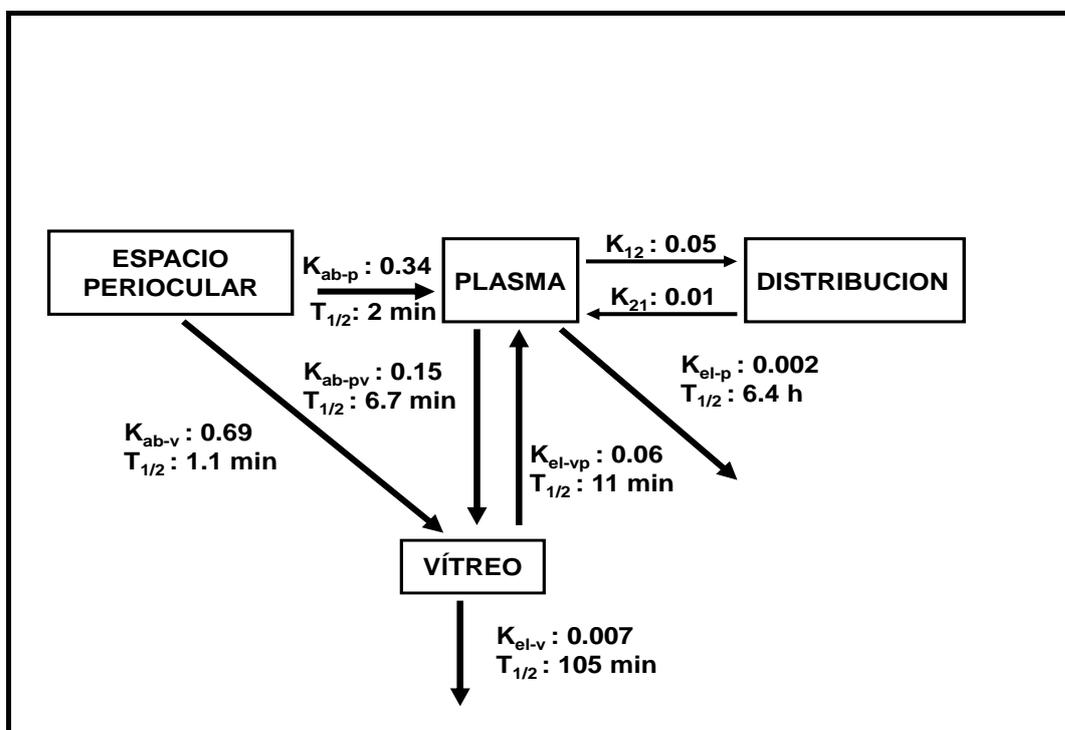


Figura 31: Esquema de modelización cinética tras administración subtenon de la formulación Ss.

* K_{ab-v} y K_{ab-p} : constantes de velocidad de absorción a humor vítreo y a plasma respectivamente, desde el espacio perioclar; K_{ab-pv} : constante de velocidad de absorción de plasma a vítreo; K_{el-v} y K_{el-p} : constantes de velocidad de eliminación vítreo y plasmática, respectivamente; K_{el-vp} : constante de velocidad de eliminación de vítreo a plasma; K_{12} : constante de velocidad de transferencia de plasma al compartimento periférico de distribución; K_{21} : constante de retorno desde el compartimento de distribución al compartimento plasmático. Unidades de las constantes de velocidad (minutos^{-1}).

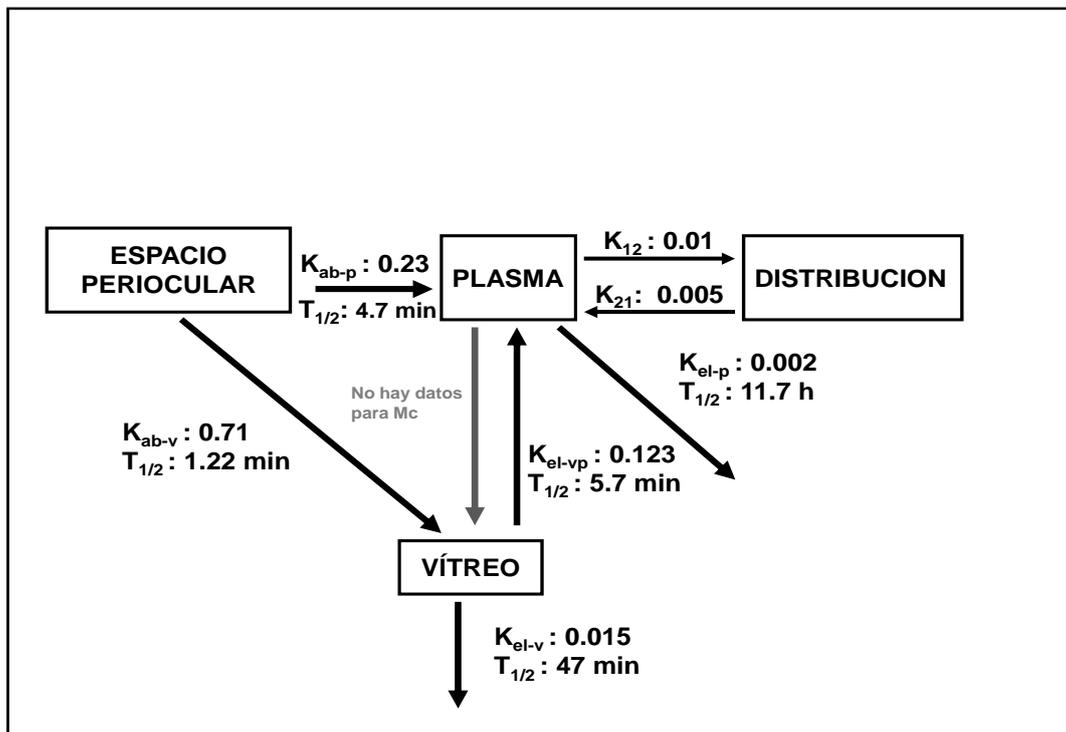


Figura 32: Esquema de modelización cinética tras administración subtenon de la formulación Mc.

* K_{ab-v} y K_{ab-p} : constantes de velocidad de absorción a humor vítreo y a plasma respectivamente, desde el espacio periorcular; K_{ab-pv} : constante de velocidad de absorción de plasma a vítreo; K_{el-v} y K_{el-p} : constantes de velocidad de eliminación vítreo y plasmática, respectivamente; K_{el-vp} : constante de velocidad de eliminación de vítreo a plasma; K_{12} : constante de velocidad de transferencia de plasma al compartimento periférico de distribución; K_{21} : constante de retorno desde el compartimento de distribución al compartimento plasmático. Unidades de las constantes de velocidad (minutos^{-1}).

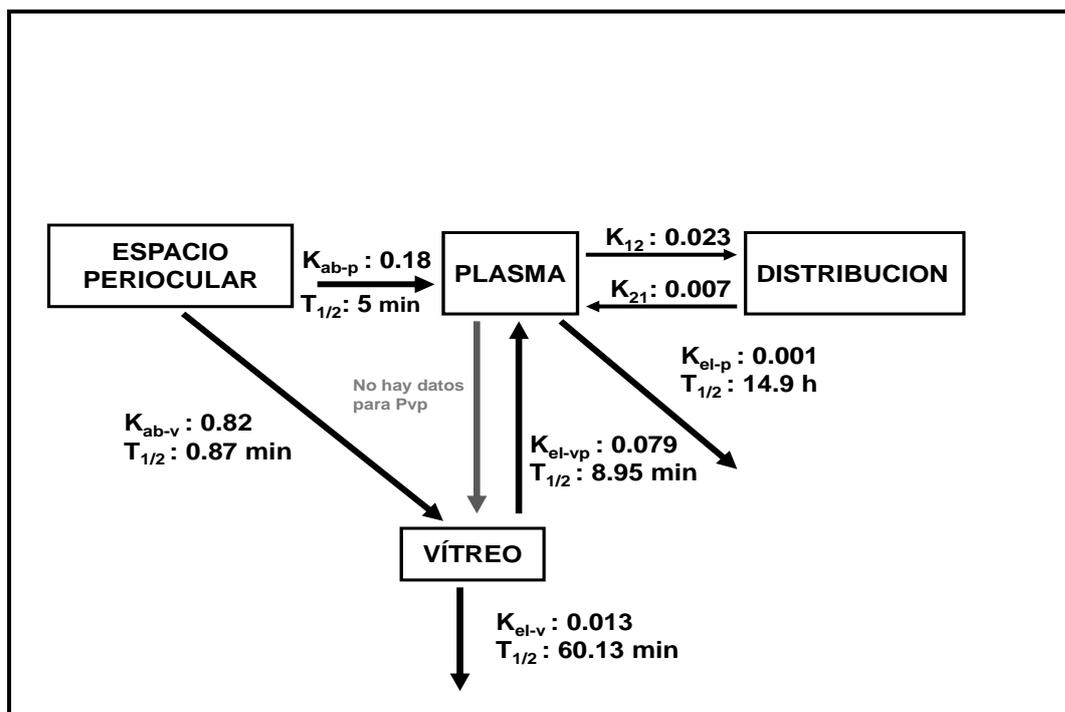


Figura 33: Esquema de modelización cinética tras administración subtenon de la formulación Pvp.

* K_{ab-v} y K_{ab-p} : constantes de velocidad de absorción a humor vítreo y a plasma respectivamente, desde el espacio periocular; K_{ab-pv} : constante de velocidad de absorción de plasma a vítreo; K_{el-v} y K_{el-p} : constantes de velocidad de eliminación vítreo y plasmática, respectivamente; K_{el-vp} : constante de velocidad de eliminación de vítreo a plasma; K_{12} : constante de velocidad de transferencia de plasma al compartimento periférico de distribución; K_{21} : constante de retorno desde el compartimento de distribución al compartimento plasmático. Unidades de las constantes de velocidad (minutos^{-1}).

7.- TOXICIDAD OCULAR DE MEMANTINA

7.1.- ANÁLISIS CLÍNICO

Los resultados del análisis clínico de tolerancia ocular de memantina tras la administración intravítrea se recogen en la tabla 27.

No se produjeron incidencias durante la administración del fármaco. Solamente en uno de los ojos utilizados como control, en el que la paracentesis de evacuación del acuoso había sido más traumática, pudimos observar mediante biomicroscopía, en el examen de la semana, una lesión periférica en el iris, en el cuadrante nasal-inferior, a modo de iridectomía, coincidiendo con la localización en la que se había realizado la punción de la paracentesis.

Se produjo una variación media en los valores de presión intraocular pre y post- inyección de 2,5 mmHg en el grupo de 24 horas; y 2,0 mmHg en el grupo de control de 7 días; no encontrando significación estadística respecto a esta variación en ninguno de los grupos. El mayor valor de PIO no superó los 20 mmHg y se alcanzó en uno de los ojos administrados con la medicación a las 24 horas de la inyección.

Seguridad clínica de memantina						
Tiempo Análisis	Nº ojos	Seg Ant*	Iris	Catarata	VCS*	Fondo de ojo
24 horas post	4	0,0,0,0	0,0,0,0	2,1,1,2	0,0,0,0	N,N,N,N
7 días post	6	0,0,0,0,0,0	1,0,0,0,0,0	1,2,1,1,2,1	0,0,0,0,2,0	N,HR,N,N,HV,N
Controles	2	0,0	1,0	0,0	0,0	N,N

Tabla 27: Resultados del análisis clínico de tolerancia ocular de memantina tras la administración intravítrea (1.5 mg/animal).

Cada dígito codifica la información para un ojo. 0: ausencia de evento; 1: presencia del evento analizado, en grado leve; 2: presencia del evento en grado moderado; 3: presencia del evento de forma grave.

**Seg Ant:* Presencia de signos inflamatorios a nivel del segmento anterior, incluyendo hiperemia conjuntival y quemosis o edema conjuntival.

Iris: presencia de ingurgitación de vasos iridianos.

Catarata: 0: cristalino transparente; 1: opacidad leve del cristalino; 2: opacidad del cristalino de densidad moderada; 3: catarata densa. No se codifica el tipo de catarata.

**VCS (de las siglas en inglés Vitreous Clarity Score):* 0: vítreo claro; 1: turbidez vítrea que produce leve oscurecimiento de los detalles retinianos; 2: turbidez moderada que permite visualización de pequeños vasos retinianos; 3: turbidez importante que sólo permite visualización de grandes vasos del polo posterior; 4: importante turbidez vítrea con intuición de la papila y fulgor retiniano. *Fondo de ojo:* N: normal; HR: hemorragia retiniana; HV: hemorragia vítrea, EP: edema de papila óptica; FR: fibrosis retiniana; IR: infiltrados retinianos.

No se constataron signos clínicos inflamatorios a nivel del segmento anterior, excepto en uno de los ojos administrados en el que se observó, a la semana de la inyección, la presencia de una membrana de fibrina en el borde pupilar del iris con ingurgitación de vasos iridianos, pero sin pérdida de la transparencia corneal ni células inflamatorias en cámara anterior.

En todos los ojos administrados con memantina pudo detectarse mediante biomicroscopía, la presencia de opacidades en el cristalino, incluso presentes en los ojos analizados a las 24 horas postadministración. Sin embargo, en los ojos blancos, que habían recibido inyección de solución salina, no se encontraron alteraciones en la

transparencia del cristalino. En 8 de los 10 ojos que mostraron catarata, se trataba de una opacidad focal, localizada en la cápsula posterior del cristalino, central-paracentral, con una densidad entre leve y moderada. En los otros 2 casos, la opacidad afectó de forma difusa a la cara posterior del cristalino, dificultando levemente la exploración del fondo de ojo.

Se encontró solamente un caso de compromiso de la claridad vítrea, a expensas de una hemorragia vítrea poco densa, que producía un leve oscurecimiento en la visualización de los detalles retinianos, en uno de los ojos administrados, en el control a los 7 días postadministración. No se evidenciaron en ningún caso condensaciones vítreas ni precipitados de la medicación inyectada, observando una buena dispersión de la sustancia en el humor vítreo ya desde el día siguiente a la inyección.

Fue también un hallazgo aislado, la presencia en uno de los ojos del grupo de análisis de 7 días, de una hemorragia retiniana, localizada en el cuadrante TS del globo ocular, coincidiendo con la zona de la inyección. Por su parte, en el examen oftalmoscópico no se encontraron en ninguno de los ojos analizados, signos de desprendimiento de retina, edema de papila, focos inflamatorios retinianos o áreas de fibrosis.

7.2.- ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

De cada ojo analizado se obtuvieron 3 secciones sagitales que se procesaron según los métodos histológicos rutinarios. De cada una de las secciones se

obtuvieron cortes histológicos de 4 μm , realizándose una tinción básica con hematoxilina-eosina (H-E) para su observación mediante microscopía óptica.

Los resultados del análisis histológico mostraron en los ojos de 24 horas, la presencia de células inflamatorias de tipo polimorfonucleares neutrófilos (PMN), a nivel de limbo esclero-corneal y del canal de Schlemm, en la base del cuerpo ciliar y en la cavidad vítrea (Fig. 34); observándose la sustitución de éstos por células mononucleadas de tipo linfocitos y macrófagos, en los ojos procesados a los 7 días de la inyección (Fig. 35). No se encontró sin embargo, infiltración de la retina por células inflamatorias en ninguno de los casos.

La anatomía patológica de uno de los ojos del grupo de 7 días que había mostrado signos inflamatorios a nivel del iris en la evaluación clínica, confirmó la existencia de congestión e hiperemia de los procesos ciliares (Fig. 36). No se observaron signos inflamatorios a nivel de la cabeza del nervio óptico ni peripapilares (Fig. 37), pero en alguno de los ojos, pudo identificarse en la luz de los grandes vasos retinianos la presencia de una sustancia extraña no identificada, de características tintoriales basófilas (Fig. 38).

Frente a los hallazgos de la biomicroscopía, el análisis histopatológico del cristalino fue normal en todos los casos, no encontrando signos de desnaturalización de proteínas o esclerosis del cristalino.

No se encontraron alteraciones en la transición entre la capa de los fotorreceptores y la retina neurosensorial, con conservación de las proporciones y arquitectura de las distintas capas retinianas (Fig. 39). Sólo en dos de los ojos, pertenecientes al grupo de 24 horas, se detectó una zona localizada de desestructuración de la capa de células ganglionares (CGR) asociada a

engrosamiento de la membrana limitante interna (MLI), que parecía coincidir con el punto de inyección (Fig. 40). En algunos de los especímenes analizados se encontró cierto grado de distorsión a nivel de las capas externas de la retina, con disrupción del epitelio pigmentario (EPR) en algunas zonas, respondiendo probablemente a un artefacto de la fijación inducido por la manipulación de los tejidos durante el procesamiento de las muestras.

El examen microscópico detectó la presencia en uno de los ojos, a los 7 días de la administración, de un desprendimiento de retina de tipo exudativo asociado a un intenso edema coroideo, que sin embargo no fue identificado en el estudio oftalmoscópico (Fig. 41).

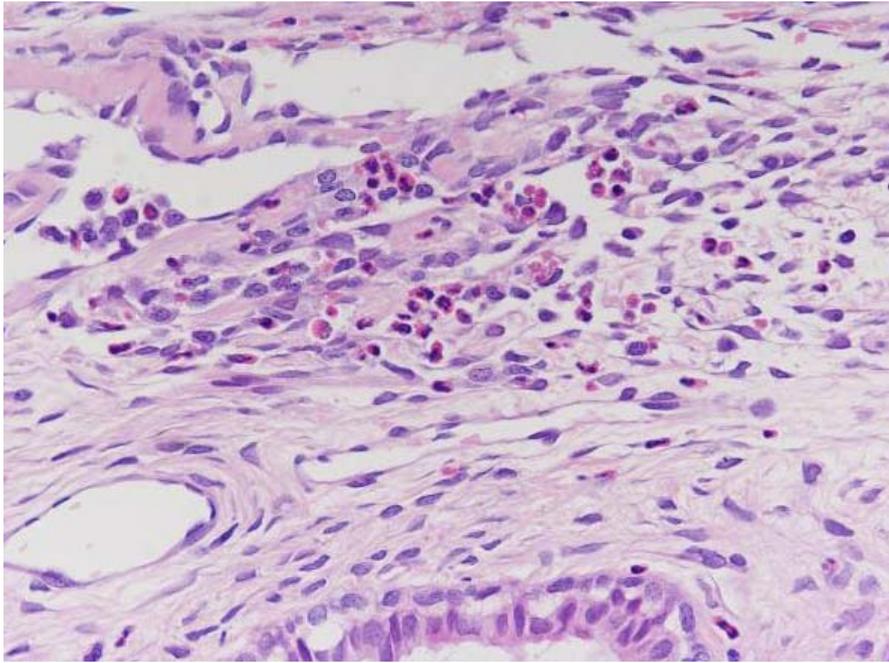


Figura 34: Corte histológico de la base del cuerpo ciliar, mostrando la presencia de polimorfonucleares neutrófilos en el tejido, a las 24 horas postadministración de 0.5mg/0.1mL de memantina. (Tinción hematoxilina-eosina, x400).

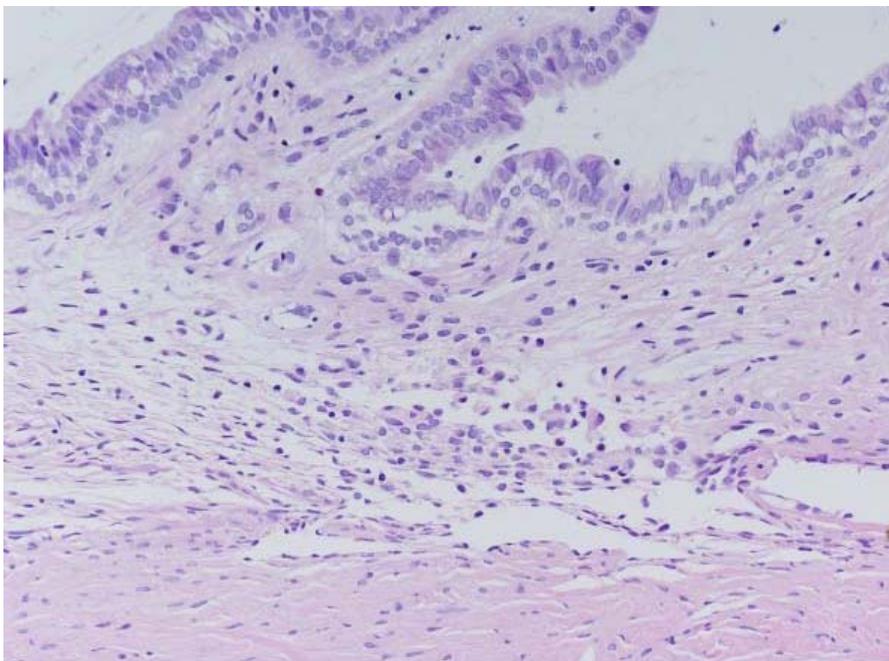


Figura 35: Detalle del cuerpo ciliar infiltrado por mononucleares, en ojo de 7 días tras la administración de 0.5mg/0.1mL de memantina. (Tinción hematoxilina-eosina, x200).

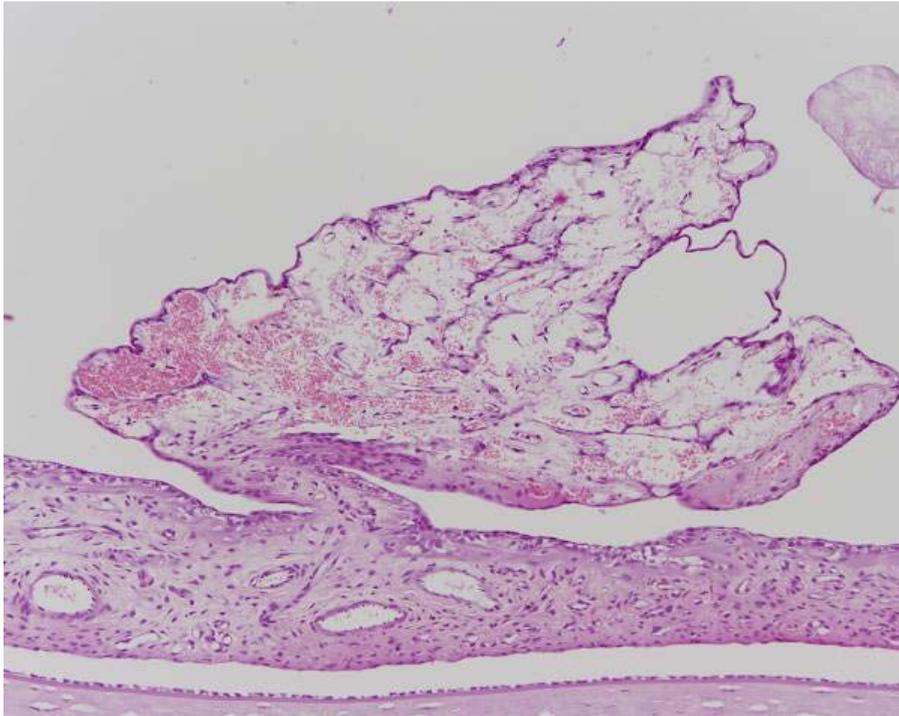


Figura 36: Detalle de proceso ciliar iridiano con hiperemia y congestión vascular, en ojo de 7 días tras la administración de 0.5mg/0.1mL de memantina. (Tinción hematoxilina-eosina, x100).

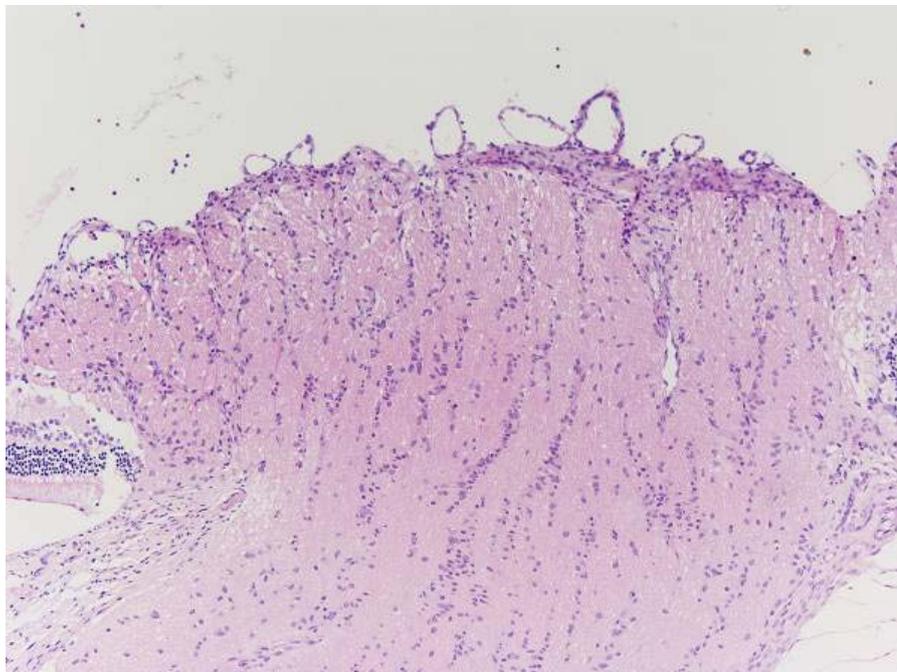


Figura 37: Detalle de papila del nervio óptico de aspecto y morfología normales. Se puede evidenciar la presencia de células inflamatorias en cavidad vítrea posterior (Tinción hematoxilina-eosina, x100).

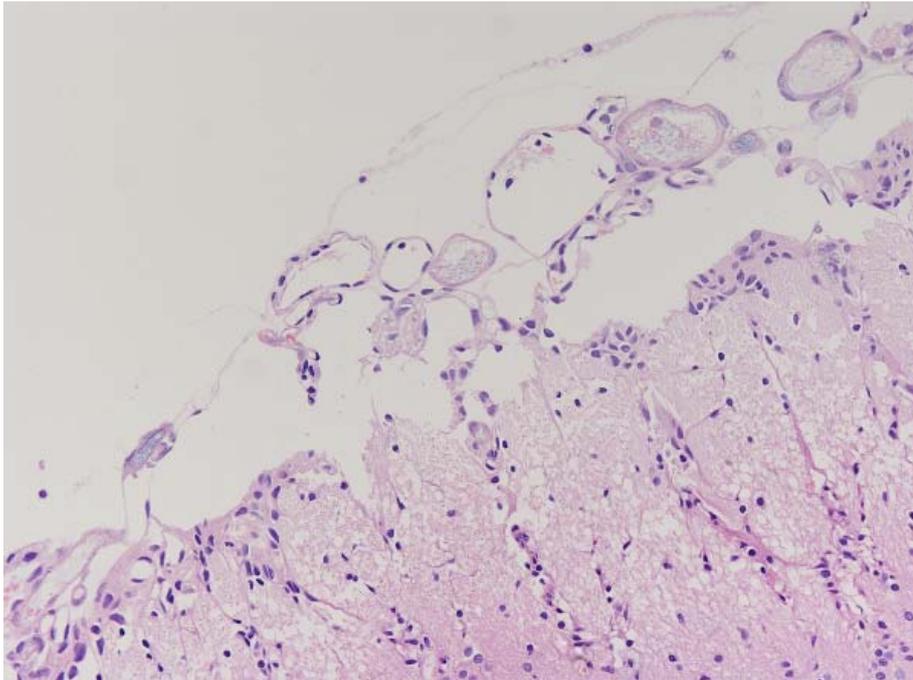


Figura 38: Corte histológico a nivel de la cabeza del nervio óptico, en el que puede observarse la presencia de una sustancia extraña no identificada en la luz de los grandes vasos. (Tinción hematoxilina-eosina, x400).

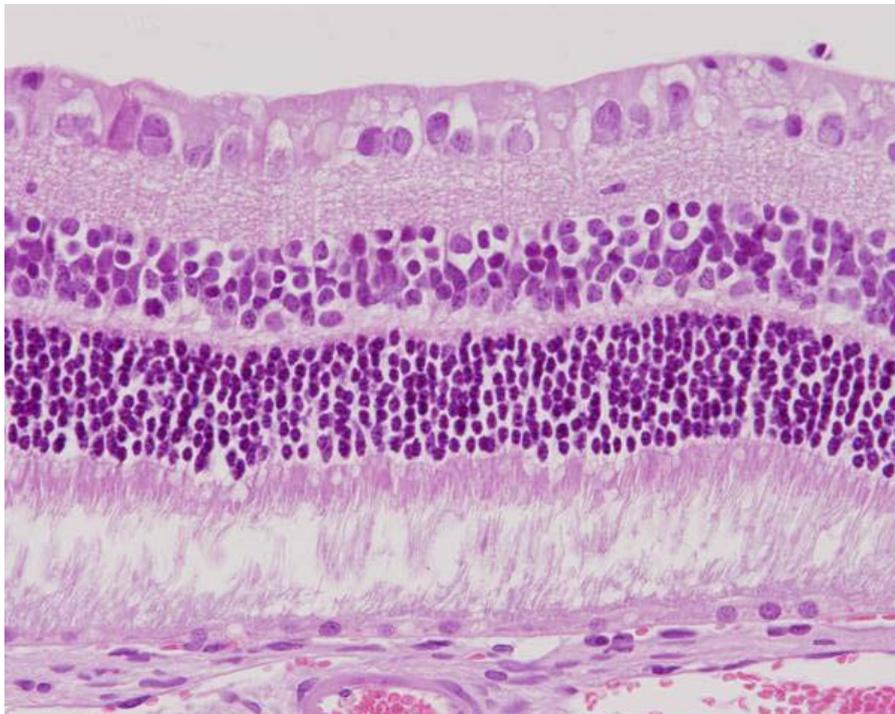


Figura 39: Corte histológico de la retina, en el que puede observarse la conservación de la arquitectura y proporciones normales de las distintas capas retinianas. (Tinción hematoxilina-eosina, x400).

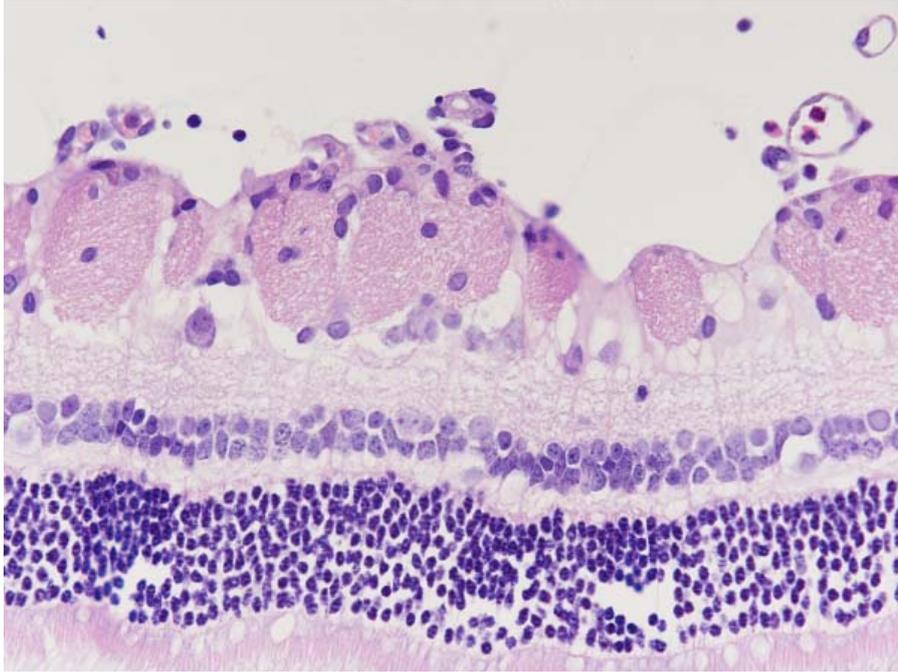


Figura 40: Corte de la retina próxima a la papila óptica de aspecto normal en el que se evidencia la presencia de células inflamatorias en vítreo en contacto con la superficie interna de la retina, en ojo de 24 horas tras la administración de 0.5mg/0.1mL de memantina. (Tinción hematoxilina-eosina, x400).

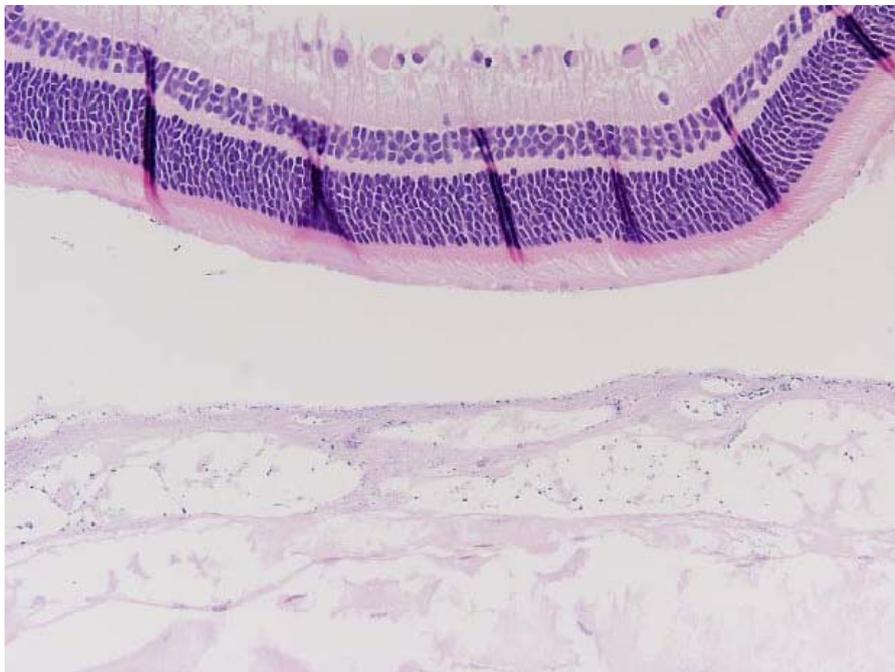


Figura 41: Corte histológico en el que se muestra la imagen de un desprendimiento de retina localizado con edema coroideo subyacente. En la parte baja de la imagen se visualiza la corio-capilar como una capa vascular con intenso componente edematoso. (Tinción hematoxilina-eosina, x200).

8.- NUEVA FORMULACIÓN OFTÁLMICA

Los datos relativos a la caracterización y análisis morfológico de las nanopartículas de Gantrez AN[®], así como al rendimiento de encapsulación y perfil de liberación in vitro de las nanopartículas, se muestran en el apartado correspondiente del Anexo II.

En dicho anexo se recogen también los resultados del estudio de seguridad y tolerancia ocular de las nanopartículas blancas (no cargadas con medicación), tras su administración subtenon e intravítrea (Anexo II).

V

DISCUSSION

El trabajo presentado ha tenido como objetivos fundamentales establecer las características cinéticas y de biodisponibilidad ocular de memantina, fármaco neuroprotector con posibilidades terapéuticas en el tratamiento del glaucoma, analizando su capacidad de penetración en el segmento posterior del ojo desde la vía periocular subtenon, comparando ésta con la vía endovenosa, como vía de administración sistémica básica en un análisis farmacocinético, y con la vía intravítrea, utilizada como vía de administración de referencia.

Hemos planteado el estudio de las características cinéticas de tres formulaciones distintas de memantina, una formulación estándar de memantina en solución salina y dos formulaciones viscosas, teóricamente retardantes, obtenidas mediante la adición de dos biopolímeros distintos: metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Así mismo, hemos realizado distintas experiencias con el objeto de conocer las características de biodisponibilidad ocular de memantina desde cada una de las vías mencionadas (subtenon posterior, intravítrea y endovenosa), estableciendo comparaciones entre ellas. También se han planteado una serie de experiencias destinadas al análisis de toxicidad ocular de memantina tras su administración intravítrea. Finalmente, se presentan los resultados iniciales derivados del análisis de una formulación de memantina a base de nanopartículas de Gantrez AN[®], en relación con el proceso de elaboración, rendimiento de encapsulación y perfil de liberación in vitro, así como los datos resultantes de su estudio de seguridad ocular, los cuales se presentan como anexo a este documento (Anexo II).

Algunos autores señalan que la disposición ocular de una sustancia en los distintos tejidos oculares se ve influenciada por la vía de administración utilizada (Hughes, 2005). Así, los fármacos administrados por vía tópica, en forma de gotas, no alcanzan en concentración suficiente el segmento posterior del ojo (Urtti, 2006), y la vía sistémica –oral o endovenosa- presenta una baja biodisponibilidad ocular con un alto índice de efectos secundarios sistémicos (Ranta, 2006). Frente a éstas, la administración intravítrea ofrece una excelente biodisponibilidad ocular con un menor riesgo de efectos secundarios sistémicos, sin embargo, es una vía de administración invasiva con un alto índice de complicaciones oculares (Ranta, 2006). Por su parte, la vía de administración periocular es capaz de conseguir altas concentraciones del fármaco en vítreo con la ventaja de presentar menos complicaciones oculares que las inyecciones intravítreas, las cuales se reducen básicamente a casos leves de quemosis conjuntival y hemorragias subconjuntivales, por lo que se ha convertido en una alternativa útil en el tratamiento de enfermedades que afectan a estructuras del segmento posterior del ojo (retina, coroides y humor vítreo) (Ghate, 2006).

Mediante las inyecciones perioculares es posible conseguir concentraciones del fármaco en vítreo superiores a las alcanzadas tras la administración tópica, aprovechando el paso transescleral de la sustancia (liberación transescleral de fármacos) (Ranta, 2006). En este sentido, los resultados de estudios llevados a cabo por distintos autores, proponen la administración subtenon posterior (o yuxtaescleral posterior), como una alternativa válida para la liberación de fármacos al segmento posterior del ojo, alcanzando frente a otras modalidades de administración periocular (subconjuntival, retro- o peribulbar), las mayores concentraciones en vítreo con los

menores índices de toxicidad sistémica (Ferrante, 2004; Ghate, 2007). Tras la administración retrobulbar (RB) y subtenon posterior (STP) las sustancias alcanzan el vítreo fundamentalmente desde la coroides, a partir de una absorción transescleral, de manera que las concentraciones pico de la sustancia en humor vítreo estarán directamente condicionadas por las concentraciones pico alcanzadas en el tejido coroideo, y el mantenimiento de dichas concentraciones, favorecerá la difusión de la sustancia hacia la retina, a favor de gradiente de concentración. Tras la administración subconjuntival (SC), sin embargo, las sustancias alcanzan el humor vítreo difundiendo fundamentalmente desde el segmento anterior del ojo, ya que en este caso, la sustancia se encuentra emplazada próxima al cuerpo ciliar, lo que facilita su difusión en el humor acuoso alcanzando elevadas concentraciones a este nivel, para difundir después hacia el humor vítreo, a favor de gradiente de concentración (Ghate, 2007). Teóricamente la administración subtenon posterior (STP) permite el emplazamiento de la sustancia cerca de la esclera y relativamente más alejada de la circulación orbitaria que las administraciones retro- o peribulbar, con lo que, tras la administración STP podrían alcanzarse niveles en vítreo superiores a los de la administración retrobulbar o peribulbar, con una menor absorción sistémica de la sustancia y menor riesgo de efectos secundarios (Ferrante, 2004; Ghate, 2007).

La permeabilidad de la córnea para las distintas sustancias se encuentra limitada por el coeficiente de partición de las mismas, y memantina, por su carácter anfipático es una molécula que difundirá fácilmente a través tanto del epitelio y endotelio corneales (lipofílicos) como del estroma (hidrofílico). Frente a la córnea, la permeabilidad del tejido escleral está condicionada fundamentalmente por el tamaño y peso molecular de la sustancia (la permeabilidad escleral es inversamente

proporcional al peso y radio molecular de la sustancia) (Geroski, 2001; Olsen, 2002), y memantina, en base a su bajo peso molecular (215.76 kDa) y relativa solubilidad en agua, se convierte en un candidato ideal para penetrar a través de la esclera, a diferencia de otros compuestos altamente liposolubles como brimonidina, que han mostrado una difusión transescleral más lenta y menor tras la administración periocular, en base a su elevado coeficiente de interacción con las proteínas del tejido escleral y con el pigmento melánico (Kompella, 2003).

La técnica que hemos utilizado para la administración de memantina en el espacio subtenon posterior (STP) se ha basado en la técnica descrita por Venkatesh para la inyección de corticoides en el tratamiento del edema macular quístico secundario a uveítis intermedias. Según esta técnica, utilizando una cánula intravenosa flexible de politetrafluoroetileno (PTFE), se consigue el correcto emplazamiento del fármaco en dicho espacio virtual, minimizando el riesgo de perforación del globo ocular frente a la técnica convencional descrita por Smith y Nozik o a la técnica de inyección subtenon en el suelo de la órbita (Venkatesh, 2008). En todos los casos, después de la inyección, al proceder a la retirada de la cánula, aplicamos un mecanismo de contrapresión para minimizar el posible reflujo de la medicación a través de la zona de punción (Augustin, 2005; Kaiser, 2007).

La administración intravítrea se realizó mediante inyección con aguja de 30Gs en el cuadrante temporal-superior, a 2.5-3mm del limbo esclero-corneal (Barza, 1993), perpendicularmente a la esclera pero dirigiendo la punta de la aguja hacia el centro del globo ocular, tal y como recomiendan las guías de la Sociedad Española de Retina y Vítreo (SERV) sobre el manejo de las inyecciones intravítreas en

humanos, con el objeto de superar el cristalino y no inducir la formación de catarata traumática (Arias, 2009). Previa a la inyección intravítrea, realizamos en todos los casos una paracentesis (30Gs) en cámara anterior para la evacuación de humor acuoso (aproximadamente 0.05 mL) con el objeto evitar el posible reflujo de la medicación tras la inyección.

Hemos utilizado la vía endovenosa como vía sistémica alternativa para comparar la biodisponibilidad ocular de memantina frente a la administración periocular, ya que, memantina como fármaco hidrosoluble, permite su administración en solución por vía endovenosa. Otros autores, en sus estudios comparativos de biodisponibilidad ocular, recurren a las inyecciones intraperitoneales como vía de administración sistémica, ya que al trabajar con moléculas poco solubles, están condicionados a formularlas en suspensión, existiendo riesgo de embolización si se administraran por vía endovenosa (Ayalasomayajula, 2004). La administración endovenosa de memantina se realizó en dos modalidades, en dosis única y en infusión, la primera con el objeto de caracterizar la cinética plasmática de la molécula, y en ambos casos con el objeto de analizar las características de biodisponibilidad ocular de memantina tras su administración sistémica.

La dosis de memantina administrada en nuestro estudio, estuvo condicionada por la cantidad máxima de memantina que podía ser solubilizada, así como por el volumen máximo de la solución que podía ser inyectado por cada una de las vías, sin problemas de reflujo, resultando de ello la administración de 4.5 mg/animal de memantina, en un volumen de 0.3 mL por vía subtenon, y de 1.5 mg/animal, en un

volumen de 0.1 mL por vía intravítrea. Estas dosis se encuentran en el rango de las utilizadas en estudios de farmacocinética ocular con otras sustancias, como por ejemplo, las utilizadas por Cheng en sus estudios con un inhibidor de metaloproteasas (Cheng, 2001). Para la administración endovenosa de memantina en bolo, elegimos una dosis idéntica a la administrada por vía periocular (4.5 mg/animal), con el objeto de que los resultados fueran directamente comparables.

La administración de memantina, se realizó en todos los casos bajo sedación-anestesia del animal, excepto en los casos de la administración endovenosa. A diferencia de otras condiciones experimentales, como la raza del animal (conejos pigmentados o no pigmentados), la condición de ojos fáquicos frente afáquicos, o condiciones de infección-inflamación ocular (Barza, 1993), que pueden alterar las propiedades de las barreras hematorretiniana y hematoacuosa e influir en la distribución ocular de la sustancia, se cree que la anestesia general no interfiere de manera significativa en los resultados de biodisponibilidad ocular (Ayalasomayajula, 2004).

Hemos estudiado la cinética vítrea de memantina con objeto de conocer la liberación de memantina al segmento posterior tras su administración periocular, al ser la retina el tejido diana en el daño glaucomatoso, y dado que, la mayoría de los estudios sobre farmacocinética ocular del segmento posterior miden concentraciones de la sustancia en vítreo como concentraciones representativas de las alcanzadas a nivel retiniano (Lee, 2004(II)). Por otra parte, el análisis de los niveles retinianos o retino-coroideos, exige la disponibilidad, utilización y puesta a punto medios analíticos más costosos, y por tanto, menos accesibles en muchos laboratorios (Cheng, 2001; Chevuru, 2008; Amrite, 2008).

Las muestras de humor vítreo se obtuvieron a partir de globos oculares enucleados y congelados, siguiendo la metodología descrita por Cheng en sus estudios de toxicidad ocular de un profármaco del foscarnet (Cheng, 1999). También es posible la obtención de muestras de humor vítreo mediante punción-aspiración directa del material vítreo con el animal anestesiado (Barza, 1993), sin embargo, esta modalidad no estaría exenta de una posible contaminación de la muestra por la presencia de restos del fármaco administrado en los tejidos perioculares, y metodológicamente es un procedimiento más complejo por cuanto existe riesgo de lesionar la retina y/o de aspirar material del cristalino.

Debemos tener en cuenta que una de las principales limitaciones de los estudios de farmacocinética ocular se relaciona con la obtención de las muestras, pues la obtención de especímenes de los tejidos oculares supone, en la mayoría de los casos, la enucleación del globo ocular completo, lo que se traduce en un elevado número de animales requeridos para poder llevarlos a cabo. Por otra parte, al evaluar concentraciones intraoculares, cada muestra cinética proviene de un animal diferente, lo que lleva implícito también una importante variabilidad de los resultados experimentales.

Varias han sido las razones por las que hemos utilizado el conejo como especie animal para nuestro estudio. En primer lugar, el conejo se ha utilizado habitualmente como modelo en estudios de farmacocinética ocular *in vivo*, por su fácil disponibilidad en cualquier laboratorio experimental (Maurice, 2001; Carcaboso, 2007). En segundo lugar, la permeabilidad de la esclera del conejo está próxima a la de la esclera humana (Ambati, 2000), presentando además, un espesor similar en ambas

especies (0.25 y 0.39 mm, a nivel del ecuador del globo ocular, en el conejo y en la especie humana respectivamente), presentando un índice de permeabilidad amplio que incluye a solutos de diversa naturaleza y con un amplio rango de pesos moleculares, superiores incluso a los 150 kDa (Ambati, 2000). En tercer lugar, el volumen de humor vítreo en el ojo del conejo es de 1.4 mL (Cheng, 1999), siendo éste, un volumen suficiente desde el punto de vista de nuestra analítica, más próximo además al del ojo humano (4 mL) que el de otras especies animales como la rata. Frente al conejo, animales más pequeños como la rata, han sido muy utilizados en experimentación oftalmológica por sus ventajas metodológicas, pero desde el punto de vista anatómico los ojos de estos animales se alejan bastante de los del humano. Por su parte, los mamíferos superiores como el mono, filogenéticamente más emparentados con el hombre, tienen un uso limitado en el laboratorio por sus inconvenientes éticos y económicos. En los últimos años, el cerdo se está utilizando cada vez más como modelo en estudios de liberación transescleral in vivo, por la similitud anatómica y estructural de su esclera con la del ojo humano, así como por analogías con la vascularización retiniana, flujo sanguíneo coroideo y epitelio pigmentario retiniano humanos (Olsen, 2002). Sin embargo, aspectos de tipo ético y económico, así como el rápido crecimiento de estos animales dificulta su utilización en estudios in vivo de largo tiempo de seguimiento.

Ghate (2007) en sus estudios de farmacocinética ocular señala la existencia en el conejo de una comunicación directa entre las circulaciones orbitarias de ambos ojos, que condicionará la consecución de concentraciones en el ojo contralateral superiores a las que cabría esperar en humanos, y una mayor absorción sistémica de las sustancias administradas periocularmente (Ghate, 2007). Este hecho nos ha llevado a

analizar en nuestro estudio las concentraciones de memantina alcanzadas en los ojos contralaterales tras la administración periocular-subtenon. Por otra parte, el flujo sanguíneo coroideo en el conejo es mayor que en los primates (Nork, 2006), lo que podría condicionar en nuestras experiencias una penetración transescleral inferior a lo esperable en humanos debido a un mayor aclaramiento de la sustancia por la circulación sanguínea coroidea. También debemos tener en cuenta, las diferencias existentes entre la vascularización retiniana del conejo y la del ojo humano, a la hora de comparar nuestros resultados con los que se hayan podido obtener de estudios previos con memantina en humanos o en otras especies animales (ratas o cerdos), ya que la retina humana presenta una vascularización total (holangiótica) mientras que la retina del conejo presenta una vascularización parcial (merangiótica), con localización de los vasos retinianos únicamente en la región de los radios medulares.

Hemos trabajado con conejos albinos y no con conejos pigmentados, pues aunque es bien conocido el alto grado de interacción de memantina con el pigmento melánico y la influencia de este hecho en la disposición ocular de la sustancia (Koeberle, 2006; Cheruvu, 2008), la accesibilidad y disponibilidad de animales pigmentados ha sido limitada en nuestro caso. Puesto que el ojo humano contiene alta densidad de pigmento melánico a nivel del tejido uveal (iris, cuerpo ciliar y coroides) y que nuestro modelo, al trabajar en conejos albinos, no reproduce esta condición, es probable que nuestros resultados no sean totalmente comparables a lo que habría de suceder en humanos, ya que la biodisponibilidad de la sustancia estará condicionada por esta interacción memantina-melanina.

Ya que los resultados farmacocinéticos pueden verse alterados por determinadas patologías, el estado sanitario de los animales fue criterio de selección en nuestro estudio. Trabajamos con hembras, adultas, pues aunque no existen indicios en la literatura de diferencias farmacocinéticas respecto al factor sexo, la mayor disponibilidad de hembras condicionó esta proporción. Por su parte, el hecho de trabajar con animales adultos ha permitido asegurar la madurez de los sistemas renal y hepático, implicados en los procesos de eliminación y metabolismo del fármaco.

El principio activo con el que hemos trabajado es memantina, una amina tricíclica, de compleja determinación analítica, ya que carece de absorción en el espectro visible, en el ultravioleta y/o en el fluorescente. Además, la ausencia de grupos cromóforos en su estructura hace que no sea posible su cuantificación por métodos cromatográficos convencionales mediante detección por fluorescencia o ultravioleta, siendo necesaria la reacción de derivatización con otro compuesto que aporte dichos grupos.

Para llevar a cabo la determinación de memantina en muestras biológicas, buscamos un método sencillo, sensible, rápido y reproducible, basado en la utilización de sistemas analíticos que fueran accesibles y estuvieran potencialmente disponibles en la mayoría de los laboratorios. Se han utilizado diversos métodos analíticos para la determinación de amantadina (antiviral análogo de memantina) y sus derivados en muestras biológicas, del tipo de la cromatografía de gases o la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Duh, 2005), utilizando distintos agentes derivatizantes como el cloruro de pentafluorobenzoilo (Rakestraw, 1993), el cloruro de

tricloroacetilo, derivados del dinitrobenceno (Van Der Horst, 1990), el cloruro de dansilo (Higashi, 2005) o el o-ftaldehído (OPA) (Zarghi, 2010). De entre estos métodos analíticos, los que utilizan la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con reacción de derivatización precolumna son de elección en la determinación de memantina y/o de compuestos análogos (Suckow, 1999). Aunque se han desarrollado diversos estudios sobre metodología analítica para la determinación de memantina y derivados de amantadina en muestras biológicas de plasma, líquido cefalorraquídeo y orina, los resultados de éstos se han visto limitados por la falta de un estándar interno adecuado, por la inestabilidad de los productos de derivatización, por los largos procedimientos y bajos rendimientos de extracción, por la baja sensibilidad del método con largos tiempos de elución, y/o por el elevado coste económico del proceso (Zarghi, 2010). En otras ocasiones, el método de análisis propuesto no resulta de fácil acceso en un laboratorio de experimentación básica, como es el caso de la espectrofotometría de masas (Kornhuber, 2006).

Nosotros hemos realizado la determinación analítica de memantina mediante cromatografía líquida de alta resolución o de altas presiones (HPLC), con reacción de derivatización precolumna, utilizando el 9-fluoroenilmetil cloroformiato (FMOC-Cl) como agente derivatizante, que ha demostrado ser adecuado como marcador de fluorescencia de aminas primarias y secundarias, y ha sido utilizado con éxito en el análisis de aminoácidos, antibióticos aminoglicósidos y de otros compuestos con grupos amino (Stead, 1997). Hare utiliza un método para la determinación de memantina en plasma y humor vítreo de monos, basado en la técnica de HPLC y derivatización con FMOC-Cl (Hare, 2004), pero el autor no describe la optimización de los parámetros analíticos ni tampoco da información sobre el estándar interno utilizado o el límite de

cuantificación alcanzado. Nosotros hemos realizado la optimización de la reacción de derivatización, así como de las condiciones cromatográficas tal y como se describe en el Anexo I.

Desde el punto de vista metodológico, una importante limitación de este trabajo, como estudio de farmacocinética ocular, ha estado relacionada con la aplicación de una metodología cinética tradicional que indefectiblemente usa métodos invasivos, los cuales exigen el sacrificio de un animal para el muestreo de cada tiempo cinético. Frente a éstos, la fluorofotometría ocular es una técnica no invasiva, que no requiere anestesia ni implica alteración de las estructuras oculares, y permite determinar la concentración de compuestos marcados con fluoresceína en humor acuoso, vítreo y/o retina, en tiempo real (Ghate, 2007); sin embargo, las exigencias metodológicas y la dotación de medios, han limitado su utilización en nuestro estudio. Otra posibilidad dentro de los estudios de farmacocinética ocular es la utilización de metodología *in vitro*, por ejemplo, mediante “modelos de órgano perfundido” como los utilizados por Koeberle (2006), que presentan una serie de ventajas frente a las experiencias *in vivo*. Estos modelos permiten aislar el ojo de los efectos reguladores del sistema nervioso, del sistema vascular y del sistema hormonal, facilitando de esta manera la interpretación de los resultados experimentales y disminuyendo la variabilidad de los mismos. Además, en condiciones *in vitro* es posible trabajar con concentraciones altas del fármaco sin riesgo de sufrimiento del animal. Sin embargo, es difícil desarrollar modelos *in vitro* que mantengan su viabilidad durante periodos de tiempo suficientemente prolongados como para poder estudiar la disposición y metabolismo del fármaco administrado (Koeberle, 2006); y por otra parte, los estudios farmacocinéticos *in vivo*

permiten una evaluación más exacta del papel de las barreras oculares en la penetración transescleral de sustancias administradas periocularmente (Ghate, 2007).

Los datos de concentración vítrea y plasmática de memantina se han analizado, desde el punto de vista cinético, en base a la teoría del análisis compartimental, encontrando una buena correlación entre los valores observados y los valores calculados por el modelo elegido, para todos los tiempos de muestreo y en todas las experiencias realizadas. Por esta razón no hemos realizado en nuestro estudio un análisis no compartimental, aún cuando, éste permite trabajar con un menor artificio matemático, y permite la estimación de parámetros cinéticos basándose exclusivamente en datos objetivos, sin necesidad de su ajuste a un modelo concreto (Kinabo, 1989). Además, nuestro trabajo no ha pretendido establecer las pautas posológicas de memantina para su administración ocular, lo que se podría haber logrado más fácilmente a partir de un análisis no compartimental, sino definir el comportamiento cinético y distribución ocular de memantina, para lo cual los modelos compartimentales se consideran más adecuados (Kinabo, 1989). En este momento, debemos realizar una consideración general en cuanto al análisis de este apartado del estudio, ya que las altas desviaciones estándar en los datos experimentales de concentraciones de memantina en humor vítreo tras la administración subtenon, fueron inicialmente motivo de preocupación respecto a la valoración posterior de los resultados. Sin embargo, hemos encontrado que esta tendencia se repite en la mayoría de los estudios relacionados con la liberación y administración de fármacos al segmento posterior del ojo (Robinson, 2006; Ghate, 2007), probablemente por la dificultad de posicionar las inyecciones exactamente en la

misma localización cada vez, incluso cuando éstas han sido realizadas por el mismo investigador. De esta manera, creemos que la proximidad del depósito-mediación a los vasos sanguíneos conjuntivales y episclerales (que como hemos comentado contribuirán al aclaramiento de la sustancia) y/o a pars-plana (considerada la región de la esclera de menor resistencia a la penetración de compuestos) (Li, 2004) será variable en función del posicionamiento exacto de la inyección, y que ésta, en consecuencia, podrá inducir cierta variabilidad en la penetración de la sustancia administrada (Ghate, 2007).

La información de que se dispone sobre la farmacocinética de memantina es escasa, básicamente datos relacionados con la cinética plasmática de memantina en humanos tras su administración por vía oral en dosis múltiples (McKeage, 2009), y algunas referencias sobre farmacocinética ocular de memantina en animales vivos (Hughes, 2005) y en modelos in vitro de órgano perfundido (Koeberle, 2006), en las que se estudia la disposición ocular de memantina tras su administración tópica y sistémica, no encontrando referencias sobre penetración ocular de memantina tras su administración periocular.

Hemos estudiado las características farmacocinéticas de memantina y su biodisponibilidad ocular, no hemos pretendido realizar un estudio de efectividad de la sustancia. Para ello hemos planteado nuestro trabajo en base al estudio del comportamiento cinético de memantina tras la administración subtenon e intravítrea de tres formulaciones medicamentosas con distinta viscosidad, con el objeto de comprobar la existencia o no de modificaciones en el comportamiento vítreo de la sustancia. Kesavan (2011) hace una revisión sobre nuevas formulaciones de

liberación sostenida en farmacología ocular, en la que repasa el uso de distintos polímeros –naturales y sintéticos- en la elaboración de las mismas, entre los que incluye la metilcelulosa (Mc) y la polivinilpirrolidona (Pvp) (Kesavan, 2011). En nuestro caso, hemos trabajado con formulaciones viscosas a partir de la incorporación de dos polímeros sintéticos: metilcelulosa, con unas características de viscosidad de 4.000 cPs (*centipoise*), y polivinilpirrolidona 10, con un peso molecular de 10.000 Da, preparando diluciones acuosas de cada una de ellos al 0.5 % y al 1%, respectivamente. La decisión de utilizar dichas concentraciones implica considerar el grado de viscosidad que pueden condicionar en la formulación usada. En nuestro caso, y tras pruebas preliminares (no descritas en el presente trabajo) con distintas concentraciones de los agentes mencionados, pudimos observar reacciones irritativas de la superficie ocular, más o menos intensas, cuando se utilizaban concentraciones superiores de estos agentes, por lo que no pudimos superar dichos niveles en nuestras formulaciones.

En nuestro estudio, un modelo monocompartimental con absorción ha caracterizado la cinética vítrea de memantina tras su administración subtenon, presentando una absorción y eliminación muy rápidas, no encontrando diferencias significativas entre las formulaciones ensayadas en cuanto a los parámetros cinéticos de absorción y eliminación, ni tampoco en los valores medios de C_{max} y AUC's encontrados. Tras la administración subtenon de memantina pudimos observar una primera fase, entre los 10 y los 60 minutos postadministración, en la que se alcanzaron altas concentraciones de memantina en vítreo (35-40 $\mu\text{g/mL}$), las cuales descendieron rápidamente, y una segunda fase, más allá de la primera hora

postadministración, en la que encontramos niveles bajos de memantina en vítreo pero más sostenidos, siendo éste un comportamiento similar al descrito por Cheng (2001) en sus experiencias subtenon con un inhibidor de metaloproteasas (Cheng, 2001).

La rápida caída inicial de los niveles de memantina en vítreo, podría explicarse en parte por un falseamiento de los valores de concentración pico condicionada por una posible contaminación de la muestra en el momento de la extracción, por el fármaco remanente en los tejidos perioculares, o por una estimulación temporal de los mecanismos de eliminación vítrea después de la inyección, tal y como sugiriera Barza 1993 en sus estudios de farmacocinética ocular tras la administración subconjuntival de cefalosporinas de tercera generación (Barza, 1993).

Geroski señala que la absorción transescleral de sustancias administradas periocularmente ocurre, en general, de forma rápida, salvo que se considere la utilización de dispositivos de liberación sostenida (Geroski, 2000). Ambati señala la influencia del peso y del radio molecular de la sustancia en la velocidad de absorción a través de la esclera (Ambati, 2000).

Hemos encontrado una rápida absorción de memantina a vítreo desde el espacio periocular para las tres formulaciones. Teóricamente la administración subtenon de memantina en solución salina debería producir altas concentraciones de la sustancia en vítreo, incluso superiores a las obtenidas con las otras dos formulaciones (Mc y Pvp) y de forma más rápida, respondiendo a una difusión transescleral de memantina más rápida a partir de la solución salina (Ss) que a partir de las soluciones viscosas de metilcelulosa y polivinilpirrolidona, potencialmente retardantes; en la línea de lo observado por Gilbert en sus experiencias de difusión

transescleral de cisplatino tras administración subconjuntival en matriz de colágena versus solución de BSS (solución salina balanceada) (Gilbert, 2003). Sin embargo, en nuestro caso, las mayores concentraciones de memantina en vítreo tras la administración subtenon se obtuvieron con la formulación Mc ($C_{\max} = 38.67 \mu\text{g/mL}$ frente a los 35.09, y 36.70 $\mu\text{g/mL}$ de las formulaciones Ss y Pvp respectivamente), y por su parte, la velocidad de absorción de memantina a vítreo fue mayor a partir de la formulación Pvp (con tiempos de vida media de absorción ($T_{1/2\text{-ab}}$) de 0.87 minutos para la formulación Pvp frente a los 1.10, 1.22 minutos de las formulaciones Ss y Mc, respectivamente), aunque no se encontraron diferencias significativas entre las formulaciones en cuanto a dichos parámetros. La eliminación de memantina desde vítreo fue también muy rápida para las tres formulaciones, con tiempos de vida media ($T_{1/2\text{-el}}$) que oscilaron entre los 11 y 15 minutos, no mostrando diferencias significativas entre ellas.

Se puede decir por tanto, que el comportamiento cinético vítreo de memantina tras la administración subtenon fue similar para las tres formulaciones tanto desde el punto de vista de la absorción desde el espacio periocular como de la eliminación desde el compartimento vítreo, debido posiblemente, a que las proporciones utilizadas de los agentes viscosizantes (Mc y Pvp) no fueron lo suficientemente altas como para producir modificaciones en la viscosidad de las soluciones, condicionadas éstas por aspectos relacionados con la tolerancia ocular, como ya se ha mencionado anteriormente.

Tras la administración subtenon, observamos un paso rápido de memantina a sangre desde el espacio periocular, coincidiendo con lo observado también tras la administración subconjuntival de otras sustancias (Barza, 1993; Ayalasomayajula, 2004). El

ajuste de los niveles plasmáticos de memantina tras la administración subtenon respondió a un modelo bicompartimental con absorción. Se detectaron niveles de memantina en plasma hasta los 500 minutos para la formulación Ss y hasta los 1440 minutos, para las formulaciones viscosas (Mc y Pvp), con tiempos de vida media de eliminación ($T_{1/2-el}$) que oscilaron entre los 386 y 894 minutos, siendo ésta más rápida para la formulación Ss que para las otras dos formulaciones aunque de forma no estadísticamente significativa, si tenemos en cuenta que la variabilidad de los datos experimentales para las formulaciones Mc y Pvp hizo que los valores medios de dicho parámetro se vieran arrastrados por los valores extremos tomados por el sujeto 2, en ambos casos. Los niveles plasmáticos de memantina fueron menores en el caso de las formulaciones Mc y Pvp, siendo la formulación Ss la que presentó la constante de absorción plasmática (K_{ab}) más alta de las tres formulaciones ($0.34 \text{ minutos}^{-1}$), aunque las diferencias entre ellas no fueron estadísticamente significativas. Este hecho, concuerda con la idea teórica de que dichos biopolímeros (metilcelulosa y polivinilpirrolidona) actuarían aumentando la viscosidad de la formulación y disminuyendo su aclaramiento sanguíneo, al enlentecer su absorción plasmática.

Ayalasomayajula (2004) señala que los niveles vítreos en los ojos contralaterales tras la administración periocular pueden servir como marcador de niveles sistémicos y de recirculación (Ayalasomayajula, 2004). En este sentido, si las concentraciones pico de memantina en vítreo se hubieran alcanzado simultáneamente ($T_{\max-administrados} = T_{\max-contralaterales}$) y en la misma proporción ($C_{\max-administrados} = C_{\max-contralaterales}$) en los ojos administrados y en los contralaterales, entonces tendríamos que suponer un papel predominante de la vía hemática en la absorción de memantina

tras su administración subtenon. Sin embargo, la gran diferencia observada en las concentraciones pico entre los ojos administrados y los ojos contralaterales ($C_{\text{max-administrados}} \gg C_{\text{max-contralaterales}}$), justifica una mayor contribución de la absorción local frente a la absorción sistémica en la consecución de niveles vítreos tras la administración subtenon. De la misma manera, la demora con que se alcanzó dicha concentración máxima en los ojos contralaterales frente a los administrados ($T_{\text{max-administrados}} < T_{\text{max-contralaterales}}$), juega a favor de un papel predominante de la absorción local en los ojos administrados periocularmente.

La cinética vítrea de memantina en los ojos contralaterales tras la administración subtenon fue más lenta que la observada en los ojos administrados. A este respecto vemos como los AUC's de niveles vítreos tras la administración subtenon fueron mayores en los ojos administrados (738.4, 1057.5 y 826.4 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ para las formulaciones Ss, Mc y Pvp) que en los ojos contralaterales (11.32, 11.33 y 7.3 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ para dichas formulaciones respectivamente), justificado posiblemente por una disponibilidad ocular de memantina en los ojos contralaterales debida a la absorción por vía hemática, en la que la barrera hematorretiniana interna será un factor condicionante.

Frente a lo observado por Carcaboso en sus estudios con topotecan (fármaco antitumoral) tras administración periocular y endovenosa en infusión, en los que defiende una importante absorción sistémica de la sustancia frente a la absorción transescleral (Carcaboso, 2007), nuestros resultados hablan a favor de una absorción transescleral predominante para memantina tras su administración periocular-subtenon, con valores de los AUC's de niveles vítreos claramente superiores para la administración subtenon (738.4 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$, para la formulación Ss) frente a la vía

endovenosa ($26.4 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$), y una constante de absorción memantina desde el espacio periocular a vítreo ($K_{\text{ab-HV}} = 0.69 \text{ minutos}^{-1}$) mayor que la constante de absorción desde el espacio periocular a plasma ($K_{\text{ab-PI}} = 0.34 \text{ minutos}^{-1}$). Podemos tener una idea aproximada de la contribución de la vía hemática en la consecución de niveles vítreos tras la administración subtenon a partir del análisis de los AUC's de los niveles vítreos en los ojos contralaterales ($11.32 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$), para la formulación salina, los cuales fueron del orden a los obtenidos tras la administración sistémica endovenosa en dosis única ($26.42 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$).

Es posible hacer una estimación de la proporción de la sustancia administrada que penetra en el ojo mediante absorción local, ya sea por difusión directa transescleral, penetración a través de pars-plana o difundiendo desde la cámara anterior del ojo. A esto es a lo que Ayalasomayajula y su grupo de colaboradores denominaron porcentaje de absorción local (*% local delivery*), y que en nuestro caso ha resultado ser del 98.4%, 98.9% y 99.1% para las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente; valores similares al encontrado tras la administración subconjuntival de celecoxib (Ayalasomayajula, 2004), y que dan una idea del importante papel de la absorción local de memantina tras la administración subtenon.

Por su parte, la pérdida de dosis tras la administración periocular debida al aclaramiento de la sustancia del lugar de la inyección, por la circulación sanguínea conjuntival y epiescleral, ha sido analizada por diversos autores en experiencias en animales muertos, viendo como los niveles alcanzados en los tejidos oculares en estas condiciones son superiores a los alcanzados en animales vivos (Carcaboso, 2007). Las experiencias postmortem planteadas en nuestro estudio, han sido utilizadas como modelo para estudiar específicamente el efecto del aclaramiento sanguíneo en los

niveles vítreos alcanzados tras la administración subtenon de memantina, ya que como sugirieran Robinson (2006), Pontes de Carvalho (2006) y Ghate (2007) a partir de sus experiencias, las circulaciones linfática y sanguínea, conjuntival y epiescleral, constituyen una barrera dinámica importante en la penetración directa de sustancias administradas periocularmente (Robinson, 2006; Pontes de Carvalho, 2006; Ghate, 2007). En este sentido, nosotros encontramos niveles de memantina en vítreo del ojo administrado en los animales muertos muy superiores a los alcanzados en conejos vivos (27.97 versus 0.21 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, a los 120 minutos), coincidiendo esto, con lo observado por Carcaboso tras la administración retrobulbar de fluoresceína sódica (NaFl), que encuentra en condiciones ex vivo niveles de NaFl en vítreo superiores a los alcanzados in vivo, con un T_{max} también mayor (Carcaboso, 2007). Los mayores niveles alcanzados en vítreo en los animales muertos podrían justificarse por el bloqueo de los mecanismos de aclaramiento sanguíneo (conjuntival, epiescleral y coroideo) y linfático, así como por una posible ruptura de la integridad funcional del EPR en condiciones ex vivo, como dedujeran de sus experiencias algunos autores (Robinson, 2006; Carcaboso, 2007). Además, en las experiencias ex vivo, quedarían anulados otros mecanismos como el aclaramiento precorneal, relacionado con la dilución y renovación de la película lagrimal. De hecho, estudios de disposición ocular mediante resonancia magnética nuclear (RMN) han demostrado como en condiciones ex vivo la difusión transescleral de las sustancias administradas periocularmente aumenta (Kim, 2004). En cualquiera de los casos, los estudios preliminares de Lee y Robinson concluyen que la recirculación sistémica y el movimiento de la sustancia desde el humor acuoso, no contribuyen de forma significativa en la consecución de

los niveles vítreos tras la administración periocular, siendo predominante la penetración directa a través de la esclera (Lee, 2001).

El comportamiento vítreo de memantina tras la administración intravítrea respondió a una cinética monocompartimental, que no mostró diferencias significativas entre las tres formulaciones en cuanto a los parámetros cinéticos básicos. Los tiempos de vida media de eliminación de memantina ($T_{1/2-el}$) fueron cortos, próximos a los 110 minutos para la formulación Ss, a los 60 minutos para la formulación Pvp y a los 50 minutos para la formulación Mc, no encontrando significación estadística para esta diferencia debido probablemente a la variabilidad de los datos experimentales para las formulaciones Ss y Pvp, que hizo que los valores medios de dicho parámetro se viesan arrastrados por los valores extremos tomados por el sujeto 2 en el caso del Pvp, y por el sujeto 1 en el caso de la formulación Ss. En este sentido, se ha visto como las moléculas administradas en solución, son eliminadas del compartimento vítreo en pocas horas, frente a las moléculas administradas en suspensión, las cuales presentan mayor vida media en vítreo, pudiendo permanecer activas en los tejidos intraoculares durante mayor tiempo (Okabe, 2003).

Tras la administración intravítrea de memantina observamos una caída rápida de sus concentraciones en vítreo hasta los 120 minutos y una rápida eliminación vítreo de la sustancia, con posible redistribución a otros tejidos oculares: humor acuoso, cristalino, cuerpo ciliar, retina, coroides y/o esclera; tal y como concluyera Koeberle (2006) en sus experiencias in vitro con ojos de oveja perfundidos, en las

que observa como los niveles de memantina en dichos tejidos oculares se incrementan de forma inversamente proporcional a como lo hacen sus concentraciones en humor vítreo. Koeberle describe una eliminación de memantina de humor vítreo fundamentalmente por vía posterior, a partir de los altos niveles de memantina encontrados en la interfase coroides-EPR y en esclera tras su administración intravítrea, considerando menor la contribución de la vía anterior en la eliminación vítreo de la sustancia, en base a las bajas concentraciones de memantina alcanzadas en córnea y humor acuoso (Koeberle, 2006). En nuestro caso, la ausencia de cuantificación de niveles de memantina en otras estructuras oculares, no ha permitido llegar a esta conclusión, aunque si consideramos la corta vida media de memantina en vítreo, menor de 2 horas en los tres casos, es posible pensar que ésta sea eliminada del humor vítreo mayoritariamente por vía posterior. De hecho, Maurice (2001) y Barza (1993) defienden esta posibilidad para otras sustancias con comportamientos cinéticos similares, bajos cocientes de concentración HA/HV y tiempos de vida media en vítreo cortos, del orden de los que nosotros hemos encontrado para memantina (Maurice, 2001; Barza, 1993). Por otra parte, las bajas cifras de aclaramiento vítreo de memantina tras la administración intravítrea, del orden de los 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, estuvieron probablemente condicionadas por los bajos volúmenes de distribución encontrados para esta vía, los cuales no alcanzaron los 10 mL en ninguno de los casos. Estos volúmenes de distribución dan una idea de la estanqueidad del compartimento vítreo.

Koeberle (2006) establece que tras la administración intravítrea de memantina existe una rápida difusión de la sustancia hacia la retina, como muestran los resultados de sus experiencias *in vitro* en ojos de oveja perfundidos, alcanzándose

rápidamente el equilibrio estacionario entre ambos compartimentos (Koeberle, 2006). Además, parece existir cierta correspondencia entre las bombas de transporte activo de aniones orgánicos del túbulo renal y las existentes a nivel de la retina (Barza, 1993; Hughes, 2005). De manera que, si como se ha visto, memantina tras su administración sistémica por vía oral, sufre parte de su aclaramiento renal por secreción tubular, entonces es de esperar que sea eliminada desde vítreo, al menos en parte, por transporte activo retiniano, respondiendo éste a una cinética de Michaelis-Menten potencialmente saturable.

Los resultados han mostrado una eliminación de memantina del compartimento vítreo más lenta tras la administración intravítrea que tras la administración subtenon, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambas vías en cuanto a las constantes de eliminación (K_{el}), los tiempos de vida media ($T_{1/2-el}$) y las cifras de aclaramiento (considerando los aclaramientos normalizados por la dosis (C_{L_n})). Creemos que este hecho podría justificarse, bien porque los altos niveles vítreos alcanzados tras la administración intravítrea pudieran llevar a una saturación de los mecanismos de transporte activo retiniano o bien por una alteración en las bombas de transporte retiniano inducida por la inflamación de los ojos administrados mediante inyección intravítrea.

Tras la administración intravítrea detectamos niveles de memantina en plasma a los 5 minutos de la inyección, niveles que fueron cuantificables hasta los 240 minutos en el caso de la formulación Ss y hasta los 360 minutos en el caso de las formulaciones Mc y Pvp. El paso de memantina a la circulación general desde el compartimento vítreo supondría, un mecanismo adicional de eliminación de la sustancia desde vítreo, junto a la eliminación por vía anterior y posterior,

mencionadas anteriormente. En nuestra opinión la contribución de la vía hemática a la eliminación de memantina desde vítreo no parece muy importante, si tenemos en cuenta que los niveles de memantina en plasma tras la administración intravítrea fueron bajos, con datos de C_{\max} que no alcanzaron los 50 ng/mL con ninguna de las formulaciones. Las características de absorción plasmática de memantina tras la administración intravítrea fueron similares para las tres formulaciones, aunque con tendencia a una absorción más rápida para la formulación Mc que por su parte fue la que presentó la cinética de eliminación más lenta, con un tiempo de vida media de eliminación ($T_{1/2-el}$) próximo a las 10 horas y un aclaramiento de unos 90 mL/min, no existiendo significación estadística en esta diferencia respecto a las otras dos formulaciones, posiblemente por la variabilidad de los datos experimentales para la formulación Mc, que hizo que los valores medios de dichos parámetros se vieran arrastrados por los valores extremos del primer individuo de la triplete.

La cinética plasmática de memantina tras la administración intravítrea fue más lenta que tras la administración subtenon, si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas vías, ni en los parámetros de absorción (K_{ab} y $T_{1/2-ab}$) ni en los parámetros de eliminación (K_{el} y $T_{1/2-el}$).

El perfil farmacocinético vítreo de memantina tras la administración endovenosa mostró un comportamiento monocompartimental con una rápida absorción. Los tiempos de vida media de absorción ($T_{1/2-ab}$) próximos a los 7 minutos, no se alejaron mucho de los encontrados para la administración subtenon, los cuales no superaron los 2 minutos. De hecho, la comparación de las cinéticas de absorción

vítrea de memantina tras la administración subtenon y endovenosa, no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre ellas en cuanto a los parámetros básicos de absorción (K_{ab} y $T_{1/2-ab}$). Sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima de memantina en humor vítreo (T_{max}) fue menor tras la administración STP (4.0 minutos) que tras la administración endovenosa (29.7 minutos), siendo esta diferencia estadísticamente significativa, lo que podría dar una idea de la velocidad de difusión de memantina a través de la esclera frente a la velocidad de penetración a través de la barrera hematorretiniana interna. La concentración máxima (C_{max}) de memantina en vítreo tras la administración endovenosa (0.10 $\mu\text{g/mL}$) resultó muy inferior a la alcanzada tras la inyección subtenon (35.09 $\mu\text{g/mL}$), coincidiendo con lo observado para otras sustancias al comparar su administración periocular y sistémica (Ayalasomayajula, 2004; Gilbert, 2003), y que da una idea de la importancia de la permeabilidad selectiva de la barrera hematorretiniana interna en la administración sistémica y de la necesidad de administrar altas dosis del fármaco por esta vía para alcanzar niveles eficaces en el segmento posterior del ojo. Koeberle en sus experiencias in vitro con ojos de oveja perfundidos, encuentra que tras la administración endovenosa el humor vítreo es el tejido ocular en el que se alcanzan las menores concentraciones de memantina, alcanzándose los mayores niveles en los tejidos con alto contenido en melanina, como el cuerpo ciliar y la coroides; y sitúa estos niveles próximos a los alcanzados en los ojos contralaterales tras la administración subtenon (Koeberle, 2006). En nuestro caso, no encontramos diferencias significativas en los valores de los AUC's de niveles vítreos obtenidos tras la administración subtenon en los ojos contralaterales (11.3 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$) y tras la administración endovenosa (26.4 $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$).

La cinética de eliminación vítrea de memantina fue más rápida tras la administración periocular-subtenon que tras la administración endovenosa, encontrando diferencias significativas en los valores de la constante de eliminación (K_{el}) y en los valores de semivida biológica ($T_{1/2-el}$) entre ambas vías, próxima a las 3 horas en el caso de la administración endovenosa y menor de 15 minutos tras la administración subtenon. Por su parte, el valor de la constante de eliminación vítrea de memantina (K_{el}) tras la administración endovenosa ($0.0043 \text{ minutos}^{-1}$) fue similar al encontrado en los ojos contralaterales tras la administración subtenon ($0.0066 \text{ minutos}^{-1}$), hecho que apoya la idea de una cinética vítrea de memantina en el caso de los ojos contralaterales dependiente de la absorción sistémica. Se obtuvieron cifras de aclaramiento vítreo de memantina significativamente mayores tras la administración endovenosa (173.4 mL/minuto frente a los 6.11 mL/minuto de la administración subtenon), condicionadas posiblemente por los altos valores de los AUC's calculados para la vía subtenon respecto a la vía endovenosa.

Encontramos diferencias significativas en la cinética plasmática de memantina entre la administración subtenon y la endovenosa, en cuanto a los parámetros cinéticos de eliminación K_{el} y $T_{1/2-el}$, siendo ésta más lenta tras la administración periocular. Ayalasonmayajula en sus experiencias con celecoxib no encuentra diferencias en las características cinéticas plasmáticas de la sustancia tras la administración subconjuntival (periocular) e intraperitoneal (sistémica), debido probablemente a que por ambas vías existe un proceso de absorción, y esto hace que el comportamiento de la sustancia sea similar (Ayalasonmayajula, 2004).

Pese a lo señalado anteriormente, los niveles de memantina en plasma tras la administración subtenon, a los 60 y 120 minutos postinyección, fueron del orden de

los encontrados tras la administración endovenosa, para esos mismos tiempos cinéticos, dando una idea del grado de absorción sistémica de memantina tras su administración periocular subtenon, como también se ha visto tras la administración subconjuntival y peribulbar de otras sustancias con las que se han llegado a alcanzar niveles en plasma próximos a los encontrados tras su administración sistémica por vía oral (Weijtens, 2000). En nuestro caso, el paso de memantina a vítreo en relación a su absorción plasmática desde el espacio subtenon, ha tomado valores superiores a la unidad, indicando un predominio de la absorción de memantina a vítreo respecto a su paso a sangre desde el espacio periocular.

Hemos analizado la biodisponibilidad vítrea de memantina desde distintos puntos de vista. En primer lugar, la biodisponibilidad vítrea absoluta tras la administración periocular-subtenon ha mostrado valores altos, próximos al 100%, con las tres formulaciones. Por su parte, la biodisponibilidad vítrea relativa de memantina tras la administración subtenon (respecto a la intravítrea) fue baja, tomando valores del 0.52%, 0.53 % y 0.58% para cada una de las formulaciones Ss, Mc y Pvp respectivamente, aunque superiores a los señalados por ejemplo, por Tsuji, que tras la administración subconjuntival de prednisolona en conejos obtiene una biodisponibilidad vítrea relativa del 0.2% (Tsuji, 1988) o por Kim, que encuentra una biodisponibilidad vítrea del 0.06% tras la aplicación de un implante escleral de DTPA (Kim, 2004). En cualquier caso, la biodisponibilidad vítrea de memantina tras la administración subtenon fue mayor que tras la administración sistémica endovenosa, a pesar de la capacidad de memantina para alcanzar el vítreo tras la administración

endovenosa, como demuestran los resultados de biodisponibilidad vítrea respecto a niveles plasmáticos, con una relación de AUC's humor vítreo/plasma de 3.6.

La biodisponibilidad vítrea de una sustancia tras su administración periocular se encuentra altamente condicionada por el grado de eliminación de la sustancia del lugar de la administración (vía de eliminación paralela), siendo ésta mayor para moléculas que se administran en solución (Gilbert, 2003). Según distintos autores existen una serie de mecanismos implicados en la eliminación periocular de la sustancia, con la consiguiente pérdida de dosis administrada. Por una parte, el aclaramiento linfático-sanguíneo conjuntival y epiescleral (Kim, 2004; Robinson, 2006) y por otra, la pérdida de dosis adicional por dispersión del volumen inyectado en el espacio y tejidos perioculares, con posibilidad incluso de reflujo del volumen inyectado y dilución en la película lagrimal (Conrad, 1980). Esta diferente dispersión-distribución del volumen inyectado en el espacio periocular, podría incluso justificar, la variabilidad interindividual de los datos experimentales en nuestro estudio. Para disminuir esta eliminación de la sustancia del lugar de la administración se han probado distintas estrategias, encaminadas a incrementar el tiempo de residencia del fármaco en el espacio periocular mediante la administración de fármacos en suspensión (Augustin, 2005) o en soluciones viscosas (Sasaki, 1999), mediante la asociación de epinefrina y otros agentes vasoconstrictores tópicos en la administración o mediante el empleo de formulaciones a base de nano- y micropartículas (Amrite, 2005); otros como Kim y Okabe han intentado mantener aislado el inóculo mediante el emplazamiento del fármaco o de la formulación que lo contiene, en bolsillos esclerales (Okabe, 2003; Kim, 2004).

Puesto que la mayoría de los estudios de farmacocinética ocular del segmento posterior, miden concentraciones del fármaco en humor vítreo, como concentraciones representativas de las alcanzadas a nivel retiniano (Lee, 2004(II)), nosotros hemos intentado teorizar sobre la cinética vítrea de memantina tras su administración periocular-subtenon posterior. A partir de los resultados obtenidos de nuestras experiencias cinéticas hemos desarrollado un modelo cinético teórico. Probablemente nuestro modelo no sea lo suficientemente preciso, pero permite hacernos una idea general de la disposición de memantina cuando ésta es administrada periocularmente por vía subtenon.

El modelo cinético que hemos propuesto para la administración periocular-STP de memantina, ha sido similar para las tres formulaciones ensayadas, considerando un modelo de cuatro compartimentos: *espacio periocular* (C1), *plasma* (C2), *humor vítreo* (C3) y un cuarto compartimento, denominado *compartimento distribución* (C4); siendo K_{12} la constante de transferencia de memantina desde plasma al compartimento distribución y K_{21} la constante de retorno desde el compartimento distribución al compartimento plasmático.

El análisis de los modelos cinéticos propuestos con anterioridad por otros autores, respecto a la administración periocular, se inicia con un modelo simple de dos compartimentos, como el propuesto por Tsuji (1988) y/o Lee (2004), para describir la liberación de prednisolona al segmento posterior tras su administración subconjuntival, en el que incluyen el *espacio periocular* y el *compartimento vítreo*, considerando el paso directo de la sustancia a vítreo y una vía de eliminación paralela a la eliminación vítrea, desde el propio espacio periocular, que supondría

una pérdida adicional de la sustancia administrada desde el lugar de la administración (Lee, 2004(II)). Más tarde, Lee y Robinson incluyen en el modelo un tercer compartimento, a modo de compartimento periférico, denominado *compartimento distribución*. Dicho compartimento, cuya localización anatómica exacta en el segmento posterior del globo ocular no se precisa, podría representar la fracción de sustancia retenida a nivel de distintas estructuras oculares como el cristalino, el cuerpo ciliar, etc (Lee, 2004(III)). Por su parte, Amrite y colaboradores (2008) tratan de desarrollar un modelo para describir la cinética retiniana de pequeñas moléculas liposolubles tras su administración subconjuntival. Según estos autores, un modelo de cuatro compartimentos explicaría adecuadamente la farmacocinética retiniana de dichas sustancias, incluyendo en el mismo: *espacio periocular*, *retina*, un compartimento periférico *distribución*, y un cuarto compartimento denominado *transferencia*, que englobaría el paso de la sustancia a través de la esclera y la unión coroides-EPR, considerando una tercera vía de eliminación paralela de la sustancia por la circulación coroidea (Amrite, 2008).

Ranta (2006) teoriza sobre un modelo cinético para describir el comportamiento vítreo de sustancias administradas periocularmente a partir de una teórica formulación de liberación sostenida (en forma de suspensiones, geles o micro- y nanopartículas) basado en la existencia de dos compartimentos: *espacio periocular* y *vítreo*, en el que incluye un *compartimento disolución* representativo de la fracción de principio activo liberado desde la formulación y disponible para su absorción en el espacio periocular, estableciendo una constante del proceso de liberación K_{rel} (Ranta, 2006).

En nuestra opinión, la tendencia hacia la modelización más simplista es una opción válida, sin embargo, el modelo bicompartimental propuesto inicialmente por Lee resultaría insuficiente para describir con detalle el comportamiento del fármaco tras su administración periocular. Por su parte, los modelos propuestos más tarde por Lee y por Amrite se asemejan más al nuestro, y sin duda, han sido la base para el desarrollo del mismo, si bien, nuestro modelo no describe todos los detalles del esquema LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación) ni pretende evaluar las diferentes barreras biológicas en la liberación transescleral de memantina.

En nuestro caso, hemos considerado un *compartimento plasmático* independiente del compartimento periférico *distribución*, que nos ha permitido un análisis más detallado de la influencia de la circulación sistémica en la cinética vítrea de memantina tras su administración subtenon. Sin embargo, en nuestro modelo no hemos considerado el compartimento disolución que estos autores establecen como compartimento intermedio entre el depósito de la sustancia en el espacio periocular y el compartimento vítreo, dado que en nuestro caso, el uso de formulaciones viscosizantes a partir de metilcelulosa y polivinilpirrolidona, teóricamente retardantes, no ha mostrado modificaciones en el perfil de liberación del fármaco, que tuvo lugar en todos los casos, de manera rápida, como se deduce de los cortos tiempos de vida media de absorción vítrea obtenidos experimentalmente; no teniendo sentido la consideración de un tiempo de latencia en nuestro modelo para ninguna de las formulaciones.

El modelo teórico que hemos desarrollado establece una pérdida adicional de memantina tras su administración STP, debido al aclaramiento sanguíneo de la

sustancia, como ya han descrito otros autores en sus estudios de modelización para la administración periocular de distintas sustancias (Lee, 2004(III); Kim, 2004; Li, 2004; Robinson, 2006). El compartimento *espacio periocular* ha sido en nuestro caso, un compartimento fugaz, desde el que la absorción de memantina, tanto hacia plasma como a humor vítreo, ocurre de forma rápida, no pudiendo considerar éste como un compartimento de depósito, para ninguna de las formulaciones ensayadas. Tal y como estableciera Kim (2004) a partir de sus experiencias, tras la administración subconjuntival el tamaño de la ampolla desciende casi un 1% del volumen inicial por cada minuto transcurrido (Kim, 2004). En nuestro modelo, el compartimento periférico *distribución*, representaría aquellas estructuras y tejidos a los que la sustancia ha tenido acceso a partir de la circulación sistémica, sin precisar de forma exacta la correspondencia anatómica de éstos, pero considerando que los ojos contralaterales y sus estructuras, formarían probablemente parte de este compartimento. Los resultados del cociente entre las constantes de transferencia y retorno (K_{12}/K_{21}) entre ambos compartimentos, muestran como la velocidad de transferencia de memantina desde plasma al teórico compartimento *distribución* fue entre 2-5 veces superior a la velocidad de retorno desde dicho compartimento, lo que justificaría una cierta tendencia a la retención de memantina en el compartimento *distribución*, como una forma de absorción no productiva de la sustancia, y que coincidiría con la idea de “compartimento reservorio” establecida por otros autores respecto al compartimento *distribución*. Como describe nuestro modelo, la absorción vítrea de memantina a partir de la circulación sanguínea fue más lenta, si la comparamos con la absorción local de memantina desde el espacio periocular, dando una idea de la menor

contribución de la vía hemática a la consecución de niveles vítreos tras la administración subtenon.

Hemos considerado dos vías de eliminación de memantina, una desde el propio compartimento vítreo y otra vía de eliminación paralela, a partir del plasma, que en cualquier caso habría de ser lenta si tenemos en cuenta que su constante de eliminación K_{el-p} en ningún caso puede ser superior a la constantes de transferencia (K_{12}) o de absorción (K_{ab-pv}). En cuanto a la eliminación de memantina del compartimento vítreo esta ocurre también de manera relativamente rápida, dado que las características físico-químicas de la sustancia hacen suponer que ésta tendrá lugar fundamentalmente por vía posterior a través del EPR y la coroides, hecho del que no tenemos datos experimentales, puesto que no hemos realizado medición de las concentraciones de memantina en otras estructuras oculares diferentes al humor vítreo, y que por tanto únicamente podemos teorizar.

Finalmente, debemos tener en cuenta que el modelo cinético mostrado, es un modelo básicamente descriptivo, desarrollado a partir de la estimación de las constantes cinéticas extraídas de nuestro estudio experimental, y que por tanto estará condicionado por las propiedades físico-químicas de memantina. Hemos visto como memantina en base a su bajo peso molecular y carácter anfipático es un buen candidato para penetrar a través de la esclera, como se deduce de las altas concentraciones alcanzadas en vítreo tras su administración subtenon. Así mismo, estas propiedades hacen que su eliminación del compartimento vítreo sea también rápida.

Los datos referentes a los efectos colaterales y toxicidad sistémica de memantina se han reseñado en el apartado de introducción, por su parte, en los ensayos clínicos con memantina realizados en humanos los exámenes oftalmoscópicos no han revelado en ningún caso signos de toxicidad ocular (López-Pousa, 2007). Debemos tener en cuenta que las dosis de memantina utilizadas en este estudio en la administración subtenon (4.5 mg/animal) e intravítrea (1.5 mg/mL), produjeron concentraciones plasmáticas de la sustancia que no superaron los 0.22 µg/mL tras la administración subtenon ni los 26.04 ng/mL tras la administración intravítrea, las cuales se sitúan en el rango de concentraciones plasmáticas alcanzadas en humanos tras el tratamiento con dosis diarias de 20 mg (75-150 ng/mL), para las que se han reportado efectos adversos sistémicos solamente de tipo leve (Kavirajan, 2009).

No hemos encontrado datos en la literatura relativos a la evaluación de la toxicidad ocular de memantina tras su administración intravítrea, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados con los de otros autores. Hare (2004) determina la seguridad ocular del tratamiento sistémico con memantina por vía oral en monos con glaucoma inducido experimentalmente, en los que no encuentra signos de toxicidad a nivel retiniano, evaluados mediante contaje de núcleos de CGR e inspección microscópica de cortes histológicos de retina teñidos con hematoxilina-eosina (Hare, 2004(II)).

El propósito del estudio de tolerancia ocular ha sido determinar la posible toxicidad local de memantina tanto a nivel retiniano como de otras estructuras oculares, tras su administración intravítrea. Para ello, testamos una dosis de

memantina de 0.5 mg en un volumen de inyección de 0.1 mL, equivalentes a una concentración de memantina en vítreo de 357.1 $\mu\text{g/mL}$, valor situado por muy encima del rango de concentraciones terapéuticas esperado, si tomamos como referencia el valor de la constante de inhibición del receptor NMDA (K_i) propuesto para memantina, en neuronas del cortex frontal humano, que se sitúa próximo a los 0.5 μmoles (160 ng/mL) (Kornhuber, 1995). De manera que, si para esta concentración de memantina no evidenciábamos signos de toxicidad, podríamos suponer la seguridad y tolerancia ocular de memantina para supuestas concentraciones terapéuticas; aunque, sin duda, habría resultado de utilidad ensayar distintas concentraciones de memantina con el objeto de establecer un rango de dosis de seguridad. Por otra parte, la utilización de dosis altas de memantina en el análisis de toxicidad justifica la elección de tiempos de seguimiento relativamente cortos en nuestro estudio, 24 horas y 7 días.

No se produjeron incidencias durante la administración de la medicación. Sin embargo, en uno de los ojos control, administrados con solución salina, pudimos observar la presencia de una lesión en la periferia del iris a modo de iridectomía, que por su localización, podría justificarse por el efecto traumático de la paracentesis en el momento de la evacuación del humor acuoso. Por su parte, no observamos en este ojo otras alteraciones asociadas, a nivel del segmento anterior ni del cristalino, tales como catarata o presencia de células inflamatorias en cámara anterior, que pudieran hacer pensar en una posible reacción inflamatoria de tipo tóxico-infeccioso, y además la histología sólo mostró una ligera hiperemia y tumefacción de los procesos ciliares en ese ojo.

La medición de la presión intraocular (PIO) se realizó mediante tonometría dinámica de impacto, con la utilización de un tonómetro de rebote tipo Tono-Vet[®], muy utilizado en clínica-veterinaria, en base a la simplicidad de la técnica y a que no precisa para su realización de anestesia tópica en gotas. Obtuvimos una variación media de la PIO pre- y postinyección de aproximadamente 2.5 mmHg en el grupo de 24 horas, y de 2 mmHg en el grupo de 7 días, no encontrando significación estadística respecto a esta variación entre los grupos. Se ha descrito como uno de los efectos adversos más frecuentes de las inyecciones intravítreas la elevación de la presión intraocular, derivada de la introducción de un volumen adicional en el compartimento vítreo, y que en cualquier caso suele ser transitoria o de fácil control mediante tratamiento hipotensor tópico (Arias, 2009).

Debemos precisar que la estimación de la PIO se hizo en todos los casos con el animal despierto y sin necesidad de anestesia tópica. No está claro en qué medida el empleo de medicaciones de tipo anestésico-sedante puede influir en la medición de la PIO, sin embargo, nosotros consideramos oportuno realizar la toma de la PIO sin premedicación del animal para no introducir posibles variables de confusión en el proceso. Los resultados publicados al respecto, establecen diferencias en el efecto de los fármacos sedantes y anestésicos sobre la PIO, en función del tipo de medicación empleada y de la especie animal en la que se aplican, pero lo que está claro es que bajo su efecto aumenta la variabilidad interindividual en la medición de la PIO (Jia, 2000). En el caso de xilacina, por ejemplo, su efecto sobre la PIO es distinto si se administra sola (reduce las cifras de PIO) o en combinación con ketamina (no produce cambios significativos en la PIO), y por su parte, ketamina cuando se utiliza de manera aislada produce un aumento de las cifras de presión intraocular.

Tras la administración intravítrea de memantina, no observamos en ningún caso erosiones o úlceras corneales ni signos inflamatorios a nivel del polo anterior, considerando éstos como la presencia de hiperemia-congestión venosa conjuntival o quemosis. Tampoco encontramos ningún caso de hemorragia subconjuntival, a pesar de ser ésta una de las complicaciones más frecuentemente observadas con las inyecciones intravítreas, y que por otra parte, deriva del propio procedimiento de inyección (Jager, 2004). En uno de los ojos administrados con memantina, en el examen a los 7 días postinyección, pudimos observar la presencia de una membrana de fibrina en el borde pupilar del iris, probablemente motivada por la atalamia generada tras una paracentesis excesiva, en la que se evacuaron más de 0.1 mL de humor acuoso. En ningún caso, este hallazgo fue considerado como clínicamente significativo, puesto que no produjo compromiso de la transparencia corneal ni asoció signos de actividad inflamatoria a nivel de otras estructuras oculares.

En todos los ojos administrados con memantina, tanto en el grupo de 24 horas como en el de 7 días, se evidenciaron opacidades en el cristalino, que en ninguno de los casos fueron corroboradas en el análisis histopatológico. Gillies justifica la aparición de catarata subcapsular posterior tras la inyección intravítrea, como un efecto derivado del aumento de la presión intraocular tras la inyección, más que por efecto cataratógeno de la sustancia, a diferencia de lo que ocurre en el caso de los corticoides intravítreos, capaces de inducir daño en el cristalino por efecto oxidativo. En otros casos se justifica la aparición de catarata por el efecto traumático de la inyección (Gillies, 2005), de hecho, la formación de cataratas se describe como una de las complicaciones más frecuentes asociadas a las inyecciones intravítreas, y que deriva

de la propia técnica de inyección (Jager, 2004; Arias, 2009). Sin embargo, ¿cómo se explicaría en nuestro caso, el hecho de haber encontrado catarata solamente en los ojos administrados con memantina y no en los ojos control, si tenemos en cuenta que la técnica y procedimiento de inyección fueron los mismos en ambos grupos? Esto nos hace pensar que o bien no se trataba realmente de cataratas, de hecho en el estudio anatómo-patológico no se encontraron signos de esclerosis ni desnaturalización de las proteínas del cristalino, o bien que dichas opacidades del cristalino, corresponden a depósitos de la medicación administrada, en la cara posterior del cristalino, justificando así su localización capsular posterior en todos los casos y la ausencia de alteraciones histológicas a nivel de la capsula y/o del epitelio subcapsular cristalino.

Frente a lo observado con otras medicaciones como el acetónido de triamcinolona que administrada por vía intravítrea en dosis altas, puede interferir en la claridad vítrea, formando incluso precipitados en el humor vítreo (Ruiz Moreno, 2007), en nuestro caso, memantina presentó una buena dispersión en vítreo tras su administración, no interfiriendo en la claridad vítrea. Este hecho supondría una ventaja desde el punto de vista de su administración en humanos por cuanto no produciría alteración en la visión (visión borrosa). Respecto a la aparición de hemorragia vítrea en uno de los ojos administrados en el grupo de 7 días, creemos que ésta puede justificarse más por el efecto traumático de la inyección que por un posible efecto de la medicación sobre la permeabilidad de los vasos retinianos, ya que no se ha documentado la presencia de receptores NMDA a nivel de los vasos retinianos. En el análisis histopatológico de alguno de los ojos, pudo identificarse la presencia de una sustancia extraña en la luz de los grandes vasos retinianos, que por

sus características tintoriales basófilas podría responder a un compuesto ácido, como el pentobarbital.

La presencia de células de estirpe inflamatoria de tipo polimorfonucleares neutrófilos en los ojos de 24 horas y mononucleares en los ojos de 7 días, observadas a nivel del cuerpo ciliar y del compartimento vítreo, carece en principio de significación clínica y responde básicamente a un mecanismo intrínseco y fisiológico de defensa del ojo, en respuesta al procedimiento invasivo de la inyección. En ningún caso, dicha reacción inflamatoria comprometió la integridad de los tejidos ni afectó a estructuras críticas como la retina o el nervio óptico. El edema de papila (cabeza del nervio óptico) es analizado en muchos trabajos como un marcador de toxicidad, aunque éste puede aparecer en respuesta a procesos de hipo- o hiperpresión ocular bruscos. En nuestro caso, el aspecto de la papila fue normal en todos los ojos administrados, tanto en el grupo de 24 horas como en el de 7 días. No se evidenciaron signos de toxicidad a nivel retiniano, encontrando una buena conservación de la citoarquitectura y proporciones de las distintas capas celulares retinianas (capa de células ganglionares, nuclear interna y nuclear externa) sin observar signos de adelgazamiento. Tampoco se documentaron alteraciones en la transición entre la capa de los fotorreceptores y la retina neurosensorial. Por su parte, los fenómenos de disrupción del EPR observados en algunos de los cortes histológicos, pueden deberse más a un artefacto relacionado con el exceso de fijación de la muestra que a un efecto tóxico de la memantina, en cuyo caso, el análisis histopatológico habría puesto de manifiesto la presencia de zonas localizadas de pérdida de fotorreceptores y agregación de células pigmentadas, con concentración de pigmento intrarretiniano, como las que se pueden observar en los casos de

toxicidad retiniana por antipalúdicos (Tzekov, 2005). En el examen histológico evidenciamos la presencia de un desprendimiento de retina asociado a edema coroideo localizado subyacente, en dos ojos, uno de los cuales pertenecía al grupo control. Dado que en ninguno de los casos identificamos la presencia de líquido subretiniano asociado ni signos degenerativos en la capa de los fotorreceptores, sospechamos un desprendimiento de retina artificial, resultante de un artefacto en la fijación de los tejidos (Ruiz-Moreno, 2007).

De nuestros resultados podemos deducir que la administración intravítrea de memantina es segura. Muchos estudios de toxicidad retiniana emplean test electrofisiológicos, como el electrorretinograma (ERG), para evaluar el efecto potencial de la sustancia sobre la función de las células retinianas, aunque se ha visto que los test funcionales son menos sensibles que las pruebas histopatológicas, y en ningún caso deben sustituir a éstas, sino completarlas.

VI

CONCLUSIONES

1. La farmacocinética vítrea de memantina en conejos tras la administración periocular-subtenon respondió a un modelo monocompartmental con absorción, mostrando un paso muy rápido de la sustancia a vítreo desde el espacio periocular y una vida media de memantina en vítreo corta (alrededor de los 15 minutos), no encontrando diferencias significativas entre las tres formulaciones en cuanto a los parámetros cinéticos de absorción y eliminación vítrea.
2. Nuestros resultados muestran una absorción local transescleral predominante para memantina tras su administración periocular-subtenon frente a la contribución de la vía hemática, con valores de los AUC's de niveles vítreos claramente superiores para la administración subtenon frente a la vía endovenosa. Se ha estimado que tras la administración periocular STP de memantina la proporción de sustancia administrada que penetra en el ojo mediante absorción local es aproximadamente de un 99%.
3. Tras la administración periocular-subtenon de memantina se detectaron niveles de la sustancia en vítreo de los ojos contralaterales. La cinética vítrea de memantina en los ojos contralaterales puede darnos una idea de la contribución de la vía hemática en la consecución de niveles vítreos tras la administración periocular.
4. La cinética plasmática de memantina tras la administración periocular-subtenon evidencia un paso rápido de la sustancia a sangre, y representa la pérdida de dosis

tras la administración periocular debida al aclaramiento sanguíneo de la sustancia del lugar de la inyección.

5. Los resultados de nuestro estudio muestran una importante biodisponibilidad absoluta de memantina tras la administración periocular-subtenon muy superior a la de la administración sistémica endovenosa. La biodisponibilidad vítrea relativa de memantina tras la administración subtenon fue baja, con un valor medio aproximado del 0.54% aunque superior a la de la vía sistémica endovenosa (0.02%).
6. La cinética vítrea de memantina tras la administración intravítrea estuvo caracterizada por elevadas áreas bajo la curva, bajos volúmenes de distribución, caída rápida de los niveles vítreos hasta los 120 minutos y semividas de eliminación de entre 50 y 100 minutos; no mostrando diferencias significativas entre las formulaciones ensayadas.
7. La cinética plasmática de memantina tras la administración sistémica endovenosa mostró un perfil monocompartimental, con una semivida de eliminación de 40 minutos, bajos valores de las áreas bajo la curva y altos volúmenes de distribución.
8. El análisis de la cinética vítrea de memantina tras su administración sistémica endovenosa en dosis única mostró una rápida absorción vítrea, con tiempos de vida media de absorción similares a los de la administración periocular, pero con

una eliminación desde el compartimento vítreo significativamente más lenta, con una tasa de penetración vítrea mayor que la unidad.

9. Del análisis conjunto de las experiencias cinéticas realizadas en este trabajo, hemos desarrollado un modelo cinético vítreo teórico, para la administración periocular-subtenon de memantina, caracterizado por cuatro compartimentos: espacio periocular, humor vítreo, plasma y compartimento de distribución; cuya cinética global ha estado caracterizada por una rápida absorción vítrea, una vida media de memantina en vítreo corta, dos vías de eliminación paralelas una desde el propio compartimento vítreo y otra a partir del plasma, y una cierta tendencia a la retención de la sustancia en el compartimento de distribución como se deduce de la relación entre las constantes de transferencia y retorno.
10. Tras la administración intravítrea de memantina no se encontraron signos histológicos ni oftalmoscópicos de toxicidad retiniana, evidenciando una buena dispersión de la sustancia en vítreo tras la administración sin interferencias en la claridad vítrea. El estudio anatómico-patológico no mostró signos de escleritis ni desnaturalización de las proteínas del cristalino, por lo que las opacidades observadas en la biomicroscopía bien podrían corresponder a depósitos de la medicación administrada sobre la cara posterior del cristalino.
11. Las nanopartículas de Gantrez AN[®] formuladas se caracterizaron por un tamaño uniforme, aspecto homogéneo y esférico. Se obtuvo un rendimiento de encapsulación de 55 µg de memantina/mg de nanopartículas, con una eficacia de adsorción del 40%. El perfil de liberación in vitro de memantina a partir de las

nanopartículas mostró un comportamiento bifásico, caracterizado por una liberación inicial rápida “en ráfaga”, seguida de una liberación sostenida de la medicación durante casi 15 días.

12. Las evaluaciones -clínica e histopatológica- realizadas sugieren una buena tolerancia ocular de las nanopartículas tras su administración subtenon e intravítrea. Los signos inflamatorios observados en los primeros días tras la administración responderían más al efecto traumático de la inyección que a un efecto tóxico de las nanopartículas, no evidenciando en ningún caso signos histológicos de toxicidad a nivel retiniano.

WIII

RESUMEN

La sobreactivación de los receptores NMDA del glutamato es responsable de la neurotoxicidad calcio-dependiente asociada a la pérdida de células ganglionares retinianas (CGRs), por esta razón, se está investigando el potencial terapéutico de los antagonistas de los receptores tipo NMDA, como memantina, en el tratamiento del glaucoma.

El trabajo que presentamos ha pretendido lograr un mejor conocimiento de la cinética ocular de memantina tras la administración periocular-subtenon, trabajando en conejos como modelo experimental, analizando el comportamiento de 3 formulaciones de memantina con distintas características de viscosidad (salina, metilcelulosa y polivinilpirrolidona), y comparando la administración periocular con otras vías de administración, como la endovenosa, y la intravítrea; estudiando además, distintos aspectos relacionados con la seguridad y tolerancia ocular de memantina tras su administración intravítrea. Así mismo, se muestra el estudio inicial de una nueva formulación de memantina a base de nanopartículas de Gantrez AN[®] en relación con su proceso de elaboración, rendimiento de encapsulación y toxicidad ocular.

Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento cinético vítreo de memantina tras la administración periocular-subtenon similar para las tres formulaciones ensayadas, caracterizado por una rápida absorción de la sustancia a

vítreo y una vida media de memantina en vítreo corta (alrededor de 15 minutos). La administración periocular-subtenon de memantina mostró una baja biodisponibilidad vítrea relativa (0.54%) aunque superior a la de la vía sistémica endovenosa (0.02%). La presencia de niveles en vítreo de los ojos contralaterales tras la administración subtenon pone de manifiesto la existencia de un paso rápido de la sustancia a sangre, y da una idea de la contribución de la vía hemática en la consecución de niveles vítreos tras la administración periocular, que fue minoritaria frente a la absorción local transescleral.

Tras la administración sistémica endovenosa observamos una rápida absorción vítrea de la sustancia, similar a la de la administración periocular, y una semivida de eliminación vítrea significativamente mayor que la de la administración subtenon. La tasa de penetración vítrea de memantina tras la administración endovenosa fue mayor que la unidad.

La administración intravítrea estuvo caracterizada por bajos volúmenes de distribución, elevadas áreas bajo la curva, y rápida caída de los niveles vítreos con una vida media de memantina en vítreo inferior a las 2 horas.

El análisis global de los resultados cinéticos obtenidos en este trabajo nos lleva a considerar un modelo cinético teórico para memantina tras administración subtenon integrado por cuatro compartimentos: espacio periocular, humor vítreo, plasma y compartimento de distribución.

Las nanopartículas de Gantrez AN[®] formuladas presentaron un tamaño uniforme, un aspecto homogéneo y esférico, un rendimiento de encapsulación de memantina de 55 µg/mL y un perfil de liberación in vitro bifásico, con una liberación inicialmente rápida seguida de una liberación sostenida durante casi 15 días.

No se detectaron signos de toxicidad retiniana tras la administración intravítrea de memantina, y por su parte, la administración subtenon e intravítrea de las nanopartículas de Gantrez fue segura.

VIII

BIBLIOGRAFIA

1. Acheampong AA, Shackleton M, John B, Burke J, Wheeler L, Tang-Liu D. Distribution of brimonidine into anterior and posterior tissues of monkey, rabbit, and rat eyes. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30(4): 421-429.
2. Ahmed I, Patton TF. Importance of the noncorneal absorption route in topical ophthalmic drug delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985; 26(4): 584-587.
3. Ambati J, Adamis AP. Transscleral drug delivery to the retina and choroid. *Prog Retin Eye Res.* 2002; 21(2): 145-151. Review.
4. Ambati J, Canakis CS, Miller JW, Gragoudas ES, Edwards A, Weissgold DJ, Kim I, Delori FC, Adamis AP. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(5): 1181-1185.
5. Amrite AC, Edelhauser HF, Kompella UB. Modeling of corneal and retinal pharmacokinetics after periocular drug administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(1): 320-332.
6. Anton A, Andrada MT, Mujica V, Calle MA, Portela J, Mayo A. Prevalence of primary open-angle glaucoma in a Spanish population: the Segovia Study. *J Glaucoma.* 2004; 13: 371-376.
7. Araie M, Mayama C. Use of calcium channel blockers for glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2011; 30(1): 54-71.
8. Areosa SA, Sherriff F. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; (3): CD003154. Review.
9. Arias L, Basauri E, Martínez F, Gómez-Ulla F. Manejo de las inyecciones intravítreas. *Guías de práctica clínica de la SERV.* Enero, 2009.
10. Augustin AJ, D'Amico DJ, Mieler WF, Schneebaum C, Beasley C. Safety of posterior juxtасcleral depot administration of the angiostatic cortisone anecortave acetate for treatment of subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005; 243(1): 9-12.
11. Ayalasonmayajula SP, Kompella UB. Retinal delivery of celecoxib is several-fold higher following subconjunctival administration compared to systemic administration. *Pharm Res.* 2004; 21(10): 1797-1804.
12. Barnils N, Mesa E, Muñoz S, Ferrer-Artola A, Arruga J. Response to idebenone and multivitamin therapy in Leber's hereditary optic neuropathy. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2007; 82(6): 377-380.
13. Bartz-Schmidt KU, Thumann G, Jonescu-Cuypers CP, Kriegelstein GK. Quantitative morphologic and functional evaluation of the optic nerve head in chronic open-angle glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 1999; 44 (S1): S41-S53.

14. Ben Simon GJ, Bakalash S, Aloni E, Rosner M. A rat model for acute rise in intraocular pressure: immune modulation as a therapeutic strategy. *Am J Ophthalmol.* 2006; 141(6): 1105-1111.
15. Bengtsson B, Leske MC, Hyman L, Heijl A; Early Manifest Glaucoma Trial Group. Fluctuation of intraocular pressure and glaucoma progression in the early manifest glaucoma trial. *Ophthalmology.* 2007; 114(2): 205-209.
16. Bertram KM, Bula DV, Pulido JS, Shippy SA, Gautam S, Lu MJ, Hatfield RM, Kim JH, Quirk MT, Arroyo JG. Amino-acid levels in subretinal and vitreous fluid of patients with retinal detachment. *Eye.* 2008; 22(4): 582-589.
17. Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, Morbio R, Varotto A. Vascular risk factors for primary open glaucoma: the Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology.* 2000; 107: 1287-1293.
18. Bourne RR. The optic nerve head in glaucoma. *Community Eye Health.* 2006; 19(59): 44-45.
19. Brooks DE, Garcia GA, Dreyer EB, Zurakowski D, Franco-Bourland RE. Vitreous body glutamate concentration in dogs with glaucoma. *Am J Vet Res.* 1997; 58(8): 864-867.
20. Budai L, Hajdú M, Budai M, Gróf P, Béni S, Noszál B, Klebovich I, Antal I. Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: studies on ciprofloxacin formulations. *Int J Pharm.* 2007; 343(1-2): 34-40.
21. Caprioli J, Coleman AL; Blood Flow in Glaucoma Discussion. Blood pressure, perfusion pressure, and glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2010; 149(5): 704-712. Review.
22. Caprioli J. The treatment of normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 1998; 126(4): 578-581.
23. Cavalli R, Gasco MR, Chetoni P, Burgalassi S, Saettone MF. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int J Pharm.* 2002; 238(1-2): 241-245.
24. Chao HM, Chidlow G, Melena J, Wood JP, Osborne NN. An investigation into the potential mechanisms underlying the neuroprotective effect of clonidine in the retina. *Brain Res.* 2000; 877(1): 47-57.
25. Chaudhary P, Ahmed F, Sharma SC. MK801, a neuroprotectant in rat hypertensive eyes. *Brain Res.* 1998; 792(1): 154-158.
26. Chen H, Weber AJ. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42(5): 966-974.
27. Chen HS, Lipton SA. Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *J Physiol.* 1997; 499(1): 27-46.
28. Chen HS, Lipton SA. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem.* 2006; 97(6): 1611-1626.

29. Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, Lipton SA. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci.* 1992; 12(11): 4427-4436.
30. Chen SR, Samoriski G, Pan HL. Antinociceptive effects of chronic administration of uncompetitive NMDA receptor antagonists in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Neuropharmacology.* 2009; 57(2): 121-126.
31. Cheng L, Hostetler KY, Chaidhawangul S, Gardner MF, Beadle JR, Keefe KS, Bergeron-Lynn G, Severson GM, Soules KA, Mueller AJ, Freeman WR. Intravitreal toxicology and duration of efficacy of a novel antiviral lipid prodrug of ganciclovir in liposome formulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(6): 1523-1532.
32. Cheng L, Hostetler KY, Gardner MF, Avila CP Jr, Bergeron-Lynn G, Severson GM, Freeman WR. Intravitreal pharmacokinetics in rabbits of the foscarnet lipid prodrug: 1-O-octadecyl-sn-glycerol-3-phosphonoformate (ODG-PFA). *Curr Eye Res.* 1999; 18(3): 161-167.
33. Cheng L, Rivero ME, Garcia CR, McDermott CD, Keefe KS, Wiley CA, Soules KA, Bergeron-Lynn G, Vekich S, Zhang K, Appelt K, Freeman WR. Evaluation of intraocular pharmacokinetics and toxicity of prinomastat (AG3340) in the rabbit. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2001; 17(3): 295-304.
34. Cheruvu NP, Amrite AC, Kompella UB. Effect of eye pigmentation on transscleral drug delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(1): 333-341.
35. Cheruvu NP, Kompella UB. Bovine and porcine transscleral solute transport: influence of lipophilicity and the Choroid-Bruch's layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(10): 4513-4522.
36. Cheung W, Guo L, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma: drug-based approaches. *Optom Vis Sci.* 2008; 85(6): 406-416. Review.
37. Chidlow G, Wood JP, Casson RJ. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs.* 2007; 67(5): 725-759. Review.
38. Coleman AL, Mosaed S, Kamal D. Medical therapy in pregnancy. *J Glaucoma.* 2005; 14: 414-416.
39. Conrad JM, Robinson JR. Mechanisms of anterior segment absorption of pilocarpine following subconjunctival injection in albino rabbits. *J Pharm Sci.* 1980; 69(8): 875-884.
40. Danesh-Meyer HV, Levin LA. Neuroprotection: extrapolating from neurologic diseases to the eye. *Am J Ophthalmol.* 2009; 148(2): 186-191.
41. Dilsiz N, Sahaboglu A, Yildiz MZ, Reichenbach A. Protective effects of various antioxidants during ischemia-reperfusion in the rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006; 244(5): 627-633.
42. Doménech-Berrozpe J, Martínez-Lanao J, Plá-Delfina JM. Biofarmacia y farmacocinética. Vol. I: FARMACOCINÉTICA. Editorial Síntesis. Madrid. 1997.

43. Doménech-Berrozpe J, Martínez-Lanao J, Plá-Delfina JM. Biofarmacia y farmacocinética. Vol. II: BIOFARMACIA. Editorial Síntesis. Madrid. 1998.
44. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1996; 114(3): 299-305.
45. Duh TH, Wu HL, Pan CW, Kou HS. Fluorimetric liquid chromatographic analysis of amantadine in urine and pharmaceutical formulation. *J Chromatogr A*. 2005; 1088(1-2): 175-181.
46. Fang JH, Wang XH, Xu ZR, Jiang FG. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage. *BMC Neurosci*. 2010; 11: 31-39.
47. Ferrante P, Ramsey A, Bunce C, Lightman S. Clinical trial to compare efficacy and side-effects of injection of posterior sub-Tenon triamcinolone versus orbital floor methylprednisolone in the management of posterior uveitis. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2004; 32(6): 563-568.
48. Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*. 2004; 137(1): 62-69.
49. Fingert JH, Stone EM, Sheffield VC, Alward WL. Myocilin glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 2002; 47(6): 547-561. Review.
50. Fuse N. Genetic bases for glaucoma. *Tohoku J Exp Med*. 2010; 221(1): 1-10.
51. Gabelt BT, Okka M, Dean TR, Kaufman PL. Aqueous humor dynamics in monkeys after topical R-DOI. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46(12): 4691-4696.
52. García-Campos J, Villena A, Díaz F, Vidal L, Moreno M, Pérez de Vargas I. Morphological and functional changes in experimental ocular hypertension and role of neuroprotective drugs. *Histol Histopathol*. 2007; 22(12): 1399-1411.
53. Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular drug delivery. *AAPS J*. 2010; 12(3): 348-360. Review.
54. Gaudana R, Jwala J, Boddu S, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Expert Review. Pharmaceutical Research*. 2009; 26: 1197-1216.
55. Geroski DH, Edelhauser HF. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 52(1): 37-48. Review.
56. Geroski DH, Edelhauser HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41(5): 961-964.
57. Ghate D, Brooks W, McCarey E, Edelhauser HF. Pharmacokinetics of intraocular drug delivery by periocular injections using ocular fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48: 2230-2237.
58. Ghate D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006; 3(2): 275-287. Review.

59. Gilbert JA, Simpson AE, Rudnick DE, Geroski DH, Aaberg TM Jr, Edelhauser HF. Transscleral permeability and intraocular concentrations of cisplatin from a collagen matrix. *J Control Release*. 2003; 89(3): 409-417.
60. Gillies MC, Kuzniarz M, Craig J, Ball M, Luo W, Simpson JM. Intravitreal triamcinolone-induced elevated intraocular pressure is associated with the development of posterior subcapsular cataract. *Ophthalmology*. 2005; 112(1): 139-143.
61. Gimeno A, Jiménez R, Ferrer JL, Rinaldi T, Suárez O, Fernández G, et al. Planificación y resultados de un programa de prevención del glaucoma. *Rev San Hig Pub*. 1988; 63: 1571-1582.
62. Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK 2nd, Wilson MR, Kass MA. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120(6): 714-720.
63. Goto W, Ota T, Morikawa N, Otori Y, Hara H, Kawazu K, Miyawaki N, Tano Y. Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina. *Brain Res*. 2002; 958(1): 10-19.
64. Grieshaber MC, Mozaffarieh M, Flammer J. What is the link between vascular dysregulation and glaucoma? *Surv Ophthalmol*. 2007; 52 (S2): S144-154.
65. Grodum K, Heijl A, Bengtsson B. Risk of glaucoma in ocular hypertension with and without pseudoexfoliation. *Ophthalmology*. 2005; 112(3): 386-390.
66. Grosheva I, Vittitow JL, Goichberg P, Gabelt BT, Kaufman PL, Borrás T, Geiger B, Bershinsky AD. Caldesmon effects on the actin cytoskeleton and cell adhesion in cultured HTM cells. *Exp Eye Res*. 2006; 82(6): 945-958.
67. Grus FH, Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N, Wax MB. Serum autoantibodies to alpha-fodrin are present in glaucoma patients from Germany and the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(3): 968-976.
68. Grus FH, Joachim SC, Wuenschig D, Rieck J, Pfeiffer N. Autoimmunity and glaucoma. *J Glaucoma*. 2008; 17(1): 79-84.
69. Guo L, Cordeiro MF. Assessment of neuroprotection in the retina with DARC. *Prog Brain Res*. 2008; 173: 437-450.
70. Guo L, Moss SE, Alexander RA, Ali RR, Fitzke FW, Cordeiro MF. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46(1): 175-182.
71. Guo L, Salt TE, Luong V, Wood N, Cheung W, Maass A, Ferrari G, Russo-Marie F, Sillito AM, Cheetham ME, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF. Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment.. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(33): 13444-13449.

72. Gupta N, Ly T, Zhang Q, Kaufman PL, Weinreb RN, Yücel YH. Chronic ocular hypertension induces dendrite pathology in the lateral geniculate nucleus of the brain. *Exp Eye Res.* 2007; 84(1): 176-184.
73. Hare W, WoldeMussie E, Lai RK. Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45(S3): S284-289.
74. Hare WA, Wheeler L. Experimental glutamatergic excitotoxicity in rabbit retinal ganglion cells: block by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(6): 2940-2948.
75. Hare WA, WoldeMussie E, Lai RK, Ton H, Ruiz G, Chun T, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, I: Functional measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(8): 2625-2639.
76. Hare WA, WoldeMussie E, Weinreb RN, Ton H, Ruiz G, Wijono M, Feldmann B, Zangwill L, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, II: Structural measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(8): 2640-2651.
77. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci.* 2002; 5(5): 405-414.
78. Hernández MR, Miao H, Lukas T. Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Progress in Brain Research.* 2008; 173: 353-373.
79. Herrero Vanrell R. New trends in controlled drug delivery to posterior segment. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2007; 82(1): 3-5.
80. Higashi Y, Uemori I, Fujii Y. Simultaneous determination of amantadine and rimantadine by HPLC in rat plasma with pre-column derivatization and fluorescence detection for pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr.* 2005; 19(9): 655-662.
81. Hirooka K, Tokuda M, Miyamoto O, Itano T, Baba T, Shiraga F. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) provides a neuroprotective effect on retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Curr Eye Res.* 2004; 28(3): 153-157.
82. Hommer A. A review of preserved and preservative-free prostaglandin analogues for the treatment of open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Drugs Today.* 2010; 46(6): 409-416.
83. Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin JE, Wilson CG. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(14): 2010-2032. Review.

84. Ishii Y, Kwong JM, Caprioli J. Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(5): 1982-1992.
85. Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET Jr. Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina.* 2004; 24(5): 676-698. Review.
86. Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, Lee VW, Yick LW, Hugon J, So KF. CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway. *Eur J Neurosci.* 2004; 19(2): 265-272.
87. Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC. Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction. *IOVS.* 2000; 41: 3415-3419.
88. Johnson EC, Guo Y, Cepurna WO, Morrison JC. Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp Eye Res.* 2009; 88(4): 808-815.
89. Jonas JB, Gusek GC, Naumann GO. Optic disc, cup and neuroretinal rim size, configuration and correlations in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29(7): 1151-1158.
90. Kaiser PK, Goldberg MF, Davis AA; Anecortave Acetate Clinical Study Group. Posterior juxtasclear depot administration of anecortave acetate. *Surv Ophthalmol.* 2007; 52(S1): S62-69.
91. Kalász H, Antal I. Drug excipients. *Curr Med Chem.* 2006; 13(21): 2535-2563.
92. Kaneda Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Kamada H, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Okamoto T, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs. *Biomaterials.* 2004; 25(16): 3259-3266.
93. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120: 701-713; discussion 829-730.
94. Kato A, Kimura H, Okabe K, Okabe J, Kunou N, Ogura Y. Feasibility of drug delivery to the posterior pole of the rabbit eye with an episcleral implant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(1): 238-244.
95. Kaur IP, Garg A, Singla AK, Aggarwal D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *Int J Pharm.* 2004; 269(1): 1-14. Review.
96. Kavirajan H. Memantine: a comprehensive review of safety and efficacy. *Expert Opin Drug Saf.* 2009; 8(1): 89-109. Review.
97. Kent AR, Nussdorf JD, David R, Tyson F, Small D, Fellows D. Vitreous concentration of topically applied brimonidine tartrate 0,2%. *Ophthalmology.* 2001; 108: 784-787.

98. Kesavan K, Balasubramaniam J, Kant S, Singh PN, Pandit JK. Newer approaches for optimal bioavailability of ocularly delivered drugs: review. *Curr Drug Deliv*. 2011; 8(2): 172-193.
99. Kim H, Robinson MR, Lizak MJ, Tansey G, Lutz RJ, Yuan P, Wang NS, Csaky KG. Controlled drug release from an ocular implant: an evaluation using dynamic three-dimensional magnetic resonance imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45(8): 2722-2731.
100. Kim TW, Kim DM, Park KH, Kim H. Neuroprotective effect of memantine in a rabbit model of optic nerve ischemia. *Korean J Ophthalmol*. 2002; 16(1): 1-7.
101. Kinabo LD, McKellar QA. Current models in pharmacokinetics: applications in veterinary pharmacology. *Vet Res Commun*. 1989; 13(2): 141-157. Review.
102. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, Schwartz M. T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(13): 7446-7451.
103. Koeberle MJ, Hughes PM, Skellern GG, Wilson CG. Pharmacokinetics and disposition of memantine in the arterially perfused bovine eye. *Pharm Res*. 2006; 23(12): 2781-2798.
104. Koga T, Koga T, Awai M, Tsutsui J, Yue B, Tanihara H. Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*. 2006; 82: 362-370.
105. Kompella UB, Bandi N, Ayalasonmayajula SP. Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 1192-1201.
106. Kornhuber J, Quack G. Cerebrospinal fluid and serum concentrations of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine in man. *Neurosci Lett*. 1995; 195(2): 137-139.
107. Kornhuber J, Riederer P, Bleich S, Wiltfang J, Kraus T, Meineke I. Pharmacokinetic characterization of amantadine in human brain tissue. *Ther Drug Monit*. 2006; 28(5): 693-695.
108. Koseki N, Araie M, Tomidokoro A, Nagahara M, Hasegawa T, Tamaki Y, Yamamoto S. A placebo-controlled 3-year study of a calcium blocker on visual field and ocular circulation in glaucoma with low-normal pressure. *Ophthalmology*. 2008; 115(11): 2049-2057.
109. Koseki N, Araie M, Yamagami J, Shirato S, Yamamoto S. Effects of oral brovincamine on visual field damage in patients with normal-tension glaucoma with low-normal intraocular pressure. *J Glaucoma*. 1999; 8(2): 117-123.

110. Kuno N, Fujii S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date. *Drugs Aging*. 2010; 27(2): 117-134.
111. Lagrèze WA, Knörle R, Bach M, Feuerstein TJ. Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39(6): 1063-1066.
112. Larrosa JM, Polo V, Pinilla I, Fernández FJ, Gonzalvo F, Honrubia FM. Cambios glaucomatosos precoces en la morfología del anillo neuroretiniano. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2001; 76: 285-290.
113. Lee TW, Robinson JR. Drug delivery to the posterior segment of the eye: some insights on the penetration pathways after subconjunctival injection. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2001; 17(6): 565-572.
114. Lee TW, Robinson JR. Drug delivery to the posterior segment of the eye II: development and validation of a simple pharmacokinetic model for subconjunctival injection. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2004; 20(1): 43-53.
115. Lee TW, Robinson JR. Drug delivery to the posterior segment of the eye III: the effect of parallel elimination pathway on the vitreous drug level after subconjunctival injection. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2004; 20(1): 55-64.
116. Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E. Early Manifest Glaucoma Trial Group: Factors for glaucoma progression and the effect of treatment. The Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121: 48-56.
117. Leske MC, Wu SY, Hennis A, Honkanen R, Nemesure B; BESs Study Group. Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology*. 2008; 115: 85-93.
118. Levin LA, Peeples P. History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. *Am J Manag Care*. 2008; 14(S1): S11-14. Review.
119. Levin LA. Neuroprotection and regeneration in glaucoma. *Ophthalmol Clin North Am*. 2005; 18: 585-596.
120. Levin LA. Retinal ganglion cells and neuroprotection for glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 2003; 48 (S1): S21-24. Review.
121. Levkovitch-Verbin H, Martin KR, Quigley HA, Baumrind LA, Pease ME, Valenta D. Measurement of amino acid levels in the vitreous humor of rats after chronic intraocular pressure elevation or optic nerve transection. *J Glaucoma*. 2002; 11(5): 396-405.
122. Levkovitch-Verbin H. A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection. *IOVS*. 2003; 44(8): 3388-3393.
123. Li SK, Molokhia SA, Jeong EK. Assessment of subconjunctival delivery with model ionic permeants and magnetic resonance imaging. *Pharm Res*. 2004; 21(12): 2175-2184.

124. Lichter PR. and the CIGTS Study Group. Interim Clinical Outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medication or surgery. *Ophthalmology*. 2001; 108: 1943-1953.
125. Lipton SA. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx*. 2004; 1(1): 101-110. Review.
126. Loftsson T, Sigurdsson HH, Konráðsdóttir F, Gísladóttir S, Jansook P, Stefánsson E. Topical drug delivery to the posterior segment of the eye: anatomical and physiological considerations. *Pharmazie*. 2008; 63(3): 171-179. Review.
127. London NJ, Chiang A, Haller JA. The dexamethasone drug delivery system: indications and evidence. *Adv Ther*. 2011; 28(5): 351-366.
128. López-Pousa S, Garre J, Vilalta J, Turon-Estrada A, Pericot-Nierga I. Mortalidad y memantina en la enfermedad de Alzheimer. *Alzheimer Real Invest Demenc*. 2007; 37: 25-32.
129. Luo X, Heidinger V, Picaud S, Lambrou G, Dreyfus H, Sahel J, Hicks D. Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42(5): 1096-1106.
130. Mackenzie PJ, Cioffi GA. Vascular anatomy of the optic nerve head. *Can J Ophthalmol*. 2008; 43(3): 308-312. Review.
131. Mao LK, Stewart WC, Shields MB. Correlation between intraocular pressure control and progressive glaucomatous damage in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1991; 111: 51-55.
132. Marano RJ, Toth I, Wimmer N, Brankov M, Rakoczy PE. Dendrimer delivery of an anti-VEGF oligonucleotide into the eye: a long-term study into inhibition of laser-induced CNV, distribution, uptake and toxicity. *Gene Ther*. 2005; 12(21): 1544-1550.
133. Martin KR, Levkovitch-Verbin H, Valenta D, Braumrind L, Pease ME, Quigley HA. Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transaction in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43: 2236-2243.
134. Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, Hauswirth WW. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44(10): 4357-4365.
135. Martínez A, Sánchez M. Predictive value of colour Doppler imaging in a prospective study of visual field progression in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005; 83(6): 716-722.
136. Maurice D. Review: practical issues in intravitreal drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2001; 17(4): 393-401. Review.

137. McKeage K. Memantine: a review of its use in moderate to severe Alzheimer's disease. *CNS Drugs*. 2009; 23(10): 881-897.
138. McKinnon SJ, Goldberg LD, Peeples P, Walt JG, Bramley TJ. Current management of glaucoma and the need for complete therapy. *Am J Manag Care*. 2008; 14(S1): S20-27.
139. McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, Tahzib NG, Reitsamer HA, Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Zack DJ. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43(4): 1077-1087.
140. Memantine HCl briefing document. Forest Pharmaceuticals. August, 2003: 87.
141. Mitchell P, Hourihan F, Sandbach J, Wang JJ. The relationship between glaucoma and myopia: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1999; 106(10): 2010-2015.
142. Muñoz-Negrete FJ, Pérez-López M, Won Kim HR, Rebolleda G. New developments in glaucoma medical treatment. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2009; 84(10): 491-500. Review.
143. Nash MS, Wood JP, Melena J, Osborne NN. Flupirtine ameliorates ischaemic-like death of rat retinal ganglion cells by preventing calcium influx. *Brain Res*. 2000; 856(1-2): 236-239.
144. Naskar R, Wissing M, Thanos S. Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43(9): 2962-2968.
145. Neufeld AH. Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma. *Brain Res Bull*. 2004; 62(6): 455-459. Review.
146. Nickells RW. From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma. *Can J Ophthalmol*. 2007; 42: 278-287.
147. Nork TM, Kim CB, Shanmuganayagam D, Van Lysel MS, Ver Hoeve JN, Folts JD. Measurement of regional choroidal blood flow in rabbits and monkeys using fluorescent microspheres. *Arch Ophthalmol*. 2006; 124(6): 860-868.
148. Nucci C, Tartaglione R, Cerulli A, Mancino R, Spanò A, Cavaliere F, Rombolà L, Bagetta G, Corasaniti MT, Morrone LA. Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat. *Int Rev Neurobiol*. 2007; 82: 397-406.
149. Nucci C, Tartaglione R, Rombolà L, Morrone LA, Fazzi E, Bagetta G. Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat. *Neurotoxicology*. 2005; 26(5): 935-941.

150. Okabe K, Kimura H, Okabe J, Kato A, Kunou N, Ogura Y. Intraocular tissue distribution of betamethasone after intrascleral administration using a non-biodegradable sustained drug delivery device. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(6): 2702-2707.
151. Olsen TW, Sanderson S, Feng X, Hubbard WC. Porcine sclera: thickness and surface area. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(8): 2529-2532.
152. Orgogozo JM, Rigaud AS, Stöfler A, Möbius HJ, Forette F. Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). *Stroke.* 2002; 33(7): 1834-1839.
153. Osborne NN, De Santis L, Bae JH, Ugarte M, Wood JP, Nash MS, Chidlow G. Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischaemia to the retina. *Exp Eye Res.* 1999; 69(3): 331-342.
154. Osborne NN. Memantine reduces alterations to the mammalian retina, in situ, induced by ischemia. *Vis Neurosci.* 1999; 16(1): 45-52.
155. Osborne NN. Pathogenesis of ganglion “cell death” in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Progress in Brain Research.* 2008; 173: 339-352.
156. Osborne NN. Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned. *Acta Ophthalmol.* 2009; 87(4): 450-454.
157. Pache M, Flammer J. A sick eye in a sick body? Systemic findings in patients with primary open-angle glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 2006; 51: 179-212.
158. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology.* 1999; 38(6): 735-767.
159. Periclou A, Ventura D, Rao N, Abramowitz W. Pharmacokinetic study of memantine in healthy and renally impaired subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 79(1): 134-143.
160. Physicians' Desk Reference. 58th ed. Thomson PDR. Montvale, NJ. 2004.
161. Pinar-Sueiro S, Rodríguez-Puertas R, Vecino E. Cannabinoid applications in glaucoma. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2011; 86(1): 16-23.
162. Pontes de Carvalho RA, Krausse ML, Murphree AL, Schmitt EE, Campochiaro PA, Maumenee IH. Delivery from episcleral explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(10): 4532-4539.
163. Puente B, Hernández E, Pérez S, Pablo L, Prieto E, García MA, Bregante MA. Determination of memantine in plasma and vitreous humour by HPLC with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatographic Science.* 2011; 49: 745-752.

164. Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol.* 1981; 99(4): 635-649.
165. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90(3): 262-267.
166. Rabey JM, Nissipeanu P, Korczyn AD. Efficacy of memantine, an NMDA receptor antagonist, in the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1992; 4: 277-282.
167. Raghava S, Hammond M, Kompella UB. Periocular routes for retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2004; 1(1): 99-114. Review.
168. Rakestraw D. Determination of amantadine in human plasma by capillary gas chromatography using electron-capture detection following derivatization with pentafluorobenzoyl chloride. *J Pharm Biomed Anal.* 1993; 11(8): 699-703.
169. Ramírez JM, Salazar JJ. Implications of astroglia in glaucomatous damage. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2008; 83(6): 339-342.
170. Ranta VP, Urtti A. Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58(11): 1164-1181. Review.
171. Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ; Memantine Study Group. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2003; 348(14): 1333-1341.
172. Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Héon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science.* 2002; 295(5557): 1077-1079.
173. Robinson MR, Lee SS, Kim H, Kim S, Lutz RJ, Galban C, Bungay PM, Yuan P, Wang NS, Kim J, Csaky KG. A rabbit model for assessing the ocular barriers to the transscleral delivery of triamcinolone acetonide. *Exp Eye Res.* 2006; 82(3): 479-487.
174. Rodriguez-Aller M, Kaufmann B, Guillarme D, Stella C, Furrer P, Rudaz S, El Zaoui I, Valamanesh F, Di Tommaso C, Behar-Cohen F, Veuthey JL, Gurny R. In vivo characterisation of a novel water-soluble Cyclosporine A prodrug for the treatment of dry eye disease. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012; 80(3): 544-552.
175. Rouland JF, Berdeaux G, Lafuma A. The economic burden of glaucoma and ocular hypertension: implications for patient management: a review. *Drugs Aging.* 2005; 22(4): 315-321.
176. Rouland JF, Morel-Mandrino P, Elena PP, Polzer H, Sunder Raj P. Timolol 0.1% gel (Nyogel 0.1% once daily versus conventional timolol 0.5% solution twice daily: a comparison of efficacy and safety. *Ophthalmologica.* 2002; 216(6): 449-454.

177. Ruiz-Moreno JM, Montero JA, Bayon A, Rueda J, Vidal M. Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide at high doses in the Rabbit. *Exp Eye Res.* 2007; 84: 342-348.
178. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today.* 2008; 13(3-4): 144-151. Review.
179. Sasaki H, Kashiwagi S, Mukai T, Nishida K, Nakamura J, Nakashima M, Ichikawa M. Topical delivery system of ophthalmic drugs by periocular injection with viscous solution. *Biol Pharm Bull.* 1999; 22(9): 961-965.
180. Schuettauf F, Quinto K, Naskar R, Zurakowski D. Effects of anti-glaucoma medications on ganglion cell survival: the DBA/2J mouse model. *Vision Res.* 2002; 42(20): 2333-2337.
181. Schwartz M. Neuroprotection as a treatment for glaucoma: pharmacological and immunological approaches. *Eur J Ophthalmol.* 2003; 13(S3): S27-31. Review.
182. Seki M, Soussou W, Manabe S, Lipton SA. Protection of retinal ganglion cells by caspase substrate-binding peptide IQACRG from N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(2): 1198-1207.
183. Sena DF, Ramchand K, Lindsley K. Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Feb 17; (2): CD006539.
184. Shaarawy T, Flammer J, Haefliger IO. Reducing intraocular pressure: is surgery better than drugs? *Eye.* 2004; 18(12): 1215-1224. Review.
185. Song J, Deng PF, Stinnett SS, Epstein DL, Rao PV. Effects of cholesterol-lowering statins on the aqueous humor outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(7): 2424-2432.
186. Stead DA, Richards RM. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for aminoglycosides in biological matrices enables the direct estimation of bacterial drug uptake. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997; 693(2): 415-421.
187. Suckow RF, Zhang MF, Collins ED, Fischman MW, Cooper TB. Sensitive and selective liquid chromatographic assay of memantine in plasma with fluorescence detection after pre-column derivatization. *Journal Chromatography B.* 1999; 729: 217-224.
188. Tezel G, Hernández R, Wax MB. Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Arch Ophthalmol.* 2000; 118(4): 511-518.
189. Tezel G, Trinkaus K, Wax MB. Alterations in the morphology of lamina cribrosa pores in glaucomatous eyes. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88(2): 251-256.
190. Tezel G. TNF-alpha signaling in glaucomatous neurodegeneration. *Prog Brain Res.* 2008; 173: 409-421.

191. Thakur A. Study 6277-146. Memantine HCl carcinogenicity study: statistical report of mouse survival and neoplastic lesions. Covance Laboratories, Inc. 2002.
192. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol.* 2000; 130: 429-440.
193. The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Am J Ophthalmol.* 1998; 126: 498-505.
194. Thoreson WB, Witkovsky P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 1999; 18(6): 765-810.
195. Thorleifsson G, Magnusson KP, Sulem P, Walters GB, Gudbjartsson DF, Stefansson H, Jonsson T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Stefansdottir G, Masson G, Hardarson GA, Petursson H, Arnarsson A, Motallebipour M, Wallerman O, Wadelius C, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Jonasson F, Stefansson K. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science.* 2007; 317(5843): 1397-1400.
196. Tsuji A, Tamai I, Sasaki K. Intraocular penetration kinetics of prednisolone after subconjunctival injection in rabbits. *Ophthalmic Res.* 1988; 20(1): 31-43.
197. Tuulonen A, Airaksinen PJ, Erola E, Forsman E, Friberg K, Kaila M, Klemetti A, Mäkelä M, Oskala P, Puska P, Suoranta L, Teir H, Uusitalo H, Vainio-Jylhä E, Vuori ML. The Finish evidence-based guideline for open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand.* 2003; 81(1): 3-18.
198. Tuulonen A, Airaksinen PJ. Initial glaucomatous optic disk and retinal nerve fiber layer abnormalities and their progression. *Am J Ophthalmol.* 1991; 111(4): 485-490.
199. Tzekov R. Ocular toxicity due to chloroquine and hydroxychloroquine: electrophysiological and visual function correlates. *Doc Ophthalmol.* 2005; 110(1): 111-120.
200. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58(11): 1131-1135. Review.
201. Van der Horst FA, Teeuwssen J, Holthuis JJ, Brinkman UA. High-performance liquid chromatographic determination of amantadine in urine after micelle-mediated pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *J Pharm Biomed Anal.* 1990; 8(8-12): 799-804.
202. Van der Valk R, Webers CAB, Schouten JSAG, et al. Intraocular pressure-lowering effects of all commonly used glaucoma drug. A meta-analysis of randomized clinical trials. *Ophthalmology.* 2005; 112: 1177-1185.

203. Vandamme TF, Brobeck L. Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. *J Control Release*. 2005; 102(1): 23-38.
204. Vandamme TF. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog Retin Eye Res*. 2002; 21(1): 15-34.
205. Vass C, Hirn C, Sycha T, Findl O, Bauer P, Schmetterer L. Medical interventions for primary open angle glaucoma and ocular hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007; (4): CD003167.
206. Venkatesh P, Garg SP, Verma L, Lakshmaiah NC, Tewari HK. Posterior subtenon injection of corticosteroids using polytetrafluoroethylene (PTFE) intravenous cannula. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2002; 30(1): 55-57.
207. Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor-Torroglosa S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP. Brimonidine's neuroprotective effects against transient ischaemia-induced retinal ganglion cell death. *Eur J Ophthalmol*. 2001; 11 (S2): S36-40.
208. Weijtens O, Schoemaker RC, Lentjes EG, Romijn FP, Cohen AF, van Meurs JC. Dexamethasone concentration in the subretinal fluid after a subconjunctival injection, a peribulbar injection, or an oral dose. *Ophthalmology*. 2000; 107(10): 1932-1938.
209. Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet*. 2004; 363: 1711-1720.
210. Werne A, Harris A, Moore D, BenZion I, Siesky B. The circadian variations in systemic blood pressure, ocular perfusion pressure, and ocular blood flow: risk factors for glaucoma? *Surv Ophthalmol*. 2008; 53(6): 559-567. Review.
211. Whitmore AV, Libby RT, John SWM. Glaucoma: thinking in new ways: a role of autonomous axonal self-destruction and compartmentalised process? *Prog Retinal Eye Res*. 2005; 24: 639-662.
212. Wierzbowska J, Robaszkiewicz J, Figurska M, Stankiewicz A. Future possibilities in glaucoma therapy. *Med Sci Monit*. 2010 Nov; 16 (11): RA252-259. Review.
213. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42(12): 2849-2855.
214. WoldeMussie E, Yoles E, Schwartz M, Ruiz G, Wheeler LA. Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats. *J Glaucoma*. 2002; 11: 474-480.
215. Xu J, Wang Y, Li Y, Yang X, Zhang P, Hou H, Shi Y, Song C. Inhibitory efficacy of intravitreal dexamethasone acetate-loaded PLGA nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2007; 23(6): 527-540.

216. Yamasaki M, Mishima HK, Yamashita H, Kashiwagi K, Murata K, Minamoto A, Inaba T. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res.* 2005; 1050(1-2): 15-26.
217. Yasukawa T, Ogura Y, Tabata Y, Kimura H, Wiedemann P, Honda Y. Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2004; 23(3): 253-281.
218. Yoneda S, Hara H, Hirata A, Fukushima M, Inomata Y, Tanihara H. Vitreous fluid levels of beta-amyloid ((1-42)) and tau in patients with retinal diseases. *Jpn J Ophthalmol.* 2005; 49(2): 106-108.
219. Yücel YH, Zhang Q, Weinreb RN, Kaufman PL, Gupta N. Effects of retinal ganglion cell loss on Magno-, Parvo-, Konicellular pathways in the lateral geniculate nucleus and the visual cortex in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2003; 22: 465-481.
220. Yücel Y, Gupta N. Glaucoma of the brain: a disease model for the study of transsynaptic neural degeneration. *Progress in Brain Research.* 2008; 173: 465-478.
221. Zarghi A, Shafaati A, Foroutan SM, Khoddam A, Madadian B. Sensitive and Rapid HPLC Method for Determination of Memantine in Human Plasma Using OPA Derivatization and Fluorescence Detection: Application to Pharmacokinetic Studies. *Sci Pharm.* 2010; 78(4): 847-856.
222. Zhang D, Vetrivel L, Verkman AS. Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production. *J Gen Physiol.* 2002; 119(6): 561-569.
223. Zhao X, Marszalec W, Toth PT, Huang J, Yeh JZ, Narahashi T. In vitro galantamine-memantine co-application: mechanism of beneficial action. *Neuropharmacology.* 2006; 51(7-8): 1181-1191.
224. Zhong L, Bradley J, Schubert W, Ahmed E, Adamis AP, Shima DT, Robinson GS, Ng YS. Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(3): 1212-1218.
225. Zhou X, Li F, Kong L, Chodosh J, Cao W. Anti-inflammatory effect of pigment epithelium-derived factor in DBA/2J mice. *Mol Vis.* 2009; 15: 438-450.

IX

ANEXOS

Determination of Memantine in Plasma and Vitreous Humour by HPLC with Precolumn Derivatization and Fluorescence Detection

Belen Puente¹, Esther Hernandez², Susana Perez³, Luis Pablo³, Esther Prieto³, Maria Angeles Garcia¹, and Miguel Angel Bregante^{2,*}

¹Department of Analytical Chemistry, School of Veterinary Science, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza (Spain);

²Department of Pharmacology and Physiology, School of Veterinary Science, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza (Spain);

³Department of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, University of Zaragoza (Spain)

Abstract

A new HPLC procedure with precolumn derivatization and rimantadine as the internal standard for determining memantine, a candidate agent for the treatment of glaucoma in plasma and vitreous humour, has been developed and validated. Precolumn derivatization was performed with 9-fluorenylmethylchloroformate-chloride (FMOC-Cl) as the derivatization reagent and followed by a liquid-liquid extraction with *n*-hexane. Optimal conditions for derivatization were an FMOC-Cl concentration of 1.5 mM, a reaction time of 20 min, the temperature at 30°C, the borate buffer pH 8.5, and a borate buffer-acetonitrile ratio of 1:1. The derivatives were analyzed by isocratic HPLC with the fluorescence detector λ_{ex} 260 nm λ_{em} 315 nm on a Novapak C₁₈ reversed-phase column with a mobile phase of acetonitrile-water (73:27, v/v), 40°C, and a flow rate of 1.2 mL/min. The linear range was 10–1000 ng/mL with a quantification limit of ~ 10 ng/mL for both types of samples. This analytical method may be suitable for using in ocular availability studies.

Introduction

Memantine (1-amino-3, 5-dimethyladamantane hydrochloride) is a novel, low-to-moderate affinity, noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist of the open channel blocker type (Figure 1). Memantine is used in the treatment of Parkinson's disease, some types of movement disorders (1), some dementia syndromes (2), and has recently been described as a potential treatment for glaucoma (3).

Memantine may rescue neurons by blocking excessive glutamate receptor activation and has been tested as a treatment for glaucoma (4–6).

Analysis of memantine concentrations in tissues is complicated because the molecule has no ultraviolet, visible, or fluorescent absorption, and cannot be directly quantified by chromatographic methods using spectrophotometric or fluorescence detection.

Methods to determine the concentrations of memantine-related compounds (amantadine, rimantadine, aminoacids, and polyamines) in biological samples include extraction and derivatization techniques coupled with gas chromatography (GC) or high-performance liquid chromatography (HPLC). A number of different derivatization reagents have been used in most of these determinations: pentafluorobenzoyl chloride (7), trichloroacetyl chloride (8, 9), 9-fluorene acetate (10), 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene (11), *o*-phthaldialdehyde and 1-thio- β -glucose (12), dansyl chloride (13), and 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (14). A new HPLC method for the determination of amantadine and its analogues in rat plasma derivatized with anthraquinone-2-sulfonyl chloride (ASC) with UV detection has recently been described (15). A number of methods to measure memantine concentrations in plasma have been developed using LC methods with fluorescence detection and dansyl chloride as the derivatization agent (16) or, alternatively, using (2-naphthoxy) acetyl chloride as the fluorescent reagent (17). These methods have shown high quantification limits (LOQ) for biological samples and pharmaceutical formulations (17) although none of them have been used to assay vitreous humour samples. Other studies, in which memantine concentrations were quantified in plasma, cerebrospinal fluid, urine, blood, and other tissues, used instruments that are not always readily available in laboratories, such as gas and liquid chromatography-mass spectrometry (18–22).

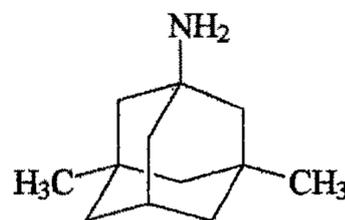


Figure 1. The structure of memantine.

*Author to whom correspondence should be addressed: email bregante@unizar.es.

Fmoc-Cl (9-fluorenylmethyl chloroformate chloride) has been shown to be a suitable reagent for fluorescence labelling of polyamines and primary and secondary amines (23–25). Fmoc-Cl has been used for the analysis of amino acids (26–28) and for assays of aminoglycoside antibiotics and other compounds containing amino groups (29–34). A method has been described by Hare et al. (6) for the quantification of memantine in serum and vitreous humor by HPLC and derivatization with Fmoc-Cl in a study of glaucoma in monkeys. This study did not optimize the analytical conditions and no information was given on the internal standard (IS) used or the LOQ. As memantine was eluted at 40 min, it is assumed that the LOQ were high.

The aim of the present study was, firstly, to develop and validate a simple, specific, and rapid method of determining memantine concentrations in the vitreous humour and plasma by HPLC with fluorescence detection using Fmoc-Cl as a derivatizing reagent, and, secondly, to test this method after subtenon (pericardial) administration of a saline formulation of memantine.

Experimental

Reagents and standard solutions

Memantine hydrochloride, amantadine hydrochloride, rimantadine hydrochloride, and neomycin hydrochloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Apramycin hydrochloride and glycine were obtained from Lab Maymo (Barcelona, Spain) and Serva (Barcelona, Spain), respectively. The derivatizing agent, Fmoc-Cl, was supplied by Sigma. Acetonitrile, methanol, and other solvents used were HPLC-grade and purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, MA).

Stock solutions of memantine, the IS (100 µg/mL), and glycine (0.1 M) were prepared in purified water, aliquoted to eppendorfs, and stored at –20°C to minimize their potential degradation. Working solutions were obtained daily by diluting these stock solutions with purified water. Memantine working solutions were prepared in the range of concentrations of 0.2–20 µg/mL and IS was prepared at 1 µg/mL. Fmoc-Cl solution (90 mM) was prepared in acetonitrile protected from light with aluminum foil and kept at 4°C until used.

Chromatographic instrumentation and conditions

The analysis was performed with a Waters (Barcelona, Spain) HPLC system equipped with two 515 HPLC pumps, a Gecko-2000 column heater (CIL Cluzeau Info Labo, Paris, France), a M-717 autosampler with the injection volume set to 10 µL, and a 474 fluorescence detector (λ_{ex}/em : 260/315 nm). The chromatograms were processed by Millennium Integration System 2000 from Waters Corporation (Milford, MA). Two types of columns from Waters were assayed: a Nova-Pak C₁₈ reversed-phase column (150 mm × 3.9 mm i.d., 4 µm) protected by a guard column cartridge (20 mm × 3.9 mm i.d.) of the same material; and a Spherisorb ODS (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm). Both columns were heated at 25°C, 30°C, and 40°C during the analysis. Likewise, different mobile phases were assayed, starting in isocratic mode with diverse proportions of an acetonitrile–water mixture (90:10,

80:20, 75:25, 73:27, and 65:35, v/v), as well as using gradient mode in a range of concentrations from 65:35 to 90:10 at different times. In addition, a methanol–water mixture was assayed in an isocratic mode at different proportions (90:10, 85:15, and 83:17, v/v). The mobile phase was filtered, degassed, and pumped at a flow rate of 1.0 and 1.2 mL/min. The IS was chosen by testing different compounds with physico-chemical characteristics similar to those of memantine hydrochloride, such as amantadine hydrochloride, neomycin hydrochloride, apramycin hydrochloride, and rimantadine hydrochloride.

Optimization derivatization and extraction conditions

The reaction of Fmoc-Cl with amines is shown in Figure 2. This reaction of memantine with Fmoc-Cl was optimized using a working solution of memantine at 1 µg/mL as a model. Several parameters were assayed: the Fmoc-Cl concentration (0.1–5 mM); the borate buffer–acetonitrile ratios (1:1–2:1, pH 5–10); the borate buffer concentration (0.025–0.2 M); temperature (25–55°C); and reaction time (5–50 min). The Fmoc-Cl reaction was stopped using different methods (glycine, methanol, or rapidly lowering temperature to 4°C).

Plasma and vitreous humour samples were frozen at –20°C until used. All samples were thawed to ambient temperature and centrifuged at 4000 rpm for 10 min. The upper layer was collected, filtered through a 0.2 µm pore nylon membrane, and aliquots (250 µL) with alkaline solution to control the amino group protonation were obtained to be derivatized, extracted, and analyzed later.

Different solvents were assayed by liquid–liquid extraction [e.g., dichloromethane, diethyl ether–chloroform mixture (7:3, v/v), and *n*-hexane]. Other variations assayed were different proportions of extraction solvent: 1:1, 1:2, 1:3, and 1:5 (v/v); extraction in one or two stages; and verification of extraction before or after the derivatization reaction.

After the derivatization reaction, the samples were extracted and agitated for 60 s on a vortex mixer. The samples were shaken at 224 oscillations/min for 30 min and centrifuged at 4000 rpm for 10 min. The organic phase then was removed and evaporated to dryness in a thermostatic bath (40°C) under nitrogen stream. The residue was reconstituted with 50 µL of acetonitrile and agitated in a vortex for 2 min; 10 µL of the solution was used for HPLC analysis.

The recovery of memantine was determined by comparing peak heights ratios obtained from the spiked vitreous humour and plasma samples and the standard aqueous samples. The assay was determined at seven concentration levels in all dynamic range (10–1000 ng/mL) using three replicates per concentration.

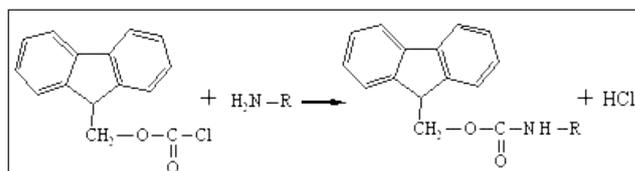


Figure 2. Simplified reaction scheme for the derivatization of memantine with 9-fluorenylmethyl chloroformate chloride (Fmoc-Cl). R = C₁₂H₁₉ (Tricycle of memantine).

Analytical method validation

Calibration

The calibration curves of memantine at seven levels of concentration for triplicate (10–1000 ng/mL) were prepared by analysis of blank plasma and vitreous humour samples spiked with appropriate volumes of memantine working solutions. Rimantadine hydrochloride, neomycin hydrochloride, apramycin hydrochloride and amantadine hydrochloride were assayed at 50 ng/mL as IS. Samples were derivatised, extracted, and analyzed by liquid chromatography. Calibration curves were obtained by the linear least-squares method, characterized using the regression coefficient, slope and intercept, and used to determine the detection limits (LOD) (35,36). The calibration curves were based on the peak height ratios of memantine with different reagents that were used as the IS.

The matrix effect

It was verified by comparing the slopes obtained in the addition samples (plasma or vitreous humour) with the slopes obtained in the analysis of aqueous samples. The t-test was used ($p < 0.05$).

Precision and accuracy

Precision and accuracy were calculated according to VICH GL2 ("Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology"). The intra- and inter-assay precision was evaluated at five concentration levels using six replicates per concentration in one day and for three different days, respectively, expressing it as the coefficient of variation (CV).

The accuracy values were determined for each concentration level by comparing the concentration of memantine obtained with the method with the nominal amount of memantine spiked (EU Council Directive 96/23/EC [2002/657/EC]).

Ruggedness study (minor changes)

The ruggedness study of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small but deliberate variations in several parameters. Ruggedness provides an indication of the reliability of an analytical procedure during normal usage. The Youden methodology was used (37). The parameters that could have influence on the results were chosen, such as the storage time of the borate buffer, acetonitrile lot or batch, operator, centrifuging time, type of membrane filter, and small variations in the mobile phase, such as flow rate and percentage of acetonitrile. This study was made using eight standards of aqueous memantine at 500 ng/mL, (Table III). The differences (D_i) and standard deviation of differences (S_{D_i}) were calculated for detecting if some parameters can have an influence on the results.

$$D_i = \sum(F_i)/4 - \sum(f_i)/4$$

$$S_{D_i} = \sqrt{\sum[2 \times \sum(D_i^2/7)]}$$

Stability

The stability of memantine and the IS in water, plasma, and vitreous humour, before and after derivatization, was studied. Each batch was prepared with six control samples of memantine and

rimantadine (500 ng/mL). All samples were frozen at -20°C for 100 days for the aqueous samples and for 15 days for plasma and vitreous humour. In addition, the stability of analytes in the samples before derivatization was also evaluated by analysis after 24 h of storage at 4°C . The stability of memantine and the rimantadine derivate were studied over a 4 days storage period at -20°C . In all the experiments, the mean values at the baseline were compared with each time and a t-test and F-test were carried out.

Application of the method

All procedures were carried out under Project License PI 07/07 and approved by the in-house Ethics Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals was compliant with the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Fifteen New Zealand white rabbits (body weights up to 2.5–3 kg) were used in the bioavailability study. A volume of 0.3 mL of memantine saline solution (15 mg/mL) was administered periorcularly by subtenon injection; the injection was performed under microscopic control, using topical lidocaine 1% drops, and the drug was injected into the tenon capsule using a 22 or 23-gauge trocar. Plasma (2 mL) and vitreous humour (1 mL) samples were obtained at 10, 60, 120, 240, and 1440 min. To that end, plasma collection was carried out using a catheter that was placed in the central ear artery. After that, the animals were sacrificed at these times after intravenous injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg), the eyes were removed and cut at the equator, and the vitreous was extracted. The samples were stored at -20°C until analysis.

Results and Discussion

Memantine concentrations in vitreous humour and plasma were quantified using HPLC coupled with fluorescence detection, following precolumn derivatization with FMOC-Cl, a reagent that reacts with both primary and secondary amines. Different authors have described various analytical methods for determining memantine concentrations in different tissues (14, 16, 17, 21, 22, 38), some of which required complicated and expensive analytical systems such as LC-MS and CG-MS that are not readily available in some laboratories.

Several different derivatization reagents have also been used, such as FMOC-Cl (6), (2-naphthoxy) acetyl chloride (17), dansyl chloride, or o-phthaldialdehyde (17); most studies reported that analytical assays used to measure adamantane, amantadine, or rimantadine could likely be adapted and used to measure memantine (16).

Optimization derivatization and extraction conditions

The derivatization reaction of memantine (Figure 2) with FMOC-Cl appeared to be dependent on the FMOC-Cl concentration, reaction time, pH, borate buffer concentration, and the volume ratio between the borate buffer and acetonitrile (Figure 3).

As can be seen, the optimal conditions for the derivatization reaction were: 1.5 mM FMOC-Cl, reaction time 20 min, borate buffer 0.1 M (pH 8.5), reaction temperature 25–40°C, borate buffer–acetonitrile ratio of 1:1–1:4.

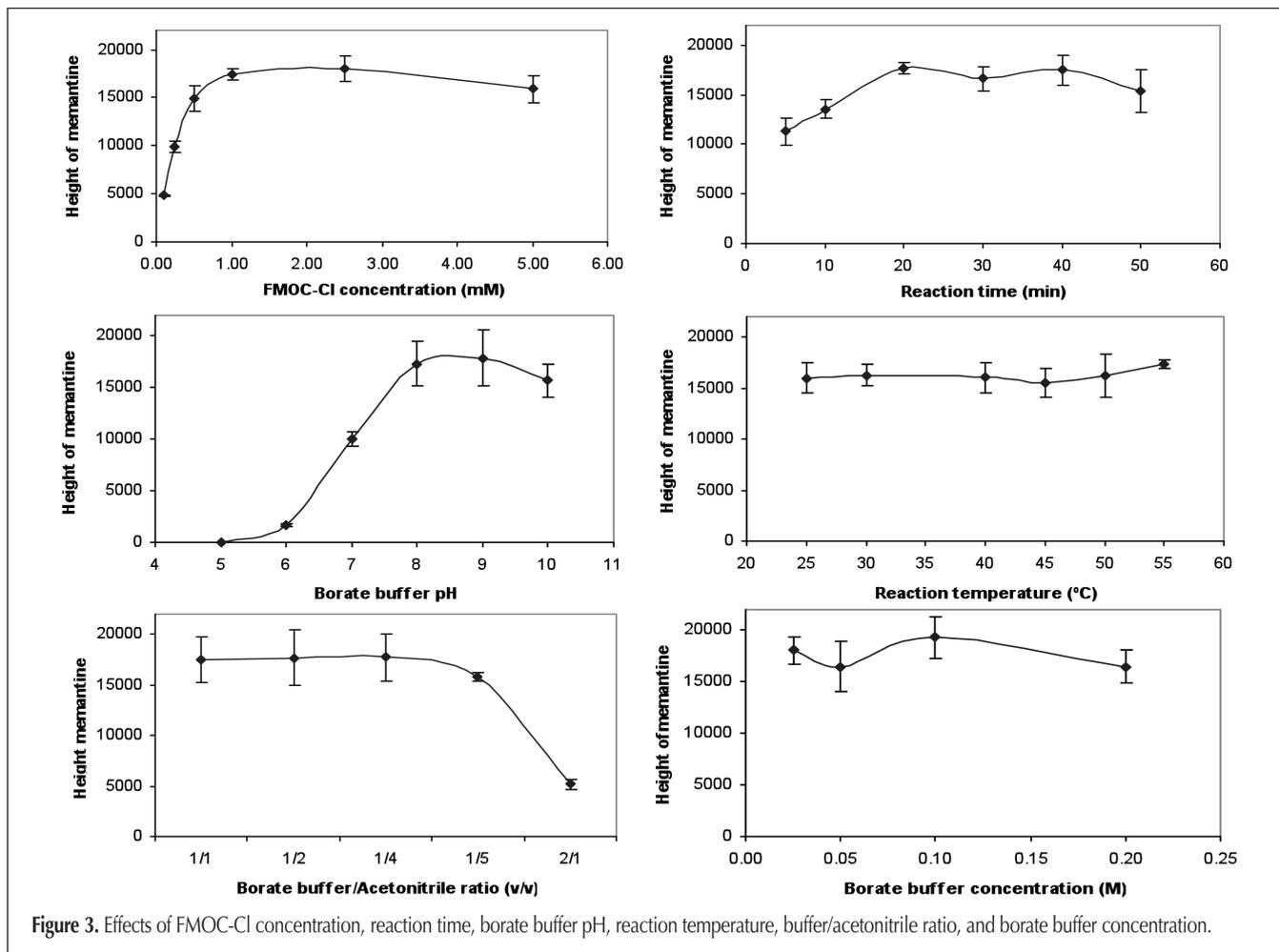
The derivatization reaction was stopped by the addition of 5 mM glycine, due mainly to the fact that the chromatographic signal of its derivatization product did not interfere with analyte signals, and excess FMOC-Cl was eluted in the void volume.

The effect of FMOC-Cl concentration was evaluated in the interval of 0.1–5 mM. The peak height of the memantine analytes formed rose quickly when the FMOC-Cl concentration was increased from 0.1 to 1 mM and further increases did not result in any significant improvement. In practice, FMOC-Cl concentration was limited to 1.5 mM because higher concentrations increased reagent excess and had a deleterious effect on the quantification of low analyte concentrations. The effect of the reaction time was evaluated in the interval of 5–50 min. Conversion yields increased when the reaction time was extended from 5 to 20 min, but no further derivatization took place after 20 min of reaction. The effect of the pH was evaluated by using borate buffers with a pH ranging from 5 to 10. The reaction progressed very rapidly, and the highest analyte responses were reached at pH 8.5. At this pH, the reactions of the amino groups of memantine and the IS with FMOC-Cl were well developed, and all peaks were clearly resolved. The effect of the reaction temperature (25–55°C) was evaluated, but no significant

improvement was observed; the appropriate reaction temperature was found to be 30°C. The effect of buffer–acetonitrile ratios from 1:1 to 2:1 and buffer concentrations of 0.025 to 0.2 M were studied. The results fell abruptly at a buffer–acetonitrile ratio of 1:4, and there were no significant differences with respect to the previous proportions. The derivatization reaction product is reduced at higher buffer–acetonitrile ratios. The results showed a precipitate using a buffer concentration of 0.2 M to the buffer–acetonitrile ratios of 1:4 and 1:5, probably due to precipitation of FMOC-Cl in the reaction media. Taking the buffer–acetonitrile ratio of 1:1 as optimal, there were no significant differences in the influence of the buffer concentration. Consequently, a buffer–acetonitrile ratio of 1:1 and a borate buffer concentration of 0.1 M were considered optimal.

To avoid problems caused by the interference of excess FMOC-Cl and the products of FMOC-Cl hydrolysis, which are highly fluorescent, several assays were performed to stop the derivatization reaction by hydrophilic reagents, such as glycine or methanol or even low temperature (i.e., rapid cooling) (15,17,24,31). The ability of hydrophilic reagents to improve the chromatographic separation of hydrophobic polyamine derivatives has been described previously (39,40). Furthermore, glycine reacts with excess FMOC-Cl, thus, eliminating extraction steps and the long incubation times often used in the derivatization reaction (41,42).

The efficiency of different solvents, including *n*-hexane, diethyl ether-chloroform mixture (7:3, v/v), and dichloro-



methane, were assayed. High background noise, low sensitivity, and several interfering peaks due to the internal standard were obtained when using the diethyl ether–chloroform mixture, and dichloromethane was used in the assay; *n*-hexane was the most efficient extraction solvent with a 1:3 ratio (v/v). No significant differences were obtained to the 1:5 ratio and when the extraction was carried out using two stages.

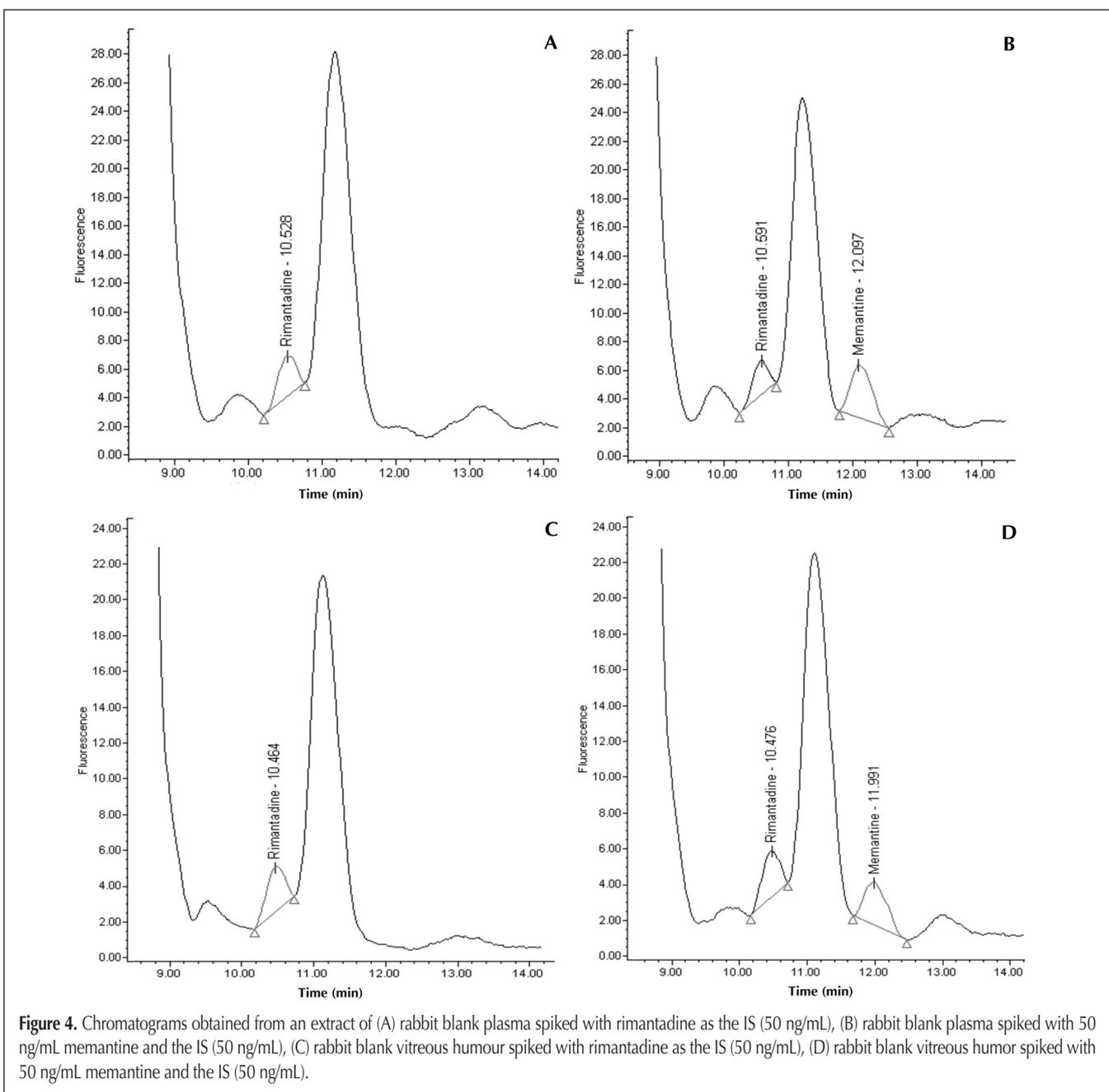
Several extraction procedures were investigated; however, due to the low molecular weight of memantine, better analyte recoveries were achieved when derivatization was followed by extraction; this was accompanied by peaks from the derivatization of endogenous matrix amines with the derivatizing agent FMOC-Cl. These peaks did not interfere with the analyte or internal standard.

In conclusion, extraction in one stage using *n*-hexane (1:3, v/v), after derivatization, was determined to be the best conditions for the assay.

The recoveries for the vitreous and plasma samples were 93.6 and 86.1%, respectively. The assay was determined at all dynamic ranges of concentrations (10–1000 ng/mL), and the Cochran test was used to corroborate that no different recoveries were found depending upon the concentration level.

Analytical results and validation

Although several chromatographic methods have been developed for the determination of memantine and similar compounds by derivatization, these studies are limited by several inadequacies, such as the lack of an internal standard (6), time-consuming extraction procedures, low extraction yields (16), poor sensitivity or prolonged elution times (6,13,17), and a high cost (18,19,21,22). Finally, no validation data or related chromatograms for memantine analysis in vitreous humour are available (6).



Memantine was analyzed in plasma and vitreous humour using HPLC coupled with fluorescence detection and precolumn derivatization with a fluorescent agent. Rimantadine was selected as the internal standard because of its suitable retention times and the stability of the derivatized product.

The Novapack C₁₈ HPLC reversed-phase column packed with 4 µm particle size, preceded by a guard column cartridge of the same material, was selected as the most efficient setup. In the present study, the optimal mobile phase was a mixture of acetonitrile–water (73:27, v/v) with a flow rate of 1.2 mL/min at 40°C and, for vitreous humour and plasma samples. When the proportion of water to acetonitrile was increased in the mobile phase, separation improved but sensitivity decreased. When the proportion of acetonitrile to water was increased, the retention time decreased and sensitivity increased; however, an interference peak was detected near the memantine peak in both vitreous humour and plasma samples. The use of gradient elution did not improve the separation. When methanol was included in the mobile phase, interference peaks were eluted after the compounds of interest. This substantially prolonged the chromatograms, making it impractical for a large number of samples because of the loss of sample stability over time.

The injection volume was 10 µL; FMOC-memantine and FMOC-rimantadine were detected at λ_{ex} 260 nm and λ_{em} 315 nm.

Under the chromatographic conditions described herein, the retention times of memantine and rimantadine were approximately 10.5 and 12.0 min, respectively. No interference peaks or baseline aberrations were observed at these retention times for plasma and vitreous humour (Figure 4A and 4C). Chromatograms (Figure 4B and 4D) showed separation of the FMOC-Cl derivatives of memantine (50 ng/mL) and rimantadine (50 ng/mL) for plasma and vitreous humour. The total analysis time did not exceed 15 min, and all the compounds eluted as distinct symmetrical peaks. Moreover, no interference from endogenous tissue constituents was observed.

Liquid–liquid extraction with *n*-hexane (1:3, v/v), after the derivatization from the plasma and vitreous humour, produced a clean extract that was free of interfering endogenous peaks, as demonstrated by the drug-free plasma and vitreous blanks (Figure 4A, 4C).

Calibration

Calibration curves were plotted as the peak height ratio (drug/internal standard) versus the drug concentration. The assay was linear in the concentration range of 10–1000 ng/mL for memantine. The linear-regression equations obtained were $y = (0.0272 \pm 0.0003)x - (0.3475 \pm 0.1466)$, $r^2 = 0.9971$ for vitreous humour ($n = 21$), and $y = (0.0198 \pm 0.0002)x - (0.0087 \pm 0.0725)$, $r^2 = 0.9987$ for plasma ($n = 21$).

The existence of matrix effects was verified by adding a standard to a blank sample (Table I). A statistical compar-

ison (*t*-test) of the slopes obtained in the addition experiment and in the analysis of synthetic samples showed that memantine was free of a matrix effect in vitreous humour (the slope of the addition experiment did not differ from the slope calculated by the analysis of water standard solutions). In contrast, in plasma there was a matrix effect, causing the slope of the addition experiment for memantine in plasma to be significantly lower than the slope obtained with water solutions.

LOQ, accuracy, precision, ruggedness, and stability

The LOD was determined as the lowest concentration with a signal-to-noise (S/N) ratio of 3. The LOD of memantine was 3 ng/mL. The LOQ, defined as S/N = 10, for plasma and vitreous humour was 10 ng/mL.

The accuracy and precision of intra- and inter-assay of memantine in tissue control samples of vitreous humour and plasma are shown in Table II. Accuracy is defined as: [(found value/added value) × 100%], which was 94.2–98.8% for vitreous humour and 96.4–105.5% for plasma, throughout the examinations for the five different concentrations. Precision is expressed as the coefficients of variation (CV). The intra- and inter-assay coefficients of variation evaluated in the standard solutions varied, respectively, between 2.0 and 8.1% and between 2.6 and 10.1% for vitreous humour, and between 2.9 and 3.8% and between 6.0 and 9.0% for plasma. The values were lower than the

Table I. Standard Addition Experiments in Vitreous Humour and Plasma from Memantine

	Ref.*	Memantine	
		Slope	R ²
Vitreous humour	94.9194	93.7825	0.9971
Plasma		84.3971 [†]	0.9987

* Slope found in the analysis of water standard solutions.
[†] The differences between the standard addition and reference slopes are significant ($p < 0.05$).

Table II. Accuracy and Intra- and Inter-Assay Precision of Memantine in Vitreous Humour and Plasma

Matrix	Theoretical conc. (ng/mL)	Intra-assay ($n = 6$)			Inter-assay ($n = 18$)		
		Conc. found (mean ± SD) (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision CV (%)	Conc. found (mean ± SD) (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision CV (%)
		Vitreous humour	10	9.7 ± 0.8	96.9	8.1	9.5 ± 1.0
	50	49.4 ± 1.7	98.8	3.4	49.1 ± 3.5	98.2	7.1
	125	119.9 ± 8.4	95.9	7.0	119.6 ± 9.8	95.7	8.2
	500	477.4 ± 9.8	95.5	2.0	476.1 ± 12.5	95.2	2.6
	1000	986.7 ± 26.0	98.7	2.6	987.0 ± 40.9	98.7	4.2
Plasma	10	10.5 ± 0.3	104.6	3.2	10.0 ± 0.6	99.5	6.0
	50	50.7 ± 1.9	101.3	3.8	48.5 ± 3.1	96.5	6.3
	125	125.1 ± 4.3	100.1	3.4	120.6 ± 9.9	96.4	8.2
	500	527.3 ± 18.2	105.5	3.4	485.9 ± 33.9	97.2	7.0
	1000	1036.7 ± 30.8	103.7	2.9	973.7 ± 87.5	97.4	9.0

reference limits cited in the literature in every case (EU Council Directive 96/23/EC [2002/657/EC]).

Minor changes that may occur in the laboratory did not produce differences in the measurement results; the standard deviation of the differences, 10.87 (Table III), was not significantly larger than the standard deviation of the method in reproducibility conditions (12.5 and 33.9 for vitreous humour and plasma, respectively, Table II). None of the factors, when taken together, had any effect on the analytical results (Table III). The analytical method was sufficiently rugged in terms of the modifications selected.

The results of the stability studies show that memantine and rimantadine are stable at -20°C after 100 days in an aqueous solution and at least 15 days in plasma and vitreous humour. No degradation of the analytes before derivatization had taken place over a 24 h storage period at 4°C with the concentration of the control samples. The stability of the derivates at -20°C up to 10 h after the derivatization indicates that the derivates are sufficiently stable for the time required for the analysis.

Application

Measurements of plasma and vitreous concentrations of memantine in rabbits after subtenon administration confirmed the utility of the proposed analytical methodology. The mean memantine concentrations in plasma and vitreous humour after the administration of 0.3 mL memantine (15 mg/mL) are shown in Table IV.

Conclusions

This analytical procedure was validated in terms of selectivity, recovery, linearity, precision, accuracy, ruggedness, and stability. The LOQ is adequate for use in ocular bioavailability studies. In conclusion, the results indicate that this HPLC procedure represents a highly specific and reproducible method that provides consistent quantification of memantine in the plasma and vitreous humour.

Table III. Experiment Design for Ruggedness Study (Minor Changes)

Parameter	Factor Value (F/f)*	Combination of determination number									
		1	2	3	4	5	6	7	8	D _i	S _{Di}
Borate buffer storage [†]	1/2	1	1	1	1	2	2	2	2	3.51	
Acetonitrile branch [‡]	1/2	1	1	2	2	1	1	2	2	5.47	
Operator [§]	12	1	2	1	2	1	2	1	2	12.39	
Centrifuging time	10/8 min	10	10	8	8	8	8	10	10	-13.02	
Type of filter	0.45/0.2 mm	0.45	0.2	0.45	0.2	0.2	0.45	0.2	0.45	-0.54	
Flow rate	1.2/1 mL/min	1.2	1	1	1.2	1.2	1	1	1.2	2.01	
% acetonitrile	73/72	73	72	72	73	72	73	73	72	-6.63	
Observed result	MT (ng/mL)	464.12	456.90	476.31	459.83	480.81	459.23	453.68	449.38	10.87	

* F/f: habitual factor/non-habitual factor; MT: memantine concentration;
 Di: differences; SDi: standard deviation of the differences
[†] 1: 25 days; 2: just prepared. [‡] 1: branch 1; 2: branch 2. [§] 1: habitual operator; 2 non-habitual operator.

Acknowledgments

This study was supported by the project 23154/2008 of the University of Zaragoza, Spain. Belen Puente received a grant from the OTRI (Investigation Research Transference Office) from the University of Zaragoza, Spain.

References

1. E. Schneider, P.A. Fischer, R. Clemens, F. Balzereit, E.W. Fünfgeld, and H.J. Haase. Effects of oral memantine on symptoms of Parkinson's disease. Results of a placebo-controlled multicenter study. *Dtsche. Med. Wochenschr.* **109**: 987–990 (1984).
2. K. Ditzler. Efficacy and tolerability of memantine in patients with dementia syndrome. A double-blind, placebo controlled trial. *Arzneimittelforschung* **41**: 773–780 (1991).
3. Y.H. Yucel, N.G. Gupta, S. Zhang, A.P. Mizisin, M.W. Kalichman, and R.N. Weinreb. Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* **124**: 217–225 (2006).
4. M.J. Koeberle, P.M. Hughes, C.G. Wilson, and G. Skellern. Development of a liquid chromatography-mass spectrometric method for measuring the binding of memantine to different melanins. *J. Chromatogr. B* **787**: 313–322 (2006).
5. M.J. Koeberle, P.M. Hughes, G.G. Skeller, and C.G. Wilson. Binding of memantine to melanin: Influence of type of melanin and characteristics. *Pharm. Res.* **20(10)**: 1702–1709 (2003).
6. W.A. Hare, E. Woldemussie, R.K. Lai, H. Ton, G. Ruiz, T. Chun, and L. Wheeler. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, I: Functional measures. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45(8)**: 2625–2639 (2004).

Table IV. Mean \pm SD Concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of Memantine after Periocular Administration (Subtenon Administration) in Rabbits of 1.8 mg/kg of Body Weight*

Time (min)	Vitreous humour \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)
10	26.80 \pm 0.21	0.208 \pm 0.017
60	1.01 \pm 0.02	0.059 \pm 0.013
120	0.21 \pm 0.12	0.030 \pm 0.012
240	0.04 \pm 0.001	0.020 \pm 0.004
1440	N.D.	N.D.

* Each value represents the mean of three independent determinations. ND = not detected.

7. D. Rakestraw. Determination of amantadine in human plasma by capillary gas chromatography using electron-capture detection following derivatization with pentafluorobenzoyl chloride. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**: 699–703 (1993).
8. P. Biandrate, G. Tognoni, G. Belvedere, A. Frigerio, M. Rizzo, and P.L. Morselli. A gas chromatographic method for the determination of amantadine in human plasma. *J. Chromatogr.* **74**: 31–34 (1972).
9. A. Sioufi and F. Pommier. Gas chromatographic determination of amantadine hydrochloride (Symmetrel) in human plasma and urine. *J. Chromatogr.* **183**: 33–39 (1980).
10. F.X. Zhou and I.S. Krull. Direct determination of adamantamine in plasma and urine with automated solid phase derivatization. *J. Chromatogr.* **619**: 93–101 (1993).
11. F.A. Van Der Horst, J. Teeuwssen, J.J. Holthuis, and U.A. Brinkman. High-performance liquid chromatographic determination of amantadine in urine after micelle-mediated pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**: 799–804 (1990).
12. Y. Higashi and Y. Fujii. Liquid chromatographic determination of 1-adamantanamine and 2-adamantanamine in human plasma after pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and 1-thio- β -D-glucose. *J. Chromatogr. B* **799**: 349–354 (2004).
13. Y. Higashi and Y. Fujii. Simultaneous determination of the binding of amantadine and its analogues to synthetic melanin by liquid chromatography after precolumn derivatization with dansyl chloride. *J. Chromatogr. Sci.* **43**: 213–217 (2005).
14. Y. Higashi, S. Nakamura, H. Matsumura, and Y. Fujii. Simultaneous liquid chromatographic assay of amantadine and its four related compounds in phosphate-buffered saline using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent derivatization reagent. *Biomed. Chromatogr.* **20**(5): 423–428 (2006).
15. C. Shuangjing, F. Fang, L. Han, and M. Ming. New method for high-performance liquid chromatographic determination of amantadine and its analogues in rat plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**: 1100–1105 (2007).
16. R.F. Suckow, M.F. Zhang, E.D. Collins, M.W. Fischman, and T.B. Cooper. Sensitive and selective liquid chromatographic assay of memantine in plasma with fluorescence detection after pre-column derivatization. *J. Chromatogr. B* **729**: 217–224 (1999).
17. T.H. Duh, H.L. Wu, C.W. Pan, and H.S. Kou. Fluorimetric liquid chromatographic analysis of amantadine in urine and pharmaceutical formulation. *J. Chromatogr. A* **1088**: 175–181 (2005).
18. R.F. Suckow. Separation methods for tricyclic antiviral drugs. *J. Chromatogr. B* **764**: 313–325 (2001).
19. J. Kornhuber, E.M. Kennepohl, S. Bleich, J. Wiltfang, T. Kraus, U. Reulbach, and I. Meineke. Memantine Pharmacotherapy: a naturalistic study using a population pharmacokinetic approach. *Clin. Pharmacokinet.* **46**(7): 599–612 (2007).
20. T. Arntd, B. Guessrewgen, A. Hohl, and J. Reis. Determination of serum amantadine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **359**: 125–131 (2005).
21. A. Almeida, D.R. Campos, G. Bernasconi, S. Calaffati, F.A.P. Barros, M.N. Eberlin, E.C. Meuret, E.G. Paris, and J. Pedrazzoli. Determination of memantine in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: Application to a bioequivalence study. *J. Chromatogr. B* **848**: 311–316 (2007).
22. W. Liu, K. Bi, X. Liu, J. Zhao, and X. Chen. Cloud-Point Extraction Combined with LC-MS for Analysis of Memantine in rat plasma. *Chromatographia* **69**: 837–842 (2009).
23. J. Verdu, P. Campins, and R. Herraes. Liquid chromatographic determination of aliphatic amines in water using solid support assisted derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Chromatographia* **55**: 129–134 (2002).
24. T. Ekegren and C. Gomes-Trolin. Determination of polyamines in human tissues by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **338**(2): 179–185 (2005).
25. G. Bahrami, S.H. Mirzaeei, and A. Kiani. Sensitive analytical method for topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B* **813**: 175–180 (2004).
26. P.A. Haynes, D. Sheumack, L.G. Greig, J. Kibby, and W.J. Redmond. Application of automated amino acid analysis using 9-fluorenylmethyl chloroformate. *J. Chromatogr.* **588**(1–2): 107–114 (1991).
27. A. Fabiani, A. Versari, G.P. Parpinello, M. Castellari, and S. Galassi. High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *J. Chromatogr. Sci.* **40**(1): 14–18 (2002).
28. R.A. Bank, E.J. Jansen, B. Beekman, and J.M. Koppele. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Anal. Biochem.* **240**(2): 167–176 (1996).
29. M. Holcomb, H.C. Thompson, and L.J. Hankins. Analysis of fumonisin B1 in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOc and Fluorescence. *J. Agri. Food. Chem.* **41**: 764–767 (1993).
30. D.A. Stead and R.M.E. Richards. Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulphate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **675**: 295–302 (1996).
31. D.A. Stead and R.M.E. Richards. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for aminoglycosides in biological matrices enables the direct estimation of bacterial drug uptake. *J. Chromatogr. B* **693**: 415–442 (1997).
32. J.A. Reid and J.D. MacNeil. Determination of neomycin in animal tissues by liquid chromatography. *J. AOAC. Int.* **82**(1): 61–67 (1999).
33. P. Edдер, L. Coppex, A. Cominoli, and C. Corvi. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Food Addit. Contam.* **19**: 232–240 (2002).
34. J.W. Kim, S.U. Kim, H.S. Lee, I. Kim, M.Y. Ahn, and K. S. Ryu. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1002**: 93–99 (2003).
35. J.N. Miller and J.C. Miller. *Estadística y Quimiometria para Química Analítica*. Prentice Hall. 4ª Edición, Madrid, 2002.
36. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/CE (2002/657/EC)
37. W.J. Youden and E.H. Steiner. *Statistical Manual of AOAC, AOAC-I*, Washington, DC. 35 (1975).
38. G. Huhn, J. Mattusch, and H. Hülz. Determination of polyamines in biological materials by HPLC with 9-fluorenylmethyl chloroformate precolumn derivatization. *Fresenius* **351**: 563–566 (1995).
39. A. Periclou, D. Ventura, N. Rao, and W. Abramowitz. Pharmacokinetic study of memantine in healthy and renally impaired subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **79**(1): 134–143 (2006).
40. J. Maier-Rosenkrantz, A. Maisch, A. Kupka, and P. Foldi. Superior precolumn derivatization of biological amines with fluorenyl derivatives using the ADAM-EVE approach. *LC-GC Int.* **7**: 509–516 (1994).
41. Y.H. Mei. A Sensitive and fast method for the determination of polyamines in biological samples. Benzoyl chloride pre-column derivatization high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **17**: 2413–2418 (1994).
42. M.T. Salazar, T.K. Smith, and A. Harris. High performance liquid chromatographic (HPLC) method for determination of biogenic amines in feedstuffs, complete feeds and animal tissues. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1708–1712 (2000).

Manuscript received May 28, 2010;
revision received September 10, 2010.

Gantrez AN Nanoparticles for Ocular Delivery of Memantine: In vitro Release Evaluation in Albino Rabbits

E. Prieto^a B. Puente^b A. Uixera^c J.A. Garcia de Jalon^c S. Perez^a L. Pablo^a
J.M. Irache^e M.A. Garcia^b M.A. Bregante^d

^aDepartment of Ophthalmology, Miguel Servet University Hospital, and Departments of ^bAnalytical Chemistry, ^cAnimal Pathology and ^dPharmacology and Physiology, Veterinary Faculty, University of Zaragoza, Zaragoza, and ^eDepartment of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, Pamplona, Spain

Key Words

Memantine • Retina • Nanoparticles • Gantrez

Abstract

Aim: To prepare and evaluate the in vitro release of memantine-loaded poly(anhydride) (Gantrez[®]) nanoparticles (NPs). The clinical safety and retinal toxicity caused by unloaded NPs after sub-Tenon and intravitreal ocular injections were also evaluated. **Methods:** Preparation and characterization of this type of NP as well as the in vitro release study are described. Twenty-three healthy New Zealand rabbits were used for clinical and histological assessment after sub-Tenon and intravitreal ocular injections of unloaded NPs. **Results:** The amount of drug associated with NPs was 55 µg of memantine/mg of NP. The release profile of memantine from this type of NPs was characterized by an initial burst effect, followed by continuous release of the drug for at least 15 days. No relevant complications were found during the clinical follow-up. The histological evaluation suggested that Gantrez NPs are well tolerated after sub-Tenon ocular injection and that signs of inflammation during the first days after intravitreal ocular injections can be considered a normal reaction of the eye's defence mechanism.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Introduction

Glaucoma affects 65 million people in the world and is the second main cause of blindness. Nearly 10% of ophthalmological disorders are related to this pathology.

This ocular disease is a neurodegenerative disease characterized by progressive degeneration of retinal ganglion cells [1]. It is characterized by structural changes in the optic disc and retinal fibre layer, as well as irreversible visual field loss. Reducing intraocular pressure helps to prevent the appearance of glaucoma and its progression in some patients; however, the reduction of intraocular pressure alone is not always effective.

Neuroprotection refers to the use of any treatment modality that prevents, retards or reverses neuronal cell death resulting from primary neuronal lesions [2, 3]. The concept of ocular neuroprotection has been advanced to treat the primary problem of glaucoma and/or neuronal death and is the name given to treatments directed at the loss of neurons. This address is the mechanism by which cell injury results in cell death or dysfunction, while lowering intraocular pressure, thus addressing the process responsible for cell injury.

Excessive activity of NMDA-type (N-methyl-D-aspartate) glutamatergic channels has been pointed to as a

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy
for personal
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
0030-3747/12/0000-0000\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ore

M.A. Bregante
Department of Pharmacology and Physiology
Faculty of Veterinary Medicine, Miguel Servet 177
ES-50013 Zaragoza (Spain)
Tel. +34 976 761 627, E-Mail bregante@unizar.es

mechanism for neuronal injury in neurological disorders, including glaucoma and retinal disease. So memantine, an NMDA-type glutamatergic channel blocker, could be effective in reversing experimental excitotoxicity [4].

Memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantane) is a low-affinity voltage-dependent uncompetitive antagonist to glutamatergic NMDA receptors. This drug is able to inhibit the prolonged flow of Ca^{2+} ions which represents the basis of neuronal excitotoxicity. Therefore, memantine may rescue neurons by its blockade of excessive glutamate receptor activation and can prevent ganglion cell death mediated by NMDA activation. Currently, studies have shown that treatment with memantine protected retinal ganglion cells in monkey models of glaucoma, reducing ganglion cell loss during treatment with this drug, measured by multifocal electroretinography and visual evoked responses [5].

So far, clinical applications of these neuroprotective therapies have been conditional upon the highly systemic doses needed to achieve treatment concentrations in target tissue, such as the retinal ganglion cell layer.

An important goal is the development of a safe and effective means of chronic delivery of memantine to the posterior pole [6–8].

At present, eye medications are given in different ways including topical, systemic, intraocular and periocular. When a systemic route (i.e. parenteral or oral) is used, the main concern is that drug doses are usually too high and side effects are exacerbated. On the other hand, when a drug is delivered topically (e.g. as eye drops), the fraction of dose remaining on the corneal surface is usually too low to achieve effective drug concentrations in the vitreous or other internal tissues [9, 10]. Therefore, in many cases, only 'invasive' forms of delivery (i.e. intravitreal or sub-Tenon routes) are capable of offering sufficient drug concentrations to the inner parts of the eye.

Specifically, nanoparticles (NPs) have been proven to come in useful in increasing the bioavailability of some active molecules in ophthalmology [11–14]. In our case we selected a copolymer of methyl vinyl ether and maleic anhydride (Gantrez[®] AN) as material for the preparation of NPs. This copolymer is widely used for pharmaceutical and medical purposes. In addition, the resulting NPs have demonstrated adequate abilities to control the release of the loaded drug and its biocompatibility [11–13].

The objectives of this study were the preparation, characterization and in vitro evaluation of memantine-loaded NPs. In addition, the clinical safety and retinal toxic response induced by these NPs after sub-Tenon and intravitreal administration were also evaluated.

Materials and Methods

Chemicals

Gantrez AN 119 [poly(methyl vinyl ether-comaleic anhydride) or poly(anhydride); MW 200,000] was a kind gift by ISP (Barcelona, Spain). Memantine hydrochloride (grade >98% GC) was provided by Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Acetone and ethanol were obtained from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) and phosphate-buffered saline from Gibco (Spain). *o*-Phthalaldehyde was supplied by Molecular Probes (USA). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from Merck (Madrid, Spain): methanol, 2-mercaptoethanol, boric acid, potassium hydroxide.

Preparation of Poly(anhydride) NPs

Poly(anhydride) NPs were prepared by a solvent displacement method [15]. Memantine was then added to the NPs by simple incubation in an aqueous medium at room temperature. Briefly, 10 ml of an ethanol-water mixture (1:1, v/v) was dripped slowly into 5 ml of previously dissolved acetone containing 100 mg Gantrez AN. The organic solvents were removed under reduced pressure (Büchi R-144, Switzerland) and 10 mg of memantine hydrochloride, previously dissolved in 1 ml of water, was dispersed in the freshly prepared NPs and incubated for 30 min under magnetic stirring at room temperature. After this time, the resulting carriers were purified by centrifugation at 20,000 rpm for 20 min (sigma 3K30, Germany). The supernatants produced at the purification stage were collected and stored at -20°C in order to quantify the unloaded memantine. Finally, the pellets were resuspended in water, and the formulations were frozen and freeze-dried (Genesis 12EL, Virtis, USA) using sucrose (5% w/v) as a cryoprotector. The resulting formulation was termed memantine-loaded NPs.

Control NPs were prepared in the same way, in the absence of memantine and all batches of lyophilized NPs were stored at room temperature until use. That period was less than 3 months after fabrication. During this period of time, and when the NPs are stored as dry powder under room temperature, the stability is higher than 1 year.

Physicochemical Characterization of NPs

The particle size and the ζ -potential of NPs were determined by photon correlation spectroscopy and electrophoretic laser Doppler anemometry, respectively, using a Zetamaster analyser system (Malvern Instruments, UK). Samples were diluted with double distilled water (measure of size) or 1 mM KCl (quantification of ζ -potential) and examined at room temperature. All measurements were performed in triplicate.

The morphological characteristics of the NPs were examined by scanning electron microscopy (Zeiss DSM 940A SEM; Oberkochen, Germany) with a digital imaging capture system (Point Electronic GmbH, Halle, Germany). For this purpose, freeze-dried NPs were resuspended in ultrapure water and centrifuged at 20,000 rpm for 20 min at 4°C . Supernatants were then rejected and the pellets were mounted on a glass plate on metal stubs, using double-sided adhesive tape, and dried under hot flow air. Finally, the particles were coated with a thin layer of 12 nm of gold using an Emitech K550 sputtering device (Emitech, UK).

The yield of the NP preparation process was determined by gravimetry as described previously [16]. Briefly, Gantrez AN NPs, freshly prepared, were freeze-dried in the absence of the cryopro-

tor. The yield was then calculated as the difference between the initial amount of polymer used to prepare NPs and the weight of the freeze-dried carriers.

Memantine Quantification

The amount of memantine added to the NPs was estimated by quantification of free memantine in the supernatants obtained during the purification phase using a fluorometric method with *o*-phthalaldehyde, previously described [17] and validated [18] in terms of accuracy precision, specificity, linearity and detection limits.

A stock standard solution of *o*-phthalaldehyde was prepared by dissolving it in methanol (125 mg in 1.5 ml); 200 μ l of 2-mercaptoethanol was then added and the mixture taken up to a volume of 100 ml with borate buffer 0.4 M, titrated to pH 10.4 with KOH. This solution was stored in the dark at 4°C for not more than 1 week. A stock standard solution of memantine was prepared by directly dissolving commercially available reagent in doubly distilled water at a concentration of 100 μ g/ml. Working solutions were prepared by diluting the stock solution in water within a range of 0–50 μ g/ml.

In a set of 96 microtiter plates (Thermo Lab Systems, Vantaa, Finland) a volume of 50 μ l of working solution of memantine and 100 μ l of stock *o*-phthalaldehyde standard solution were added per well. After shaking the mixture for 60 s, fluorescence measurements were performed in a spectrophotometer at λ_{ex} 340 nm and λ_{em} 450 nm (Labsystems iEMS Reader MF, Finland).

For analysis, the supernatants (obtained from control NPs and memantine NPs) were defrosted at room temperature and diluted with ultrapure water (1:60, v/v). Each sample was assayed in triplicate and no interferences from the presence of poly(anhydride) were found in the memantine analysis.

The amount of memantine associated with the NPs was calculated as the difference between the initial amount of memantine added and the amount of memantine determined in the supernatants. Thus, memantine loading was expressed as the amount of memantine (in micrograms) per milligram of NPs, whereas the association efficiency was determined as follows:

$$\text{association efficiency (\%)} = (Q_{\text{associated}}/Q_{\text{initial}}) \times 100$$

where $Q_{\text{associated}}$ is the total weight of memantine entrapped in the batch of NPs and Q_{initial} is the initial weight of memantine added.

In vitro Release Study

In order to obtain the memantine release profile from poly(anhydride) NPs, 10 mg of lyophilized memantine NPs was dispersed in 1 ml phosphate-buffered saline (from Gibco™, pH 7.4, containing 0.1% sodium azide as preservative) in Eppendorf tubes. The samples were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ under agitation in a VorTemp 56™ Shaking Incubator (Labnet International Inc.) for specified periods of time. At each time interval, samples were assayed in triplicate and blank Gantrez AN NPs were used as a control. After the incubation, formulations were centrifuged at 17,000 rpm (Allegra™ X-22R Centrifuge, Beckman Coulter) for 20 min at 4°C. The memantine released was quantified in the supernatants, which were frozen at -80°C to be analysed later by the fluorometric method as described above. The release profile was expressed in terms of cumulative release in percentages, and plotted versus time.

Intravitreal and Sub-Tenon Administration

All injections were performed under general anaesthesia and aseptic conditions. General anaesthesia was achieved by intramuscular injection of 20 mg/kg of ketamine and 2 mg/kg of xylazine. All formulations were prepared under aseptic conditions

Sub-Tenon and Intravitreal Injection of NPs

The ocular sub-Tenon injection was carried out in the posterior space; the ocular surface was anaesthetized using topical 4% lidocaine drops. Adequate exposure was obtained by placing an eyelid speculum. The episcleral layer was entered using a 22-gauge trocar, with a 0.85×25 -mm intravenous cannula made of polytetrafluorethylene. The trocar was advanced approximately 12–15 mm into the episcleral space using a Zeiss Omi 99 microscope for visualization (Germany).

Intravitreal injections (0.1 ml) were given (in both eyes) in the approximate centre of the vitreous humour through a 27-gauge needle inserted below the superior rectus muscle, 2–3 mm from the corneal limbus. Previously, 0.1 ml of aqueous humour had been removed through a 27-gauge needle.

Eventually, 23 healthy New Zealand white rabbits, weighing 2–3 kg and aged 2–3 months, were selected and divided into two lots (1 and 2). In lot 1 thirteen animals were injected intravitreally with 1.6 mg of NPs in 0.1 ml of saline solution. This group of animals underwent bilateral enucleation at 24 h and 1, 2, 3 and 6 weeks after injection. In lot 2 ten animals received 4 mg of NPs in 0.3 ml of saline solution through the sub-Tenon space. This group of animals underwent bilateral enucleation at 1, 2 and 3 weeks after treatment.

One animal from each lot, intravitreally and via the sub-Tenon space, was used as a control and received only 0.1 ml and 0.3 ml of saline solution, respectively.

Clinical Evaluation

All rabbits from both the sub-Tenon and intravitreal groups were examined by slit lamp and indirect ophthalmoscopy before injection and at each successive predetermined time point (24 h, 1, 2, 3 and 6 weeks after injection for the intravitreal group, and 1, 2, 3 weeks after injection for the sub-Tenon group).

The aim of the visual inspection was to look for signs of inflammation at the anterior pole of the eye. The frequency and severity of conjunctival hyperaemia and chemosis, subconjunctival haemorrhage, iris vessel engorgement and cataract formation were evaluated using a scale of 0–3 for grading: grade 0 for normal; 1 for slight conjunctiva and iris congestion; 2 for moderate, and 3 for severe congestion or hyperaemia. Cataract formation was analysed and encoded in terms of cataract type (nuclear, cortical or subcapsular), extension (focal or diffuse) and density (grade 1 corresponded to a slight opacity that provided a clear view of the details of the fundus; grade 2 indicated moderate opacity; grade 3 was total opacity, making observing details of the retina difficult).

Vitreous clarity was evaluated by indirect ophthalmoscopic examination, and a scale of 0–4 was used for assessing this. Briefly, grade 0 indicated a clear view of retinal details, grade 1 corresponded to slight obscuration of retinal details; mild obscuration of retinal details with a clearer view of small retinal vessels was grade 2; moderate obscuration of retinal details with visibility of only large vessels corresponded to grade 3, while grade 4 indicated that only a faint view of the retina could be observed, only

Table 1. Characterization of NPs (means \pm SD, n = 10)

	Size nm	Polydispersity index	ζ -Potential mV	Yield %	Memantine content μ g/mg NP	Encapsulation efficiency %
NP	186 \pm 26	0.081 \pm 0.010	-48.3 \pm 2.5	81 \pm 2	-	-
Mem-NP	179 \pm 25	0.154 \pm 0.032	-51.2 \pm 2.1	78 \pm 2	54.6 \pm 16.0	38.7 \pm 11.8

NP = Gantrez AN control NPs; Mem-NP = memantine-loaded NPs. Size and polydispersity index of the NP batches were assessed by photon correlation spectroscopy, the ζ -potential by electrophoretic laser Doppler anemometry; yield of the polymer was transformed into NPs; memantine content indicates the amount of memantine loaded into NPs.

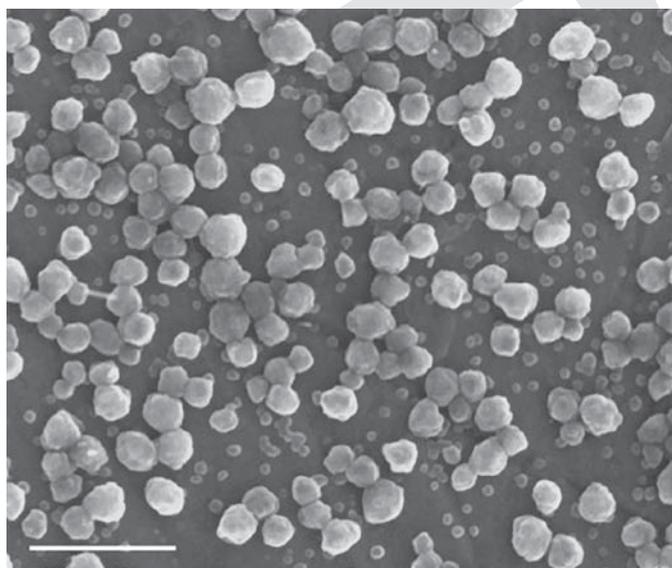


Fig. 1. SEM for lyophilized NPs loaded with memantine. Scale bar = 1 μ m.

intuitively detecting the optic nerve papilla. Other findings such as vitreous haemorrhage, areas of local retinal inflammation, retinal detachment, retinal fibrosis or retinal haemorrhages were analysed in the fundus examination.

Histopathology

After the macroscopic analysis, all rabbits that had been injected through the sub-Tenon space and intravitreally were euthanized by intravenous injection of 20% sodium pentobarbital (30 mg/kg) and the eyes immediately enucleated. Previously, the globes had been marked off at the 12-o'clock position with a scleral silk 6-0 suture. Then the globes of periocular tissues were removed (muscle, Tenon capsule and conjunctiva) and washed with 0.9% saline solution. An aqueous paracentesis with a 27-gauge needle was undertaken to decrease intraocular pressure before the injection of 0.1 ml of fixative solution into the vitreous cavity. Afterwards, the globes were immersed in 10% formaldehyde fixative solution and sent to the Histology and Pa-

thology Department of Veterinary Science, University of Zaragoza, for analysis.

The samples were processed and dyed with haematoxylin-eosin for light-microscopic examination and assessment of the following parameters: preservation of the architecture and normal proportions of the different eye structures, specifically the retinal layers (retinal pigment epithelium, inner and outer segments of photoreceptors, external nuclear layer, internal nuclear layer and ganglion cell layer). The presence of degeneration or necrotic processes, inflammatory signs and abnormal cell growths, such as atrophy, hyperplasia, neoplasia or neovascularization, was evaluated. A retinal morphometric analysis was performed using the Image Analysis System NIS-Elements ver. 3.07 (Nikon), to determine the neurosensory mean retinal thickness and both external and internal nuclear layers and ganglion cell layer thickness.

Other parameters such as optic disc oedema or retinal detachment were also analysed.

All procedures were carried out under Project License PI 07/07 approved by the in-house Ethics Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza (Spain). The care and use of animals was compliant with the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Results

Characterization of Gantrez NPs

The main physicochemical properties of poly(anhydride) NP formulations are summarized in table 1. Overall, the memantine-loaded NPs displayed a similar mean size to that of control NPs (186 vs. 179 nm, respectively). Furthermore, both control and memantine-loaded NPs displayed a quite homogeneous aspect as indicated by the low polydispersity index. The morphological analysis by SEM confirmed that memantine-loaded NPs consisted of a homogeneous population of almost spherical and rough particles (fig. 1). On the other hand, slight differences in the negative surface charge were found for both types of NPs. Finally, the amount of drug associated with NPs was

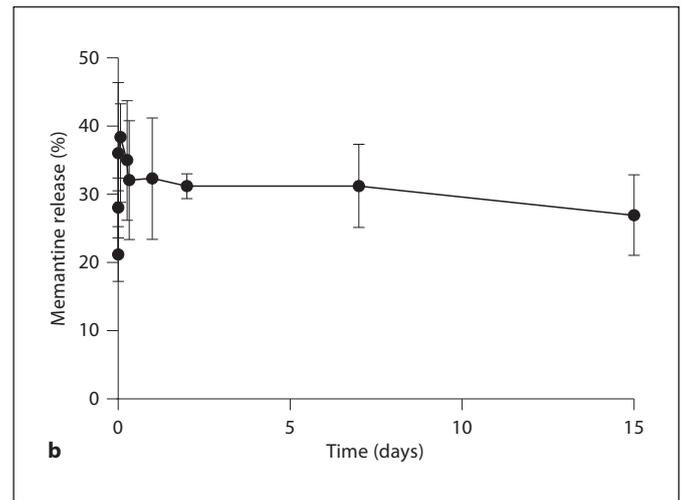
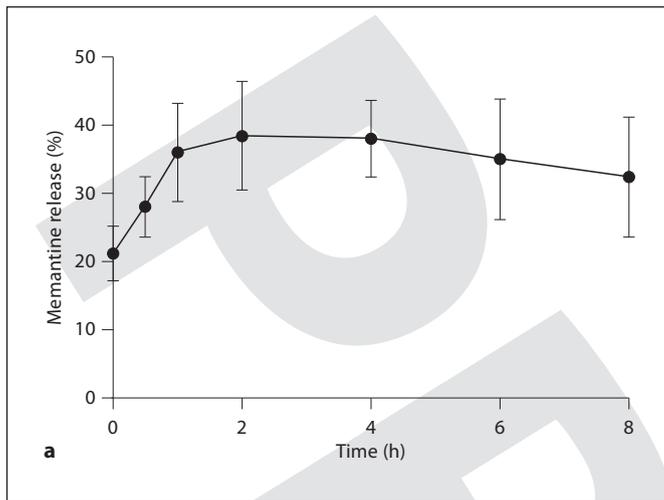


Fig. 2. Release profiles from memantine-loaded Gantrez NPs after incubation under physiological conditions: phosphate-buffered saline, pH 7.4 (0–15 days) at 37°C. Data are represented as means \pm SD (n = 3). **a** To 8 h. **b** To 15 days.

calculated to be about 55 μg memantine per milligram of NPs, with an association efficiency of about 40%.

In vitro Release Study

Figure 2 shows the release profile of memantine from poly(anhydride) NPs under physiological conditions (phosphate-buffered saline, pH 7.4) over 15 days. These NPs displayed a biphasic release pattern characterized by an initial burst effect, followed by a continuous release of the drug over the course of at least 15 days. Initially, the amount of memantine released increased rapidly during the first 2 h. At this point about 35% of the loaded memantine had been released from the NPs. Levels of released memantine were then maintained constant for at least 7 days. On day 15, the amount of released memantine was slightly lower than on day 7, due probably to degrading.

Clinical Safety

Ophthalmoscopic and Clinical Observations

Tables 2 and 3 show the results of clinical examination after intravitreal and sub-Tenon administration of NPs. One and 2 weeks after treatment, variable degrees of conjunctival hyperaemia and chemosis – slight or mild – were found in all eyes in the sub-Tenon group; however, these had disappeared at the 3-week control. In 10 of 18 sub-Tenon-injected eyes, conjunctival haemorrhage was observed, coinciding with the injection site, around the superior rectus muscle insertion. Only 1 eye in the sub-

Tenon group showed vascular engorgement of the iris at week 2 after injection.

Variable grades of cataract were observed in some eyes in the intravitreal group; however, this was not observed in the sub-Tenon group. In most cases, this manifested itself as a focal lens opacity located in the lower quadrants, in the posterior lens capsule, with higher density cataracts in eyes at the 3-week control but without this causing any difficulty for fundus examination. Immediately after the intravitreal injection, the formulation was visible as a whitish film in the vitreous. During the 6 weeks of follow-up, this film remained floating in the anterior vitreous next to the posterior surface of the lens and in the inferior vitreous forming whitish lumps. Four eyes that had received more traumatic NP intravitreal injections showed a vitreous haemorrhage, slightly obscuring the view of retinal details. Indirect ophthalmoscopy did not reveal any retinal lesion, such as retinal detachment or haemorrhage. None of the eyes showed optic disc inflammation or oedema. No signs of local retinal inflammation or retinal fibrosis were observed in either group.

Histopathology

The histological analysis of eyes after NP sub-Tenon injection showed a certain degree of distortion in the cytoarchitecture of the outer retina, with disruption of the retinal epithelium and outer segments of the photoreceptors. This phenomenon was also observed in the control group. Morphometric analysis of the retina revealed no

Table 2. Clinical safety after intravitreal injection of unloaded Gantrez AN NPs

Analysis time	Eyes	Conjunctiva	CH	Iris	Cataract	VCS	Fundus
1 day after injection	6	0.1.1.0.0.0	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	1.0.0.0.0.0	0.0.0.0.1.0	NL.NL.NL.NL.VH.NL
1 week after injection	6	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.2.1	1.1.1.1.1.1	VH.VH.NL.NL.VH.NL
3 weeks after injection	6	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	1.1.0.1.2.1	1.1.0.0.1.1	NL.NL.NL.NL.NL.NL
6 weeks after injection	6	0.0.0.0.1.1	0.0.0.0.0.0	1.1.0.0.0.0	0.0.0.1.2.1	0.1.0.1.1.1	NL.NL.NL.NL.NL.NL

Conjunctiva: grade of conjunctival hyperaemia and chemosis (0 for normal; 1 for slight; 2 for moderate, and 3 for severe). CH: grade of conjunctival haemorrhage (0 for normal or absent; 1 for slight; 2 for moderate, and 3 for severe). Iris: grade of vascular engorgement of the iris (0 for normal or absent; 1 for slight; 2 for moderate, and 3 for severe). Cataract: 0 for clear lens; 1 for

slight lens opacity with permission of clear view of fundus; 2 for moderate lens opacity, obscuring details of fundus; 3 for complete lens opacification with no view of fundus. VCS = Vitreous Clarity Score, see text. Fundus: NL = no lesions; VH = vitreous haemorrhage. Each column shows the individual score for each eye.

Table 3. Clinical safety after sub-Tenon injection of unloaded Gantrez AN NPs

Analysis time	Eyes	Conjunctiva	CH	Iris	Cataract	VCS	Fundus
1 week after injection	6	2.1.1.1.2.2	0.1.2.1.2.1	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	NL.NL.NL.NL.NL.NL
2 weeks after injection	6	2.2.2.1.2.1	0.0.1.0.0.1	1.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	NL.NL.NL.NL.NL.NL
3 weeks after injection	6	1.1.1.0.0.0	0.1.1.0.0.0	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	0.0.0.0.0.0	NL.NL.NL.NL.NL.NL

Conjunctiva: grade of conjunctival hyperaemia and chemosis (0 for normal; 1 for slight; 2 for moderate, and 3 for severe). CH: grade of conjunctival haemorrhage (0 for normal or absent; 1 for slight; 2 for moderate, and 3 for severe). Iris: grade of iris vascular engorgement (0 for normal or absent; 1 for slight; 2 for moderate, and 3 for

severe). Cataract: 0 for clear lens; 1 for slight lens opacity, enabling clear view of fundus; 2 for moderate lens opacity, obscuring details of fundus; 3 for complete lens opacification with no view of fundus. VCS = Vitreous Clarity Score, see text. Fundus: NL = no lesions. Each column shows the individual score for each eye.

significant differences between the intravitreal NP group and the control group as regards the thickness of the neural retina or outer nuclear layer, indicating no degeneration or atrophy of the retinal tissue. Figure 3a–c shows the retinal appearance 1, 2 and 3 weeks after administration of unloaded sub-Tenon NPs. The architecture of the retinal layers was preserved in 5 of the 6 sub-Tenon eyes studied 3 weeks after administration. Only 1 eye showed a focus of retinal distortion, affecting mainly the ganglion cell layer, associated with oedema of the choroid; however, this fact was also observed in 1 of the control eyes. Inflammatory signs were present in the corneoscleral layer and ciliary body during the first 2 weeks after administration, reduced to minimal degrees 3 weeks after administration.

No signs of degeneration were found in the retina 24 h, 1, 3 or 6 weeks after intravitreal injection of NPs. A focus of choroid oedema and swelling of the retinal nerve fibre layer was detected in only 1 eye 24 h after the intravitreal injection, and in this eye the ciliary body presented mild inflammatory infiltration.

Unlike the sub-Tenon group, intravitreally injected eyes reveal inflammatory cells in the vitreous cavity. These inflammatory cells are composed mainly of mono- and polynuclear cells at 24 h, and macrophages and giant multinuclear cells at 1 and 3 weeks, practically disappearing at 6 weeks (fig. 4). In only 1 case was the presence of cataract confirmed histologically.

Discussion

Memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantane hydrochloride) is a novel, low-to-moderate-affinity, non-competitive NMDA receptor antagonist of the open channel blocker type. Memantine is used in the treatment of Parkinson's disease, some types of movement disorders [19] and some dementia syndromes [20], and has recently been described as a potential treatment for glaucoma [21].

Different studies determining the presence of memantine in vitreous humour and plasma [22], and the bio-

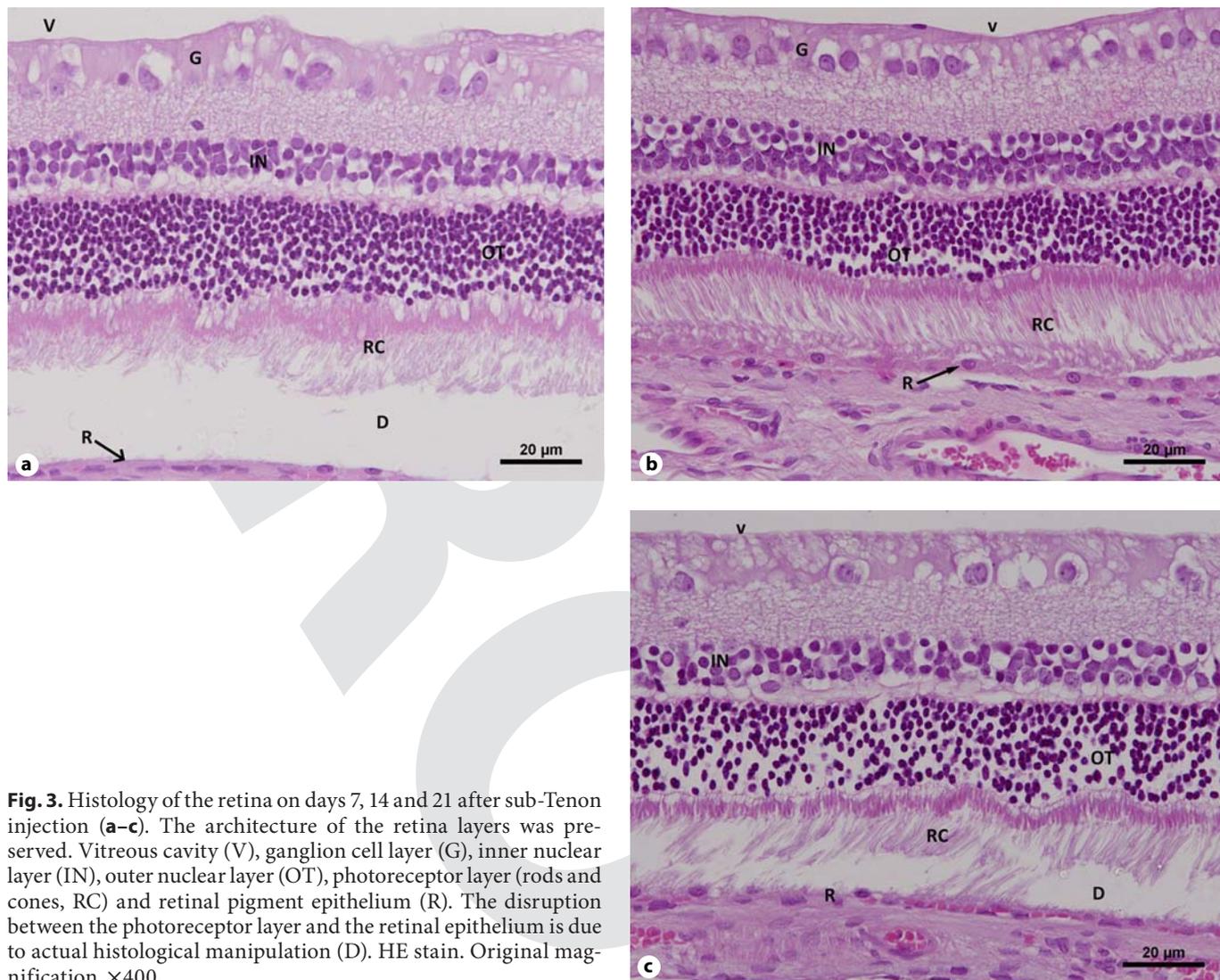


Fig. 3. Histology of the retina on days 7, 14 and 21 after sub-Tenon injection (a–c). The architecture of the retina layers was preserved. Vitreous cavity (V), ganglion cell layer (G), inner nuclear layer (IN), outer nuclear layer (OT), photoreceptor layer (rods and cones, RC) and retinal pigment epithelium (R). The disruption between the photoreceptor layer and the retinal epithelium is due to actual histological manipulation (D). HE stain. Original magnification $\times 400$.

availability of memantine after sub-Tenon and intravitreal administration are being carried out by our research group [unpubl. data].

Further experimental studies to determine the possibility of using a drug delivery system to maintain an efficient level of intravitreal memantine for a longer period of time in order to improve its use in treatment are now also being carried out by our research group. Here we can point to our initial experimental studies using Gantrez AN NPs as carriers of memantine by different ocular treatment pathways.

Memantine-loaded NPs were prepared by simple incubation of freshly prepared Gantrez AN NPs with memantine. After this incubation, the fraction of free drug

was eliminated by purification and the resulting NPs dried by lyophilization.

NPs displayed a homogeneous mean size of about 180 nm. The preparative process enabled us to yield highly homogeneous NPs as corroborated by measuring the polydispersity index (lower than 0.2–0.3) and the SEM photographs (fig. 1). Interestingly, the ζ -potential of memantine-loaded NPs was not significantly different from that observed for empty NPs. This fact can be explained by a combination of two phenomena: physical entrapment in the matrix and covalent link to the surface of NPs. In the former, at least a fraction of free memantine would be entrapped in the matrix of Gantrez AN NPs, which could be due to the swelling of the particles in

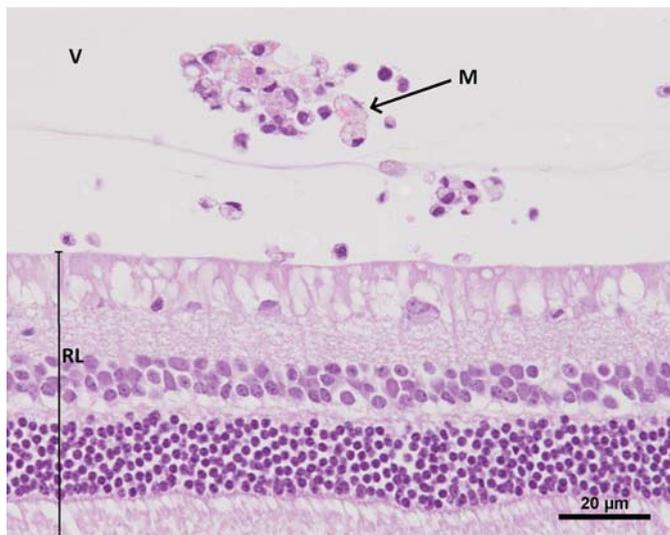


Fig. 4. Macrophages (M) in the intravitreal cavity (V) 1 week after intravitreal administration. Retinal layers were preserved (RL). HE stain. Original magnification $\times 400$.

aqueous media forming a 'sponge' structure [23]. In the latter, memantine would be bound to the surface of Gantrez AN NPs after reaction between amino groups of the drug with the anhydride residues of the polymer, as has been described previously for the coating of these NPs with albumin [24] or flagellin [25].

The *in vitro* release kinetics of memantine would be a consequence of this bimodal distribution of the drug within the NPs. In fact, *in vitro* release experiments of memantine were characterized by a very rapid burst effect of about 20%, followed by a continuous release of the drug over the course of at least 8 h.

In this study Gantrez NPs were administered by intravitreal and sub-Tenon routes, and both clinical safety and histological evaluations were carried out.

The visual inspection of the eyes' anterior segment revealed more inflammation, including conjunctival hyperaemia and chemosis in the sub-Tenon-injected eyes, probably due to greater manipulation of the periocular tissues in this route of administration. Nevertheless, signs of inflammation were mild to moderate and at the 3-week control had already disappeared. Cataract formation was observed in some eyes after intravitreal NP injection. In most cases, it was possible to observe focal lens opacity located in the lower quadrants at the posterior lens capsule. However, histological evidence of cataract, with fragmentation of cortical lens fibres and globules of denatured proteins were found in only 1 eye, suggesting that the lens opacities

observed clinically – and interpreted as cataracts – were probably artefacts caused by the formulation of masses floating in the anterior vitreous in contact with the posterior surface of the lens, producing a false image of cataract. The formation of cataracts after intravitreal injections, as described above, suggests a traumatic origin associated with the injection technique. Moreover, posterior subcapsular cataract has been suggested to be more likely associated with elevated intra-ocular pressure after intravitreal injection of certain drugs [26] than with oxidative toxic damage induced by the NPs – an effect similar to the mechanism described for steroid-induced cataract. The NPs administered intravitreally as a suspension appeared floating as whitish films and lumps in the vitreous, whereas the eyes injected with saline solution or via the sub-Tenon route appeared clear. The position of precipitates in the vitreous could be a key factor in the appearance of vitritis or local retinal damage [27]; however, in our case indirect ophthalmoscopy did not reveal any sign of retinal damage such as fibrosis, haemorrhages, infiltrates or vascular proliferation. Only 1 of the eyes receiving NPs via the sub-Tenon space developed a focus of retinal distortion, affecting the ganglion cell layer and associated with oedema of the choroids. This was also observed in a control eye injected with saline solution, suggesting mechanical damage more than a chemical insult.

The histological assessment of the different ocular tissues suggested that Gantrez NPs were well tolerated after sub-Tenon administration. The injuries observed are typical of physical trauma and tend to disappear with the passage of time. We observed a few inflammatory cells (lymphocytes) in the periocular tissue at the injection site but not in the retina or other ocular tissues. The intravitreal route could also be considered tolerable in most cases, since signs of inflammation observed in the vitreous cavity and ciliary body during the first days tend to disappear 6 weeks later without affecting the retina layers. This can be considered as a normal self-defence mechanism of the eye. The retina appeared normal with no apparent structural changes. The disruption in the outer segments of the photoreceptors observed in histopathological sections of some eyes was probably produced by histological handling itself.

Our results suggest that rabbit eyes receiving poly(anhydride) NPs intravitreally or via the sub-Tenon route did not manifest any notable structural changes. It should be kept in mind that after intravitreal injection, NPs remain floating in the vitreous, and so this may interfere with patients' visual clarity. The advantage of sub-Tenon administration is that NPs are retained at the site of injection without penetrating the vitreous [28].

References

- Weinreb RN, Khaw PT: Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 2004;363:1711–1720.
- Barkana Y, Belkin M: Neuroprotection in ophthalmology: a review. *Brain Res Bull* 2004;62:447–453.
- Levin LA, Peeples P: History of neuroprotection and rationale as a therapy for glaucoma. *Am J Manag Care* 2008;14:S11–S14.
- Hare WA, Wheeler L: Experimental glutamatergic excitotoxicity in rabbit retinal ganglion cells: block by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2940–2948.
- Hare WA, Wolde Mussie E, Lai RK, Ton H, Ruiz G, Chun T, Wheeler L: Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey. I–II. Functional measures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;2625–2651.
- Ghate D, Edelhauser H-F: Ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2006;3:275.
- Koevary SB: Trends in the noncorneal delivery of drugs into eye. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2002;77:347–349.
- Raghava S, Hammond M, Kompella U-B: Periocular routes for retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2004;1:99–114.
- Vanrell R: New trends in controlled drug delivery to posterior segment. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007;82:3–5.
- Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin J, Wilson CG: Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:2010–2032.
- Irache JM: Albumin nanoparticles for the intravitreal delivery of anticytomegaloviral drugs. *Mini Rev Med Chem* 2005;5:293–3051.
- Kohane S: Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnol Bioeng* 2007; 96:203–209.
- Irache JM, Huici M, Konecny M, Espuelas S, Campanero MA, Arbós P: Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules* 2005;10:126–145.
- Kompella UB, Bandi N, Ayalasomayajula SP: Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44: 1192–1201.
- Arbos P, Wirth M, Arango MA, Gabor F, Irache JM: Corrigendum to: Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticles conjugates. *J Control Release* 2003;83:321–330.
- Arbós P, Wirth M, Arango MA, Gabor F, Irache JM: Gantrez® AN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates. *J Control Release* 2002;83:321–330.
- Benson JR, Hare PE: *o*-Phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:619–622.
- Nuevas formulaciones de memantine encapsulada en nanoparticulas de polianhidrido; master en investigacion quimica, University of Zaragoza, Belen Puente Bayo, 2009.
- Schneider E, Fischer PA, Clemens R, Balze-reit F, Fünfgeld EW, Haase HJ: Effects of oral memantine on symptoms of Parkinson's disease. Results of a placebo-controlled multicenter study. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 109:987–990.
- Ditzler K: Efficacy and tolerability of memantine in patients with dementia syndrome. A double-blind, placebo controlled trial. *Arzneimittelforschung* 1991;41:773–780.
- Yucel YH, Gupta NG, Zhang S, Mizisin AP, Kalichman MW, Weinreb RN: Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2006;124:217–225.
- Puente B, Hernandez E, Perez S, Pablo L, Prieto E, Garcia MA, Bregante MA: Determination of memantine in plasma and vitreous humor by HPLC with precolumn derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr Sci* 2011;49:745–752.
- Gomez S, Gamazo C, San Roman B, Vauthier C, Ferrer M, Irache JM: Development of a novel vaccine delivery system based on Gantrez nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2006;6:3283–3289.
- Arbós P, Arango M.A, Campanero MA, Irache JM: Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *Int J Pharm* 2002;242:129–236.
- Salman H, Gamazo C, Campanero MA, Irache JM: Salmonella-like bioadhesive nanoparticles. *J Control Release* 2005;106: 1–13.
- Gillies MC, Kuzniarz M, Craig J, Ball M, Luo W, Simpson JM: Intravitreal triamcinolone-induced elevated intraocular pressure is associated with the development of posterior subcapsular cataract. *Ophthalmology* 2005; 112:139–143.
- Cheng L, Hostetler KY, Gardner MF, Avila CP Jr, Bergeron-Lynn G, Keefe KS, Wiley CA, Freeman WR: Intravitreal toxicology in rabbits of two preparations of 1-O-octadecyl-sn-glycerol-3-phosphonoformate, a sustained-delivery anti-CMV drug. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1487–1495.
- Amrite AC, Kompella UB: Size dependent disposition of nanoparticles and microparticles following subconjunctival administration. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:1555–1563.