

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

Diseño y evaluación de sistemas microparticulares biodegradables de agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares

Design and evaluation of biodegradable particulate systems with neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative ocular diseases

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina G. García Caballero

Directores

**Rocío Herrero Vanrell
Irene Teresa Molina Martínez
Irene Bravo Osuna**

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica

TESIS DOCTORAL

Diseño y evaluación de sistemas microparticulares biodegradables de agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares

Ph.D THESIS

Design and evaluation of biodegradable microparticulate systems with neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative ocular diseases

Cristina G. García Caballero

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS MICROPARTICULARES BIODEGRADABLES DE
AGENTES NEUROPROTECTORES PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS
NEURODEGENERATIVAS OCULARES**

**DESIGN AND EVALUATION OF BIODEGRADABLE MICROPARTICULATE SYSTEMS WITH
NEUROPROTECTIVE AGENTS FOR THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE
OCULAR DISEASES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

CRISTINA GENOVEVA GARCÍA CABALLERO

Bajo la dirección de los doctores

**ROCÍO HERRERO VANRELL
IRENE TERESA MOLINA MARTÍNEZ
IRENE BRAVO OSUNA**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR
LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
PRESENTADA POR**

Cristina Genoveva García Caballero

Bajo la dirección de las doctoras

**Rocío Herrero Vanrell
Irene Teresa Molina Martínez
Irene Bravo Osuna**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**Diseño y evaluación de sistemas microparticulares
biodegradables de agentes neuroprotectores para el
tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares**

Cristina Genoveva García Caballero

Madrid, 2017

COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID

FACULTY OF PHARMACY

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology



Ph.D. THESIS

Design and evaluation of biodegradable microparticulate systems with neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative ocular diseases

Cristina Genoveva García Caballero

Madrid, 2017

DRA. ROCÍO HERRERO VANRELL, DRA. IRENE BRAVO OSUNA Y DRA. IRENE MOLINA MARTÍNEZ, PROFESORAS TITULAR, CONTRATADO DOCTOR Y TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada

“Diseño y evaluación de sistemas microparticulares biodegradables de agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares”

“Design and evaluation of biodegradable microparticulate systems with neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative ocular diseases”

ha sido elaborada bajo su dirección por la Licenciada en Farmacia **Dña. Cristina Genoveva García Caballero** en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y, hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para así conste, expiden y firman la presente certificación en Madrid a 5 de abril de 2017.

Fdo. Rocío Herrero Vanrell

Fdo. Irene Bravo Osuna

Fdo. Irene Teresa Molina
Martínez

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Tras un largo camino de esfuerzo y sacrificio llega el momento de hacer realidad un sueño. Esta etapa llega a su fin y quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y han hecho posible esta tesis doctoral. En primer lugar quiero agradecer a las Doctoras Rocío Herrero Vanrell, Irene Teresa Molina Martínez e Irene Bravo Osuna, directoras de esta tesis, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por toda su ayuda y sabios consejos. Gracias por vuestro constante apoyo tanto profesional como personal.

Al Dr. Juan José Torrado Durán y a la Dra. Emilia Barcía Hernández, directores del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica durante los años en los que he desarrollado esta tesis doctoral, por haberme permitido la realización de la misma en el departamento. A todos los profesores que forman parte del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, gracias por vuestra calidad humana.

Debo un especial reconocimiento al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, por la concesión de la beca de Formación del Personal Investigador, gracias al cual, he podido realizar esta tesis doctoral.

Al Dr. Marius Ueffing y a la Dra. Blanca Arango, del Instituto de Oftalmología de la Universidad de Tübingen. A Michelle Dierstein por su gran apoyo técnico. De forma especial quiero expresar mi gratitud a la Dra. Blanca Arango por su gran dedicación, esfuerzo y calidad humana. Ella y todo su grupo me acogieron de una manera excepcional e hicieron más fáciles mis días en Tübingen. Muchas gracias por permitirme vivir esta experiencia tan importante para mi formación como investigadora.

Al Dr. Michael J. Young y al Dr. Petr Baranov, del Departamento de Oftalmología del Schepens Eye Research Institute de la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard, y a todo su equipo, les agradezco su inestimable

trabajo en los estudios que hemos desarrollado juntos en esta tesis. No cabe duda de que su participación ha enriquecido el trabajo realizado. En especial, quiero agradecer al Dr. Michael J. Young que me haya abierto las puertas de su grupo de investigación durante mi estancia en Boston, dándome la oportunidad de tener una visión más amplia del mundo de la investigación.

A las Doctoras Elena García Martín y Esther Prieto Calvo, del Servicio de Oftalmología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza y del instituto de investigación sanitaria de Aragón IIS y a todo su equipo, por su colaboración en los estudios de farmacocinética. Gracias por vuestro inestimable apoyo científico.

También me complace agradecer la acogida, el apoyo y los medios recibidos en los distintos departamentos donde he desarrollado parte de mis experimentos; el Departamento de Biología Molecular, el Departamento de Físico Química, el Departamento de Química Inorgánica y el Departamento de Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros y amigos del laboratorio, con los cuales he compartido poyata e incontables horas de trabajo. Por su amistad, sus consejos y por escucharme cada día. Sin vosotros este camino no hubiera sido posible. Vane, Marta, Esther, Patri, María, Miguel, Ali, gracias de corazón. En especial a mi amiga y compañera Alicia Arranz, por brindarme siempre apoyo técnico durante esta tesis doctoral.

A mis amigos, que han sabido disculpar mis ausencias y siempre han tenido una palabra de ánimo.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia, mis padres y mi hermano. Gracias por confiar en mí y por ofrecerme las mejores oportunidades del mundo. Sin vosotros nunca lo habría conseguido. Esto es también vuestro premio.

A Jorge, por ser el principal responsable de que este trabajo llegara a buen puerto, estando incondicionalmente siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, animándome siempre a continuar. Le doy las gracias por todos los esfuerzos que ha hecho, por haberme hecho creer cada día que podía hacerlo, por toda su ayuda y, principalmente, por hacerme feliz.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

A todos, mi eterno agradecimiento.

ÍNDICE

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA	21
ABREVIATURAS	25
RESUMEN-ABSTRACT	29
INTRODUCCIÓN	41
1. Anatomofisiología del ojo.....	43
1.1. Capas del globo ocular	45
1.1.1. Capa fibrosa o externa.....	46
1.1.2. Capa vascular o intermedia.....	47
1.1.3. Capa nerviosa o interna	49
1.2. Otras estructuras oculares.....	53
2. Patologías degenerativas que afectan al segmento posterior del ojo	53
2.1. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)	54
2.2. Glaucoma.....	57
2.3. Retinopatía diabética (RD).....	62
2.4. Retinosis pigmentaria (RP)	66
2.5. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL)	68
3. Vías de administración de fármacos para el tratamiento de patologías oftálmicas del segmento posterior del ojo	69
3.1. Administración tópica	71
3.2. Administración por vías que implican efecto sistémico.....	72
3.3. Administración intravítrea	72
3.4. Administración periocular	74
4. Sistemas de liberación controlada de fármacos por vía oftálmica en el segmento posterior del ojo	77
4.1. Implantes.....	78

4.2.	Liposomas	83
4.3.	Micro- y nanopartículas.....	86
5.	Neuroprotección ocular	92
5.1.	Terapia farmacológica.....	94
5.1.1.	Prevención de la excitotoxicidad inducida por glutamato ..	95
5.1.2.	Prevención de la disfunción mitocondrial.....	97
5.1.3.	Prevención de los procesos oxidativos	98
5.1.4.	Prevención de la agregación proteica.....	101
5.1.5.	Modulación de la inflamación	102
5.1.6.	Suplementación con factores neurotróficos exógenos	104
5.2.	Terapia génica.....	107
5.3.	Terapia celular	108
6.	Selección de agentes terapéuticos para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oftálmicas del segmento posterior del ojo en este trabajo experimental.....	109
6.1.	Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF)	109
6.2.	Vitamina E.....	113
6.3.	Melatonina.....	115
7.	Aspectos tecnológicos de microencapsulación de fármacos y proteínas para la administración intraocular.	117
7.1.	Métodos de microencapsulación de proteínas.....	118
7.2.	Esterilización.....	122
7.3.	Propiedades tecnológicas de micropartículas.....	123
7.3.1.	Morfología	124
7.3.2.	Tamaño de partícula.....	124
7.3.3.	Carga y eficacia de encapsulación.....	125
7.3.4.	Liberación <i>in vitro</i>	126
	HIPÓTESIS DE TRABAJO	129

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO-OBJECTIVES AND APPROACH.....	135
CAPÍTULO I-CHAPTER I	
<i>Six month delivery of GDNF from PLGA/Vitamin E biodegradable microspheres after intravitreal injection in rabbit</i>	143
1. Introduction.....	147
2. Materials and methods	150
2.1. Materials	150
2.2. Microsphere elaboration.....	150
2.3. Microsphere characterization	151
2.4. <i>In vivo</i> assays	153
3. Results.....	157
3.1. Microsphere elaboration and characterization	157
3.2. Encapsulation efficiency and <i>in vitro</i> release of GDNF	159
3.3. <i>In vivo</i> assays	160
4. Discussion.....	163
5. Conclusions	169
CAPÍTULO II-CHAPTER II	
<i>Organotypic retinal cultures as a predictive tool to evaluate short and long-term neuroprotection induced by GDNF/VitE-PLGA microspheres</i>	171
1. Introduction.....	175
2. Materials and methods	178
2.1. Materials	178
2.2. Microspheres elaboration	179
2.3. Microspheres characterization.....	180
2.4. Animals	182
2.5. Animal preparation and retina explant culture	183
2.6. TUNEL labeling assay	184

2.7. Image Analysis and Statistics	184
3. Results	185
3.1. Microsphere elaboration and characterization	185
3.2. Tunel assay	187
3.3. Cell rows counting in the INL and in the ONL	190
4. Discussion	191
5. Conclusions	194

CAPÍTULO III-CHAPTER III

***Intravitreal controlled co-delivery of GDNF and melatonin preserves photoreceptors in rhodopsin knockout mouse*..... 197**

1. Introduction	201
2. Materials and methods	204
2.1. Microspheres elaboration	204
2.2. Microspheres characterization.....	205
2.3. <i>In vitro</i> rescue of hRPC from peroxide-induced death.....	207
2.4. Animal procedures	208
2.5. Histopathological examination	209
2.6. Statistical analysis.....	209
3. Results	210
3.1. Microspheres elaboration and characterization	210
3.2. Rescue of hRPC from peroxide-induced death.....	212
3.3. Rescue of retinal structure and function in rhodopsin knockout mice	214
4. Discussion	218
5. Conclusions	223

DISCUSIÓN GENERAL 225

CONCLUSIONES-CONCLUSIONS..... 251

BIBLIOGRAFÍA 257

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

El trabajo desarrollado durante esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

Six month delivery of GDNF from PLGA/vitamin E biodegradable microspheres after intravitreal injection in rabbits. C. García-Caballero, E. Prieto-Calvo, P. Checa-Casalengua, E. García-Martín, V. Polo-Llorens, J. García-Feijoo, I.T. Molina-Martínez, I. Bravo-Osuna, R. Herrero-Vanrell. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017 Mar 1. doi: 10.1016/j.ejps.2017.02.037.

Organotypic retinal cultures as a predictive tool to evaluate short and long-term neuroprotection induced by GDNF/VitE-PLGA microspheres. C. García-Caballero, I. Bravo-Osuna, I.T. Molina-Martínez, M. Ueffing, B. Arango-González, R. Herrero-Vanrell. Enviado a *Acta Biomaterialia*.

Intravitreal controlled co-delivery of GDNF and melatonin preserves photoreceptors in rhodopsin knockout mouse. C. García-Caballero, B. Lieppman, A. Arranz-Romera, I.T. Molina-Martínez, I. Bravo-Osuna, M. Young, P. Baranov, R. Herrero-Vanrell. En proceso.

El trabajo realizado durante esta tesis doctoral ha sido presentado a los siguientes congresos:

Microspheres loaded with GDNF/melatonin to rescue photoreceptors in an animal model of retinal degeneration. R. Herrero-Vanrell, C. García-Caballero, A. Arranz-Romera, S. Esteban-Pérez, B. Lieppman, I.T. Molina-Martínez, M. Young, P. Baranov, I. Bravo-Osuna. ARVO Annual Meeting. Baltimore, Maryland, USA. 2017. (Abstract aceptado).

Multiloaded Microparticulate Drug Delivery Systems for the Treatment of Retinal Diseases. R. Herrero-Vanrell, A. Arranz-Romera, C. García-Caballero, M. Guzmán, V. Andrés-Guerrero, J. García-Feijoo, I.T. Molina-Martínez, I. Bravo-Osuna. EVER congress. Niza, Francia. 2016. (Comunicación oral).

Pharmacokinetic of GDNF from PLGA loaded microspheres after intravitreal injection in rabbits. R. Herrero-Vanrell, C. García-Caballero, E. García, L. E. Pablo, A. Arranz-Romera, V. Andrés-Guerrero, I.T. Molina-Martínez, J. García-Feijoo, V. Polo, I. Bravo-Osuna. SPLC-CRS. XI Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery. "Revolutionary Approaches in Nanomedicine Development". Granada, España. 2016. (Póster).

Bioactivity studies of biodegradable GDNF/VitE loaded microspheres in organotypic cultures of neonatal rat retina. R. Herrero-Vanrell, C. García-Caballero, B. Arango-González, I. Bravo-Osuna, M. Ueffing. ARVO Annual Meeting. Seattle, Washington, USA. 2016. (Póster).

Biodegradable microparticles for the delivery of ocular therapeutics. I. Bravo-Osuna, C. García-Caballero, E. Rodríguez-Villagra, A. Arranz-Romera, I.T. Molina-Martínez, R. Herrero-Vanrell. 12th ISOPT Clinical Congress. Berlin, Alemania. 2015. (Póster).

The expression of neurotrophic factors in the rhodopsin knockout mouse model of retinal degeneration: a time course study. C. García-Caballero, B. Lieppman, P. Baranov, R. Herrero-Vanrell, M. Young. ARVO Annual Meeting. Denver, Colorado, USA. 2015. (Póster).

Long-term delivery of GDNF from PLGA microspheres after single intravitreal injection in rabbits. R. Herrero-Vanrell, C. García-Caballero, E. García-Martín, L. Pablo-Júlvez, V. Andrés-Guerrero, I.T. Molina-Martínez, J. García-Feijoo, V. Polo-Llorens, I. Bravo-Osuna. ARVO Annual Meeting. Denver, Colorado, USA. 2015. (Póster).

Microesferas de ácido poli (láctico-co -glicólico) cargadas con un aine para administración intravítrea. I. Hernández-Martín, D. García-Herranz, C. García-Caballero, E. Rodríguez-Villagra. Tutoras: R. Herrero-Vanrell, I.T. Molina-Martínez. Jornadas Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 2015. (Póster).

Administración intraocular de microesferas biodegradables de GDNF y vitamina E para el tratamiento del glaucoma. C. García-Caballero, E. Prieto, V. Andrés-Guerrero, M. Idiopé, A. Arranz Romera, L. Gómez Coello, E. Rodríguez-Villagra, I. Molina Martínez, V. Polo, J. García Feijoo, I. Bravo-Osuna, R. Herrero-Vanrell. XII SEFIF Congress. Barcelona, España. 2015. (Póster).

Biodegradable microspheres loaded with GDNF for the treatment of glaucoma. I. Bravo-Osuna, C. García-Caballero, M.J. Young, I.T. Molina Martínez, R. Herrero-Vanrell. ANQUE-ICCE-BIOTEC Congress. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 2014. (Póster).

Microparticulate Drug Delivery Systems for the Treatment of Chronic Ophthalmic Diseases. R. Herrero-Vanrell, V. Andrés-Guerrero, E. Rodríguez-Villagra, C. García-Caballero, I.T. Molina-Martínez, I. Bravo-Osuna. 11th ISOPT Clinical Congress. Reikiavik, Islandia. 2014. (Póster).

ABREVIATURAS

A/O	Acuo-oleosa
A/O/A	Acuo-óleo-acuosa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ARPE-19	Células Adultas del Epitelio Pigmentario de la Retina (Adult human retinal pigment epithelial cells)
ATP	Adenosina Trifosfato
BCA	Ácido bicinónico
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor)
BHR	Barrera hematoretiniana
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine serum albumin)
BSS	Solución salina balanceada (balanced salt solution)
CGR	Células ganglionares de la retina
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMV	Citomegalovirus
CNTF	Factor Neurotrófico Derivado del nervio Ciliar (Ciliary Neurotrophic Factor)
CNV	Neovascularización coroidea
Cop-1	Copolímero 1
CoQ₁₀	Coenzima Q10
CPR	Células progenitoras de la retina
DHPE	Dihexadecanoil-glicerofosfoetanolamina
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EMA	Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency)
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electroretinograma/electroretinografía
EVA	Acetato de etilvinilo

FDA	U.S. Food and Drug Administration
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico (Fibroblast growth factor)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)
FR	Fotorreceptor/es
GAA	Glaucoma de ángulo abierto
GAC	Glaucoma de ángulo cerrado
GCP	Glaucoma congénito primario
GDNF	Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor)
GNT	Glaucoma de tensión normal
hCPR	Células progenitoras de la retina humana
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution)
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos (Hepatocyte growth factor)
HIF-1α	Factor Inducible por Hipoxia-1 alfa (Hypoxia-inducible factor)
HSA	Álbumina sérica humana (Human serum albumin)
HSP	Proteína de choque térmico (heat shock protein)
IAC	Inhibidores de anhidrasa carbónica
INL	Capa nuclear interna (inner nuclear layer)
JAK-STAT	Janus kinases, signal transducers and activators of transcription
KDa	Kilodaltons
mmHg	Milímetros de mercurio
MMP2	Metaloproteinasa 2
MP/MPs	Micropartícula/s
MS/MSs	Microesfera/s
NGF	Factor de crecimiento neural (nerve growth factor)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nitroso
NOHL	Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber
NRA	Necrosis Retinal Aguda
NT	Neurotrofinas
O/A	Óleo-acuosa
ONL	Capa nuclear externa (outer nuclear layer)
O/O	Óleo-oleosa

PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
PGA	Ácido poli (glicólico) (Poly Glycolic Acid)
PIO	Presión intraocular
PLA	Ácido poli (láctico) (Poly Lactic Acid)
PLGA	Ácido poli (láctico-co-glicólico) (Poly Lactic-co-Glycolic Acid)
PPO	Presión de perfusión ocular
PVA	Alcohol polivinílico
PVR	Vitreorretinopatía proliferativa
RD	Retinopatía diabética
RDNP	Retinopatía diabética no proliferativa
RDP	Retinopatía diabética proliferativa
RET	Receptor tirosina kinasa
RMG	Células gliales retinales de Müller (Retinal Müller glial cells)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (radical oxygen species)
RP	Retinosis pigmentaria
TGF	Factor de crecimiento transformante (Transforming growth factor)
THC	Tetrahidrocannabinol
TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumoral necrosis factor)
TRITC	Tetrametilrodamina (Tetramethylrhodamine)
TRK	Tirosina kinasa (Tyrosine kinase)
TUDCA	Ácido Tauroursodesoxicólico (Tauroursodeoxycholic acid)
TUNEL	(TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling)
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial (Vascular endothelial growth factor)
ViE	Vitamina E

RESUMEN

ABSTRACT

RESUMEN**Diseño y evaluación de sistemas microparticulares biodegradables de agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares.**

Las enfermedades neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo se caracterizan por ser devastadoras. En su mayoría son crónicas y pueden cursar con un daño progresivo del nervio óptico y la pérdida de células ganglionares de la retina (CGR), fotorreceptores y otras células de la retina ocasionando la pérdida de visión. Una de las estrategias terapéuticas encaminadas al tratamiento de estas patologías es la neuroprotección, que se centra en prevenir, limitar, y en algunos casos revertir, la degeneración o muerte de las células neuronales. En el caso de la neuroprotección ocular, una aproximación terapéutica consiste en la administración de factores neurotróficos exógenos encargados de modular el crecimiento, la diferenciación, la reparación y la supervivencia de las neuronas gracias a su unión a receptores específicos. Estos factores engloban una amplia variedad de sustancias entre las cuales cabe destacar el Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF), cuyo efecto neuroprotector ha sido demostrado en diversas patologías oculares. También existen otras moléculas terapéuticas que ejercen efecto neuroprotector a nivel ocular mediante mecanismos de acción diferentes a los factores neurotróficos. Un ejemplo son los antioxidantes que se destinan a paliar el daño oxidativo que acompaña a las patologías retinianas. En este sentido, la melatonina juega un papel importante ya que presenta un potente carácter antioxidante, atenuando el daño celular causado por los radicales libres tanto en las CGR como en los fotorreceptores. En esta misma línea, la administración de vitaminas antioxidantes se plantea de igual modo como una alternativa terapéutica encaminada a contrarrestar el daño oxidativo. Concretamente, la vitamina E (VitE) ha demostrado actividad en diferentes enfermedades de la retina en las que se produce, entre otros, estrés oxidativo. No obstante, debido a que este

tipo de patologías son multifactoriales, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas se centra en el tratamiento combinado, empleando para ello diversas sustancias activas de acuerdo a los requerimientos terapéuticos del paciente.

El tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo, requiere concentraciones eficaces de la sustancia activa en el tejido diana. Para ello, el agente terapéutico deberá alcanzar su lugar de acción teniendo que atravesar en determinados casos las distintas barreras biológicas. Por esta razón, se hace necesario el empleo de vías de administración directas como la intravítrea, que posibilitan el depósito de la sustancia activa en el lugar de acción. Sin embargo, esta vía no está exenta de problemas debido a los riesgos inherentes al empleo de inyecciones intravítreas repetidas. Por ello se hace necesario el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada. Por ello las terapias basadas en el empleo de sistemas de cesión controlada resultan de gran interés ya que la molécula activa se libera durante un periodo de tiempo determinado. En este sentido, los sistemas microparticulares biodegradables de liberación controlada se desarrollan con el fin de proporcionar concentraciones terapéuticas del agente activo en su lugar de acción durante largos periodos de tiempo. Tras la administración a través una inyección, las micropartículas quedan retenidas cerca del lugar de administración, donde liberan progresivamente la sustancia contenida en su interior. Además, desaparecen del lugar de acción una vez ejercido el efecto. Dado el notable interés que despiertan los microsistemas de liberación controlada en el tratamiento de patologías degenerativas del segmento posterior del ojo, las micropartículas han sido los dispositivos seleccionados para el desarrollo de la presente tesis doctoral.

El objetivo global del presente trabajo de investigación se ha centrado en el diseño y caracterización de microesferas de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) –un polímero biocompatible y biodegradable– para su utilización como sistema intraocular de liberación controlada para la administración del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y otras sustancias activas y/o coadyuvantes destinadas a la terapia neuroprotectiva

ocular, y más específicamente, como una nueva aproximación terapéutica para el tratamiento de patologías en las que se produce una degeneración del nervio óptico y de la retina.

El desarrollo de sistemas microparticulares de PLGA mediante la técnica de la extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A, ha permitido la liberación de pequeñas cantidades del agente neuroprotector GDNF (del orden de picogramos) durante un largo periodo de tiempo. No obstante, no existen estudios que se hayan centrado en el estudio farmacocinético de GDNF liberado a partir de este tipo de sistemas. Por esta razón, se propuso como primer objetivo de esta tesis doctoral la evaluación de los niveles en vítreo del factor neurotrófico GDNF tras la administración intravítrea de microesferas de GDNF/VitE en animales de experimentación (conejos) durante 6 meses mediante un estudio farmacocinético. Los resultados fueron evaluados mediante un análisis no compartimental, y mostraron concentraciones de GDNF superiores a los niveles basales durante 6 meses después de la administración.

La evaluación de la eficacia y seguridad de nuevas sustancias activas para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oftálmicas del segmento posterior del ojo requiere el impulso de métodos alternativos que permitan un estudio precoz de estos parámetros antes de poner en marcha ensayos *in vivo*. Además estas herramientas resultarían de gran interés para la evaluación de la tolerancia de los biomateriales empleados en el diseño de nuevas formulaciones. En este contexto, el uso de herramientas basadas en cultivos organotípicos permitiría la evaluación de la eficacia y/o toxicidad en la retina tanto de agentes terapéuticos microencapsulados (GDNF) como de las microesferas antes de la realización de los estudios *in vivo*. Por todo ello, como segundo objetivo de esta tesis doctoral se ha planteado la utilización de cultivos organotípicos como herramienta para la evaluación tanto de la tolerancia como de la actividad neuroprotectora a corto (7 días) y largo plazo (20 días) de microesferas elaboradas con PLGA y cargadas con GDNF y distintas cantidades de vitamina E. Las microesferas fueron preparadas

siguiendo la técnica anteriormente desarrollada por el grupo de investigación y que se basa en la formación de una emulsión S/O/A y posterior extracción-evaporación. En este método se incorpora GDNF al estado sólido y distintas cantidades de vitamina E en la fase interna de la emulsión. Los resultados obtenidos demostraron que desde el punto de vista tecnológico, distintas cantidades de vitamina E influyeron en el porcentaje de encapsulación del GDNF, resultando más elevado cuando se emplea una menor cantidad de VitE. Además el perfil de cesión también se vio afectado ya que la liberación inicial (24h) en los ensayos *in vitro* fue superior para las microesferas elaboradas con una mayor cantidad de VitE. Posteriormente, en los estudios de eficacia y tolerancia realizados en los cultivos organotípicos de retina de rata se demostró que las MSs cargadas con GDNF y diferentes cantidades de VitE fueron capaces de proteger los fotorreceptores de la retina (capa nuclear externa, ONL) tras una semana de contacto en comparación con los grupos control (no tratado, tratado con microesferas de PLGA sin GDNF ni VitE y tratados con MSs de PLGA y distintas cantidades de VitE). Estos resultados se confirmaron a largo plazo (20 días de exposición) con un mayor número de filas de células viables en la ONL. Como punto interesante, en este trabajo se puso de manifiesto el efecto beneficioso de la VitE, ya que la formulación preparada con GDNF y PLGA conteniendo una mayor cantidad de VitE presentó una menor tendencia a la apoptosis en las capas de fotorreceptores expuestas durante 20 días al tratamiento. Esta plataforma *ex vivo* permitió también descartar una posible toxicidad relacionada con el dispositivo empleado (microesferas de PLGA) ya que las formulaciones resultaron bien toleradas durante el tiempo de estudio.

Tal y como se ha comentado previamente, al tratarse de patologías que presentan una etiología multifactorial, podría resultar especialmente interesante el tratamiento combinado con distintos agentes terapéuticos y/o coadyuvantes que actúen sobre los diversos mecanismos implicados en la patogénesis. Así, el tercer objetivo propuesto en esta tesis doctoral consistió en la evaluación del potencial terapéutico del GDNF en combinación con vitamina E y de la combinación de GDNF/melatonina con vitamina E en

microesferas de PLGA en la supervivencia de células fotorreceptoras en un modelo animal de degeneración de fotorreceptores (rho-/-). Las formulaciones administradas en este modelo animal liberaron de forma controlada GDNF y GDNF/melatonina. Este estudio mostró, que la administración intravítrea de MSs de GDNF/VitE y de la combinación GDNF/VitE/melatonina es capaz de producir el rescate parcial a nivel funcional y estructural de los fotorreceptores. Por lo tanto, se pudo concluir que el uso de estos sistemas permite la co-administración eficaz de varios agentes terapéuticos para el tratamiento de estas enfermedades.

ABSTRACT**Design and evaluation of biodegradable microparticulate systems with neuroprotective agents for the treatment of neurodegenerative ocular diseases.**

Neurodegenerative diseases that affect the posterior segment of the eye are characterised by being devastating in nature. The majority of them are chronic and they may involve gradual damage to the optic nerve and loss of retinal ganglion cells (RGCs), photoreceptors and other cells in the retina, thereby causing loss of vision. One therapeutic strategy intended to treat these diseases is neuroprotection, which focuses on preventing, limiting and in some cases reversing the degeneration and death of neuronal cells. In the case of ocular neuroprotection, one therapeutic approach consists of administering exogenous neurotrophic factors responsible for modulating the growth, differentiation, repair and survival of neurons through their binding to specific receptors. These factors encompass a wide variety of substances including glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), whose neuroprotective effect has been demonstrated in various eye diseases. Other therapeutic molecules also exert a neuroprotective effect on the eye through different mechanisms of action than neurotrophic factors. One example is antioxidants intended to palliate the oxidative damage that accompanies retinal diseases. In this regard, melatonin plays a significant role since it has strong antioxidant properties whereby it attenuates the cell damage caused by free radicals in both RGCs and photoreceptors. Likewise, the administration of antioxidant vitamins has been proposed as a therapeutic alternative intended to counteract oxidative damage. Specifically, vitamin E (VitE) has demonstrated activity in different diseases of the retina with oxidative stress, among other features. However, as this type of disease is multifactorial, the search for new therapeutic strategies is focused on combination treatment, for which various active substances are used depending on the patient's therapeutic requirements.

The treatment of diseases that affect the posterior segment of the eye requires effective concentrations of the active substance in the target tissue. To achieve this, the therapeutic agent must reach its site of action. To do this, it must cross different biological barriers in certain cases. This requires the use of direct routes of administration such as intravitreal that enable the active substance to be deposited in the site of action. However, this route is not problem-free due to the risks inherent to the use of repeated intravitreal injections. This means that new systems for controlled release must be designed and developed. Therefore, therapies based on the use of systems for controlled release are of great interest since the active substance is released for a certain period of time. In this regard, biodegradable microparticle systems for controlled release are being developed in order to provide therapeutic concentrations of the active substance in its site of action for long periods of time. Following administration through an injection, microparticles are retained close to the site of administration, where they gradually release the substance inside of them. They disappear from their site of action once they have exerted their effect. Given the remarkable interest aroused by microsystems for controlled release in the treatment of degenerative diseases of the posterior segment of the eye, microparticles were selected as the subject of this doctoral thesis.

The overall objective of this research study is focused on the design and characterisation of microspheres (MSs) of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) — a biocompatible and biodegradable polymer — for use as an intraocular system drug delivery system (IODDS) to administer glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and other active substances and/or adjuvants intended for ocular neuroprotection therapy and, more specifically, as a new therapeutic approach to the treatment of diseases featuring degeneration of the optic nerve and retina.

The development of PLGA microparticle systems by using a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion solvent evaporation technique has enabled the release of small quantities of the neuroprotective agent GDNF (in the order of

picograms) over a long period of time. However, no studies have focused on the pharmacokinetic study of GDNF released from this type of system. Thus, the primary objective of this doctoral thesis was to evaluate vitreous levels of the neurotrophic factor GDNF following intravitreal administration of microspheres of GDNF/VitE in experimental animals (rabbits) over 6 months through a pharmacokinetic study. The results were evaluated by means of a non-compartmental analysis, and showed GDNF concentrations higher than baseline levels for 6 months after administration.

The evaluation of the efficacy and safety of new active substances for the treatment of ophthalmic neurodegenerative diseases of the posterior segment of the eye requires the promotion of alternative methods that enable these parameters to be studied early before *in vivo* assays are started. These tools would also be of great interest to evaluate tolerance of biomaterials used in the design of new formulations. In this context, the use of tools based on organotypic cultures would enable the efficacy and/or toxicity in the retina of both microencapsulated therapeutic agents (GDNF) and microspheres to be evaluated before *in vivo* studies are conducted. Hence, the secondary objective of this doctoral thesis was to use organotypic cultures as a tool to evaluate both tolerance and neuroprotective activity, both in the short term (7 days) and the long term (20 days), of microspheres prepared with PLGA and loaded with GDNF and different quantities of vitamin E. The microspheres were prepared according to the technique previously developed by the research group based on formation of an S/O/W emulsion and subsequent extraction–evaporation. This method included GDNF in a solid state and different quantities of vitamin E in the internal phase of the emulsion. The results obtained demonstrated that, from a technological point of view, different quantities of VitE influenced the percentage of encapsulation of GDNF and this percentage was higher when a smaller quantity of VitE was used. The release profile was also affected since initial release (24 h) in *in vitro* assays was higher for microspheres prepared with a larger quantity of VitE. Subsequently, efficacy and tolerance studies conducted on organotypic cultures of rat retina demonstrated that MSs loaded with GDNF and different quantities of VitE were

capable of protecting the photoreceptors of the retina (outer nuclear layer [ONL]) following a week of contact compared to control groups. These results were confirmed in the long term (20 days of exposure) with a larger number of viable cell lines in the ONL. As a point of interest, this study revealed the beneficial effect of VitE, since the formulation prepared with GDNF and PLGA containing a larger quantity of VitE had a lower tendency to apoptosis in layers of photoreceptors exposed to the treatment for 20 days. This *ex vivo* platform also ruled out a potential toxicity linked to the device used (PLGA microspheres) since the formulations were well tolerated during the study period.

As mentioned above, since these diseases have a multifactorial etiology, combination therapy with different active substances and/or adjuvant agents that act on the various mechanisms involved in pathogenesis could be particularly interesting. Thus, the tertiary objective of this doctoral thesis consisted of evaluating the therapeutic potential of the GDNF and Vitamin E combination and the GDNF/melatonin combination with vitamin E in PLGA microspheres for the survival of photoreceptor cells in an animal model of photoreceptor degeneration (Rho $-/-$). The formulations administered in this animal model released GDNF and GDNF/melatonin in a controlled manner. This study showed that intravitreal administration of GDNF/VitE MSs and GDNF/VitE/melatonin MSs led to partial protection of photoreceptors on a functional and structural level. Therefore, it was concluded that the use of these systems enables effective co-administration of multiple therapeutic agents for the treatment of these diseases.

INTRODUCCIÓN

1. Anatomofisiología del ojo

El ojo, localizado en la cavidad orbitaria, es el órgano de la visión. Es una estructura esférica de aproximadamente 2,5 cm de diámetro con un marcado abombamiento sobre su superficie anterior. Está formado por dos hemisferios de diámetro diferente, que reciben la denominación de segmento anterior y segmento posterior. El segmento anterior representa un sexto del globo ocular y está relleno de humor acuoso. Presenta dos zonas diferenciadas, la cámara anterior, comprendida entre la córnea y el iris y la cámara posterior entre el iris y el cristalino. El segmento posterior o cámara vítrea es la zona comprendida entre el cristalino y la retina y está relleno de un gel transparente y avascular que recibe el nombre de humor vítreo (Figura 1) (Putz, Sobotta et al. 2008, Davson 2012).

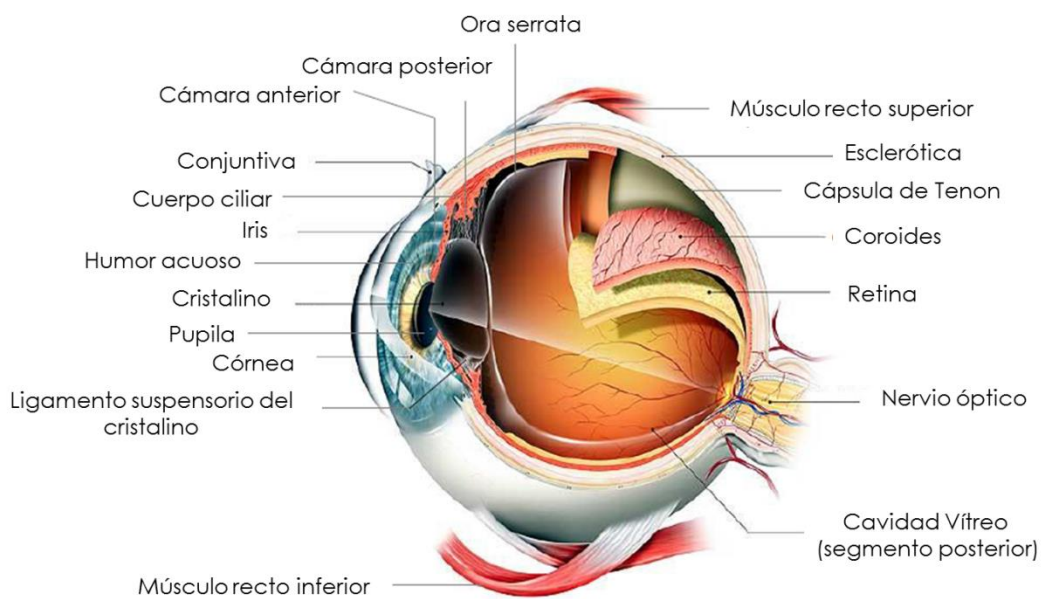


Figura 1. Estructura del globo ocular. Ilustración adaptada de [<http://healthyeyesight2020.com>].

Entre los anejos del globo ocular se encuentran los párpados, la conjuntiva, el aparato lagrimal y la órbita ósea (Figura 2).

Los párpados, superior e inferior, son dos repliegues muy modificados de la piel, que cierran las órbitas, dan protección física a los globos oculares y contribuyen a la lubricación de la superficie ocular. Cada párpado presenta dos caras, anterior y posterior, y dos bordes, libre y adherente. Entre ambos párpados está la hendidura palpebral. En el borde libre de los párpados encontramos las pestañas; anexas a ellas hay glándulas sebáceas.

La conjuntiva es una mucosa delgada y transparente que recubre la parte anterior de la esclera hasta el limbo y la parte posterior hasta los párpados.

El aparato lagrimal está formado por la glándula lagrimal en el ángulo superoexterno de la órbita que es donde se secretan las lágrimas y por el aparato de drenaje. Se encarga de la producción de lágrimas para mantener la humedad en la córnea y en la conjuntiva.

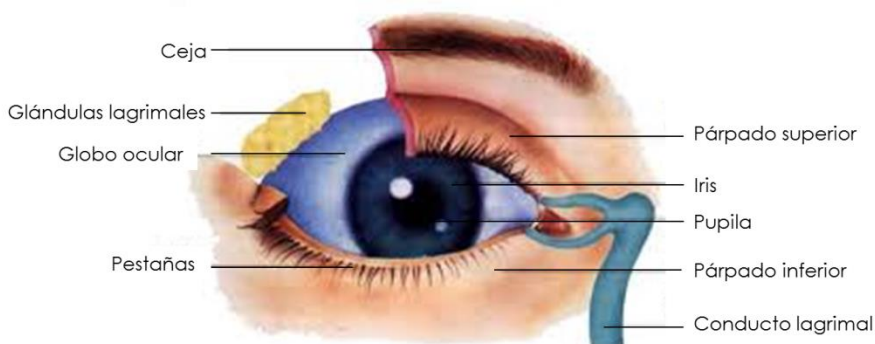


Figura 2. Anejos del globo ocular. Ilustración adaptada de [<http://lalupa3.webcindario.com/>].

Por su parte, la movilidad de los ojos se encuentra controlada por los músculos extraoculares que están insertados sobre el globo ocular a través de la esclera y se contraen o relajan en coordinación con los músculos del ojo opuesto. El ojo está formado por cuatro músculos rectos: superior, inferior, medio y lateral y dos músculos oblicuos: superior e inferior (Figura 3). Cinco de

los músculos tienen su origen en el vértice de la órbita y sólo el oblicuo inferior se origina en el ángulo inferior e interno de la misma. Los cuatro músculos rectos alcanzan el globo insertándose en él desde atrás hacia delante, por lo que al contraerse desplazan al globo en la dirección que indica su nombre. Los músculos oblicuos por el contrario, lo alcanzan de delante hacia atrás, desplazándolo al contraerse en sentido contrario a su nombre. Por otro lado, la órbita ósea tiene cuatro paredes, un reborde y un vértice, donde se ubica el canal óptico; en ella además distinguimos las fisuras orbitarias.

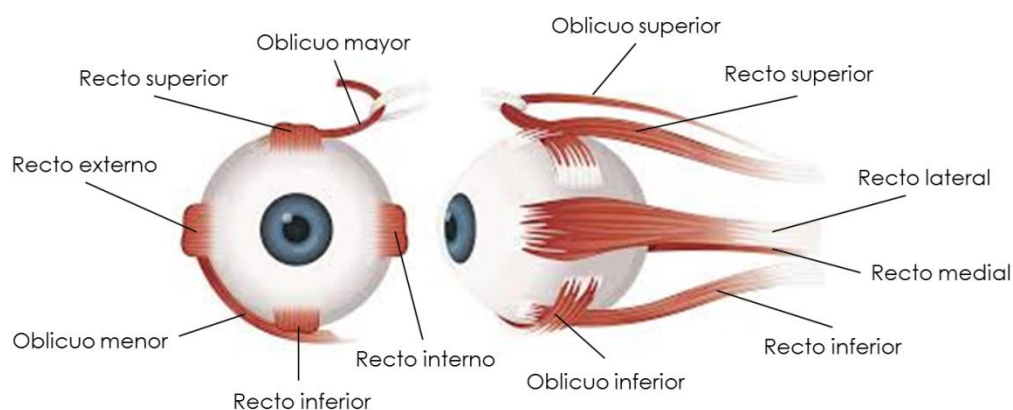


Figura 3. Músculos extraoculares. Ilustración adaptada de [<http://metodobates.net/>].

1.1. Capas del globo ocular

El ojo está formado por tres capas concéntricas y por los elementos contenidos en su interior (Figura 1) (Malhotra, Minja et al. 2011). De fuera a dentro, estas tres capas son:

1.-La capa fibrosa o externa es la capa más resistente y está constituida por la córnea y la esclerótica o esclera.

2.-La úvea o túnica vascular es la capa intermedia, que está compuesta por:

-la coroides, muy vascularizada, reviste las tres quintas partes posteriores del globo ocular.

-el cuerpo ciliar, formado por los procesos ciliares.

-el iris.

3.-La capa nerviosa o interna, también llamada retina es la capa neurosensorial encargada de recibir los estímulos luminosos y llevarlos a través del nervio óptico para ser traducidos en imágenes en el cerebro.

A continuación se describe cada una de estas capas con mayor detalle.

1.1.1. Capa fibrosa o externa

La capa fibrosa del globo ocular está constituida por fibras de colágeno que le confieren gran resistencia y le permiten cumplir con la función de contener y proteger los delicados tejidos intraoculares que participan en el proceso de la recepción visual. La forma esférica del ojo es mantenida con ayuda de la presión intraocular producida por los líquidos que llenan el interior del mismo. La esclerótica de mayor radio corresponde al segmento posterior del ojo y la córnea, de menor radio, corresponde al segmento anterior del ojo. La unión entre esclera y córnea se denomina limbo esclerocorneal (Figura 1)(Edelhauser and Ubels 2003).

La esclerótica o esclera es una membrana firme de color blanco. Está compuesta fundamentalmente por colágeno, lo que le confiere una extraordinaria resistencia y le da el color. Presenta una superficie externa (epiesclera) que sirve como punto de inserción de los músculos extraoculares y un estroma corneal constituido por tejido conectivo fibroelástico. El espacio epiescleral separa la esclera de la cara interna de la cápsula de Tenon. En la parte posterior, sufre modificaciones en su estructura apareciendo una zona porosa denominada lámina cribosa. Esta malla colágena es atravesada por las fibras nerviosas de la retina que formarán el nervio óptico. En la zona central se encuentra un orificio de mayor tamaño que permite el paso de la arteria y venas centrales de la retina.

La córnea es una estructura transparente de aproximadamente 12 mm de diámetro que ocupa la porción anterior del globo ocular y que se encuentra cubierta por la película precorneal. La transparencia que presenta se debe a su avascularidad, al ordenamiento de los haces de fibras colágenas y al estado de deshidratación del estroma. Se encuentra en contacto con el medio ambiente y está únicamente protegida por los párpados cuando ocluyen la hendidura palpebral. Está compuesta de 5 capas que de afuera a dentro son: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. La córnea es extraordinariamente sensible debido a la presencia de numerosas terminaciones sensitivas de la rama oftálmica del trigémino y la mayor parte de la refracción de los rayos luminosos que penetran en el ojo se debe a ella.

1.1.2. Capa vascular o intermedia

La úvea o túnica vascular es la capa intermedia del globo ocular y está constituida por tres zonas anatómicamente diferentes: el iris, la coroides y el cuerpo ciliar (Figura 1) (Smerdon 2000).

El iris es un verdadero diafragma con un orificio central (la pupila) encargado de regular la cantidad de luz que penetra en el ojo. El diámetro es modificado por acción de dos músculos, el músculo esfínter pupilar que está inervado por el sistema parasimpático y produce miosis (disminución del diámetro pupilar) y el músculo radial que está inervado por el sistema simpático y produce midriasis (dilatación pupilar). El iris divide el segmento anterior del ojo en las cámaras anterior y posterior y está bañado en el humor acuoso. La superficie posterior del iris se encuentra recubierta por el epitelio pigmentario del iris que impide el paso de la luz, excepto en el área pupilar. La superficie anterior se encuentra revestida por una red de fibroblastos iridianos mezclada con una cantidad variable de melanocitos cuya presencia determina la coloración del iris. Tiene una gama cromática que se extiende desde el azul claro al marrón oscuro.

La coroides es una capa vascular. Su límite externo es la esclera y el interno el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Entre la capa interna de la coroides (coriocapilar) y la retina se encuentra la membrana de Bruch que separa ambas estructuras. Esta lámina forma parte de la barrera hematorretiniana, formada por las uniones estrechas tanto del EPR como del endotelio de los capilares retinianos. La coroides aporta nutrición a las capas más externas de la retina y además tiene como función absorber los rayos luminosos que no son absorbidos por la misma.

El cuerpo ciliar, un tejido delgado y vascular que rodea al cristalino, está situado entre el iris y la ora serrata. Está formado por dos zonas diferenciadas: la pars plicata que contiene el músculo ciliar y los procesos ciliares y la pars plana. El músculo ciliar está formado por fibras musculares lisas y es responsable de la acomodación. En los procesos ciliares se insertan las fibras de tejido conectivo del ligamento suspensorio (o zónula de Zinn) que se encargan de sostener al cristalino. Los procesos ciliares son de carácter vascular y son los responsables de la producción de humor acuoso, cuya función es la de aportar nutrientes a las estructuras avasculares del ojo y contribuir al mantenimiento de la presión intraocular. El 99% de la composición de este fluido es agua. La producción de humor acuoso tiene lugar mediante mecanismos de secreción activa (80% del total) y por mecanismos de secreción pasiva como ultrafiltración y difusión (Cole 1977). Estos procesos pasivos dependen de factores tales como la presión sanguínea, la presión osmótica plasmática y la presión intraocular. El humor acuoso rellena la cámara posterior y pasa a la cámara anterior a través de la pupila. El drenaje es producido a través de tres vías distintas. La vía trabecular supone un 80% del drenaje. Mediante esta vía, el humor acuoso llega al canal de Schlemm donde atraviesa los conductos eferentes para alcanzar el sistema venoso. La vía úveoescleral (20% restante) permite el flujo desde el cuerpo ciliar hacia el espacio supracoroideo. Finalmente, un pequeño volumen de humor acuoso drena directamente por el iris.

1.1.3. Capa nerviosa o interna

La retina o capa nerviosa es el estrato sensorial neural del globo ocular. Es una zona delgada y parcialmente transparente que se encuentra en la parte posterior interna del ojo y que está en contacto con la cara interna de la coroides y con el humor vítreo (Figura 1). A su vez, la retina se estructura en diez capas, tal y como se muestra en la Figura 4:

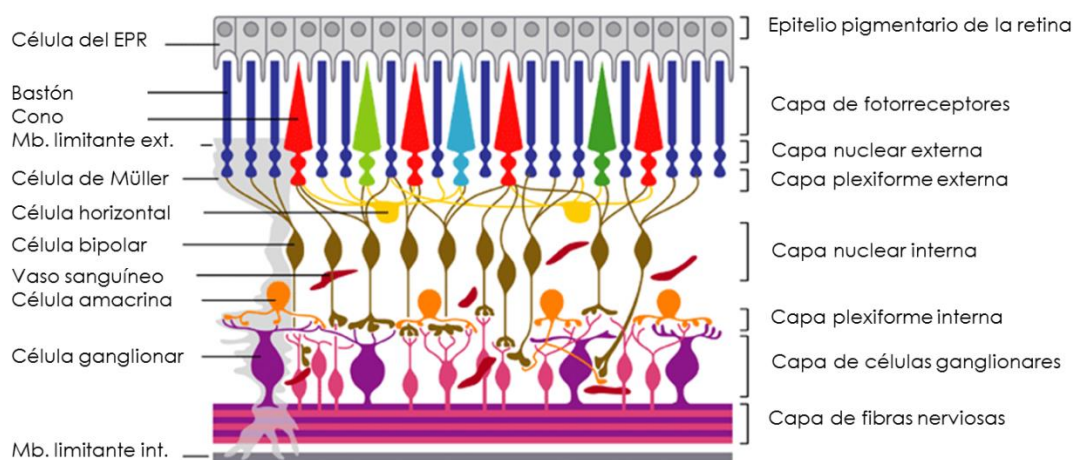


Figura 4. Organización celular de la retina. Ilustración adaptada de "Diabetes and retinal vascular disorders: role of the renin-angiotensin system" (Wilkinson-Berka 2004).

Estas capas son:

- Capa de epitelio pigmentario de la retina
- Capa de células fotorreceptoras (conos y bastones)
- Membrana limitante externa: Forma una barrera entre la neurorretina y el complejo fisiológico formado por el EPR y los segmentos externo e interno de los fotorreceptores. Está formada por las uniones de las células de Müller con el sector interno de los conos y bastones.
- Capa nuclear externa: Está formada por los núcleos celulares de los conos y los bastones.
- Capa plexiforme externa: Es la región de conexión sináptica entre células fotorreceptoras y las células bipolares (interneuronas).

-Capa nuclear interna: Está formada por los núcleos celulares de las células bipolares, las células horizontales y las células amacrinas.

-Capa plexiforme interna: Es la región de conexión sináptica entre células bipolares, amacrinas y ganglionares.

-Capa de células ganglionares: Está formada por los núcleos de las células ganglionares.

-Capa de fibras nerviosas: Está formada por los axones de células ganglionares que forman el nervio óptico.

-Membrana limitante interna: Es una lámina basal situada a nivel de la superficie de contacto entre la retina y el humor vítreo y sirve como barrera entre ambos. Está formada por las partes internas de las células de Müller y de los astrocitos.

Desde el punto de vista funcional la retina se organiza en dos regiones básicas: la capa externa o epitelio pigmentario de la retina y la capa interna o capa neural de la retina.

El epitelio pigmentario de la retina es una monocapa de células pigmentadas adherida a la membrana de Bruch. El EPR y la membrana de Bruch forman la barrera hematorretiniana externa localizada entre la coroides y el segmento externo de los fotorreceptores (Bok 1993, Strauss 2005). Entre sus principales funciones destacan las siguientes:

- Absorción de la luz que atraviesa la capa neural y protección contra la fotooxidación.

- Transporte de agua, iones y nutrientes.

- Fagocitosis y degradación de los discos membranosos de los segmentos externos de los fotorreceptores.

- Secreción de varios factores de crecimiento esenciales para la integridad estructural de la retina.

- Aislamiento de las células de la retina de las sustancias transportadas por la sangre como componente de la barrera hemato retiniana.

- Estabilización de la concentración de iones en el espacio subretiniano para el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores.

La capa neural de la retina, está formada por varios grupos funcionales de neuronas:

- Fotorreceptores (Figura 5) (Batschauer 2003): Este grupo de células está formado por los conos y los bastones que se encuentran situados a continuación del EPR, hacia donde proyectan sus segmentos externos. La fovea es la zona de mayor densidad de fotorreceptores y se encuentra en la parte central de la retina. A medida que nos alejamos hacia la periferia su número disminuye. Los bastones están distribuidos en la retina periférica y son los responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad. El pigmento fotosensible de estas células se denomina rodopsina y transmite la luz en las regiones roja y azul del espectro, al tiempo que absorbe la energía luminosa en la región verde. Los conos se concentran en la parte central de la retina denominada mácula. Tienen una sensibilidad frente a la luz menor que los bastones, pero proporcionan la visión del color y facilitan una mayor agudeza visual. Los conos poseen tres tipos de pigmento visual sensible a la luz azul (435 nm), verde (535nm) y roja (565 nm). Estos tres pigmentos, respectivamente, cyanolabe, clorolabe y erytrolabe forman la base para la discriminación del color.

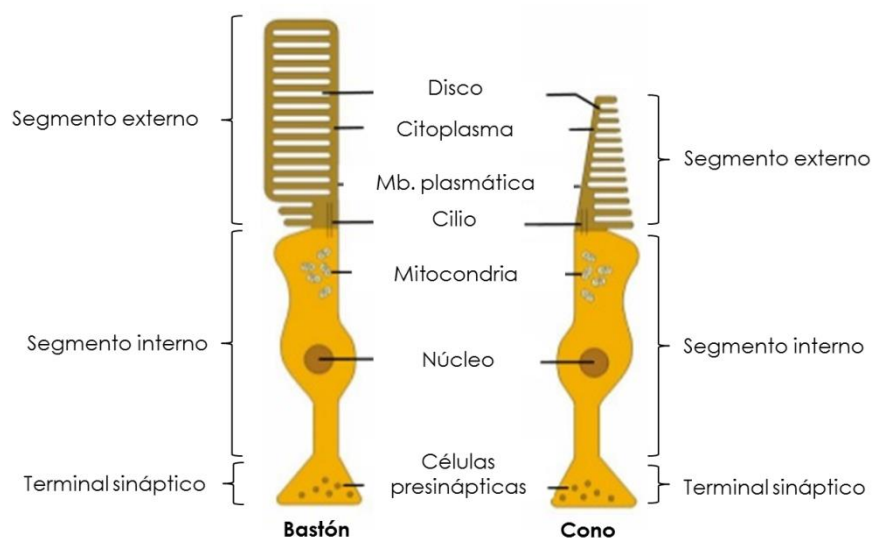


Figura 5. Estructura de las células fotorreceptoras: conos y bastones. Ilustración adaptada de [<http://www.gafasyvision.com/retina>].

-Neuronas de conducción directa: Son las células bipolares y ganglionares, responsables de la transmisión del impulso nervioso hasta el cerebro.

-Neuronas de asociación: Dentro de este grupo se distinguen las células horizontales y las células amacrinas. Son interneuronas que actúan en el proceso de transmisión del impulso nervioso y establecen conexiones entre las células bipolares y ganglionares.

-Células de Müller y astrocitos: En general sirven de apoyo y sostén al conjunto. Sin embargo, recientemente se han descrito muchas más funciones de las células de Müller. Son el tipo principal de células gliales de la retina y se encargan del mantenimiento de la homeostasis y del soporte metabólico de las neuronas de la retina. Además, controlan la composición del fluido del espacio extracelular a través de mecanismos de transporte. Las células de Müller dan soporte trófico y anti-oxidativo a los fotorreceptores y a las neuronas, además de contribuir a la regulación del grosor de la barrera hematorretiniana. Se encuentran también involucradas en la regulación de la actividad sináptica de la capa interna de la retina debido a la captación de glutamato. Dado que las células de Müller atraviesan toda la retina y forman parte importante en la unión de las membranas limitantes, sirven como agentes protectores de la retina y como sustrato para el crecimiento y la plasticidad neuronal. Liberan moléculas de señalización neuroactivas que modulan la actividad neuronal y que están implicados en la mediación del acoplamiento neurovascular. En condiciones patológicas, un subconjunto de las células de Müller puede diferenciarse hacia progenitores neurales y/o células madre capaces de regenerar los fotorreceptores y las neuronas (Reichenbach and Bringmann 2013).

Las vías ópticas, a través del nervio óptico, constituyen la transmisión de los impulsos nerviosos desde la retina hasta la corteza cerebral. La luz es captada por los conos y bastones que transforman las imágenes recibidas en impulsos nerviosos. Estos, son transmitidos a las células bipolares y después a las ganglionares. Por último, las células ganglionares envían sus axones, como

componentes del nervio óptico, hasta el cerebro, donde se procesan las imágenes.

1.2. Otras estructuras oculares

Otras estructuras de interés constituyentes del globo ocular son el cristalino y la cavidad vítrea.

El cristalino, situado inmediatamente detrás del iris en el plano pupilar es una lente biconvexa de forma elíptica, transparente y avascular, que ofrece poder de refracción y acomodación para que los rayos luminosos se desvíen e incidan sobre la retina.

La cavidad vítrea o segmento posterior es el mayor compartimento del ojo. En su interior se encuentra el vítreo, formado por un gel que contiene alrededor del 99% de agua, colágeno y glucosaminoglicanos, en especial ácido hialurónico. Además contiene sodio, glucosa, cloro y potasio.

2. Patologías degenerativas que afectan al segmento posterior del ojo

Las patologías que afectan al segmento posterior del ojo se caracterizan por ser devastadoras y son responsables de la mayoría de las disfunciones visuales y ceguera de la población mundial. En la actualidad, las enfermedades de mayor prevalencia en los países desarrollados y que comprometen la visión del paciente son: la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), el glaucoma y la retinopatía diabética (RD). A estas últimas hay que añadir otras patologías importantes que también cursan con degeneraciones de la retina y del nervio óptico, entre las que se pueden destacar la retinosis pigmentaria (RP) o la neuropatía óptica de Leber (NOHL).

2.1. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) afecta a más de 30 millones de personas en el mundo y supone una causa común de ceguera en personas mayores de 50 años en los países desarrollados (Klein, Cruickshanks et al. 2010, Miller 2013). La DMAE produce alteraciones en la mácula y se caracteriza por la pérdida de visión central (Figura 6). En esta patología tiene lugar una degeneración de las células fotorreceptoras y está ligada directamente con el envejecimiento pero también con otros factores de riesgo tales como el tabaco, alteraciones genéticas, antecedentes familiares, obesidad o elevada presión sanguínea (Fischer 2015, Yonekawa, Miller et al. 2015).

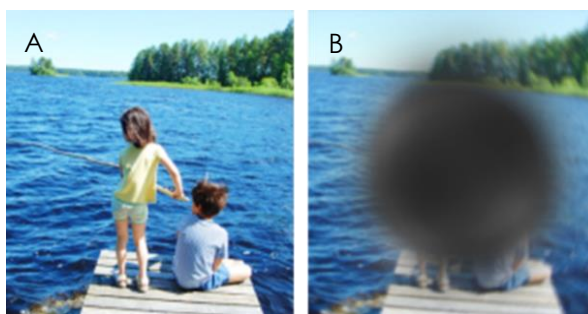


Figura 6. Visión normal (A) y visión de un paciente con DMAE (B). Imagen obtenida de [<http://www.grupoaltavista.com.uy>].

La DMAE se clasifica en dos tipos: degeneración macular no exudativa (no neovascular, seca o atrófica) y degeneración macular exudativa (neovascular o húmeda) (Figura 7).

La DMAE no exudativa es la forma más frecuente de la enfermedad (80% de los casos). Su progresión es lenta (años) y la pérdida total de visión tiene lugar 5-10 años después del inicio de la patología. Presenta distintas fases y se caracteriza por la muerte de fotorreceptores y de las células del EPR subyacentes por atrofia capilar. En las fases iniciales de la DMAE seca, se

pueden observar desde cambios pigmentarios en la mácula hasta la presencia en la parte posterior del ojo de depósitos amarillentos compuestos de material extracelular denominados drusas. Estas pueden variar de número y tamaño y son consideradas un proceso natural en el envejecimiento del ojo. En la fase final de la enfermedad se produce atrofia macular y pérdida de visión central en ambos ojos. Con el tiempo, la patología puede evolucionar a DMAE húmeda (Buschini, Fea et al. 2015). En la actualidad no existe ningún tratamiento eficaz para la DMAE no exudativa y tan sólo es posible frenar su evolución para evitar la pérdida completa de la visión. Los tratamientos actuales están dirigidos a la intervención de los procesos que se producen en el desarrollo de la enfermedad, como son el daño oxidativo, la acumulación de productos tóxicos, cambios en la matriz extracelular, la inflamación crónica y la insuficiencia vascular coroidea, entre otros. Por esta razón, la tendencia actual en el tratamiento se basa en la administración de antioxidantes, agentes antiinflamatorios, principios activos que aumentan el flujo sanguíneo a nivel de la coroides y terapias neuroprotectoras (Zarbin and Rosenfeld 2010, Querques, Rosenfeld et al. 2014). También hay estudios que se orientan hacia una terapia basada en células madre, y en la actualidad hay ensayos clínicos en esta dirección (Taskintuna, Elsayed et al. 2016). Por ejemplo, un ensayo clínico en fase I/II (NCT01344993) ya completado, tuvo como objetivo principal la evaluación de la inocuidad y tolerabilidad de la inyección subretiniana de células madre embrionarias derivadas del EPR en pacientes con DMAE seca. Los resultados de este estudio proporcionan la primera evidencia de la seguridad a medio y largo plazo del tratamiento, la supervivencia del injerto y la posible actividad biológica de la progenie de células madre pluripotentes. De hecho, estos resultados sugieren que las células derivadas del EPR podrían proporcionar una nueva fuente de células potencialmente segura para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos que requieren reparación o reemplazo de tejidos (Schwartz, Regillo et al. 2015). En esta misma línea de investigación se diseñó otro ensayo clínico de fase I/IIa (NCT02590692) para evaluar la viabilidad del suministro y la seguridad de la inyección subretiniana de células madre embrionarias derivadas del EPR en pacientes con

degeneración macular avanzada y seca. En la actualidad, se encuentra en fase de reclutamiento.

La DMAE exudativa, aunque es la forma menos frecuente, es la más severa y conduce a la pérdida de visión central. Se caracteriza por la formación de vasos sanguíneos anormales en la vasculatura coroidea, membrana de Bruch y EPR. Así, se origina una membrana neovascular en la zona subretiniana a través de la cual se pueden producir pérdidas de líquido y hemorragias en el espacio subretiniano que ocasionan distorsión en la retina y por tanto, pérdida visual. Una de las posibles causas de esta forma de la enfermedad es la falta de oxígeno en la retina (Nowak 2014, Yonekawa, Miller et al. 2015). El tratamiento actual de la DMAE húmeda consiste en la cirugía láser, la terapia fotodinámica y las terapias farmacológicas con agentes antiangiogénicos. Dado que el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es el principal regulador angiogénico de la neovascularización coroidea (CNV) y un promotor principal de la DMAE, la mayoría de los tratamientos que se emplean en la práctica clínica habitual están basados en la inhibición del VEGF a través de la inyección intravítrea de fármacos anti-VEGF tales como bevacizumab (Avastin®), pegaptanib (Macugen®), ranibizumab (Lucentis®) o aflibercept (Eylea®). Dichas sustancias activas, pueden actuar uniéndose al VEGF o bloqueando la transmisión de la señal del receptor, inhibiendo así el proceso de angiogénesis. En la actualidad se postula que el tratamiento para la DMAE húmeda podría beneficiarse de una terapia combinada que redujera la neovascularización y a su vez evitara la muerte neuronal, incluyendo agentes neuroprotectores o antiinflamatorios (Kodjikian, Decullier et al. 2014, Ishikawa, Jin et al. 2015, Lai and Landa 2015, Prea, Chan et al. 2015).

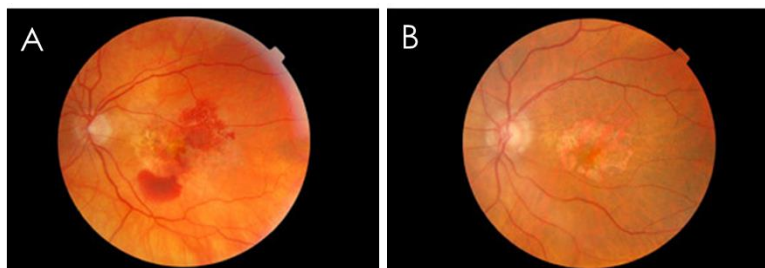


Figura 7. Retina de un paciente con DMAE húmeda (A) y retina de un paciente con DMAE seca (B). Imagen de [<http://www.biopticdrivingusa.com/>].

2.2. Glaucoma

El glaucoma engloba a un grupo heterogéneo de afecciones oculares que cursan con una pérdida progresiva de los axones y somas de las células ganglionares de la retina (CGR), y con la aparición de defectos típicos e irreversibles a nivel de la cabeza del nervio óptico y del campo visual (Quigley, Addicks et al. 1981, Nuschke, Farrell et al. 2015). Es considerada la segunda causa de ceguera irreversible en el mundo, y actualmente existen aproximadamente 65 millones de pacientes con glaucoma. Se estima que 76 millones de personas padecerán esta patología en 2020 y ascenderá a 111.8 millones en 2040 (Tham, Li et al. 2014). Se trata de una neuropatía óptica de carácter crónico y multifactorial en la que se produce una pérdida gradual de visión periférica que puede desencadenar ceguera si no se trata a tiempo. La progresión del glaucoma puede ser asintomática hasta una etapa relativamente tardía por lo que el diagnóstico se retrasa con frecuencia. El principal factor de riesgo en el desarrollo del glaucoma es el aumento de la presión intraocular (PIO). Se considera que valores superiores a 21 mmHg suponen un riesgo de padecer lesiones glaucomatosas (Kanski 2012). La PIO depende del balance existente entre la velocidad de producción del humor acuoso y su velocidad de eliminación. La velocidad de producción del humor acuoso (volumen aproximado de 250 μ L), que presenta variaciones diurnas, es alrededor de 2.5 μ L/min. Cuando el balance entre velocidad de producción y eliminación se desequilibra, el humor acuoso se acumula, provocando un

aumento de la PIO. Este incremento desencadena un compromiso en el suministro de sangre a la retina por el exceso de presión, viéndose afectado el tejido neuronal (Figura 8).

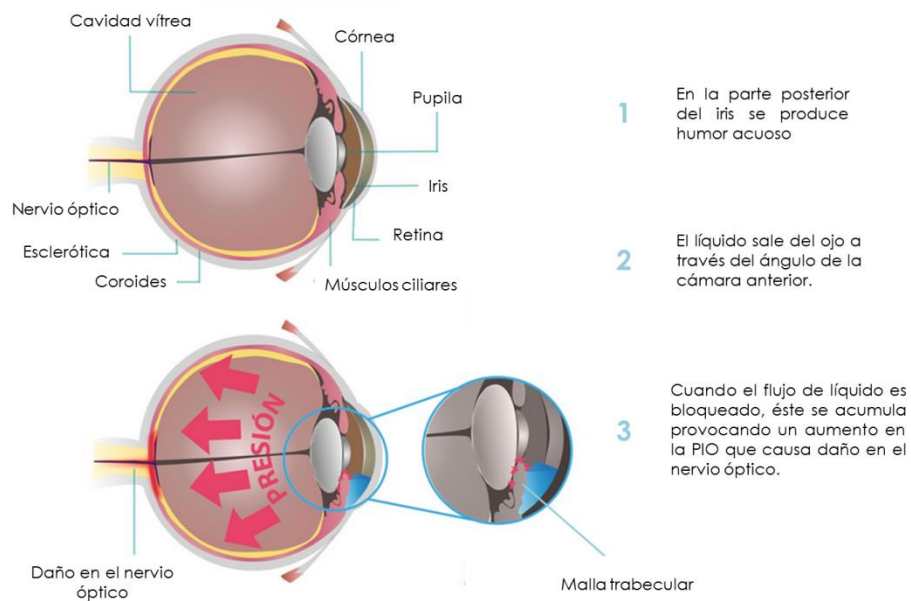


Figura 8. Esquema básico del proceso glaucomatoso. Ilustración adaptada de [https://infografiasencastellano.com].

Además, al aumentar la presión sobre el tejido conectivo de la lámina cribosa, se interrumpe el flujo axo-plasmático a nivel de la fibra óptica, de tal forma que los factores neurotróficos endógenos no pueden acceder al cuerpo neuronal de las CGR desde sus axones. En respuesta, estas células desencadenan un proceso natural de degeneración celular (apoptosis) (Almasieh, Wilson et al. 2012, Cuenca, Fernández-Sánchez et al. 2014). Sin embargo, la PIO no es el único factor de riesgo y tampoco está directamente ligado a padecer la enfermedad, ya que puede haber pacientes con PIO normal que padecen glaucoma. De hecho, ni todos los pacientes con PIO elevada desencadenan glaucoma, ni la disminución de ésta proporciona una garantía de protección contra la enfermedad (Sommer 1989). Desde hace algunos años se está estudiando el efecto que tiene un aporte sanguíneo

insuficiente a la cabeza del nervio óptico y las células retinianas adyacentes en ausencia de PIO elevada. Así, se barajan otros factores de riesgo de la enfermedad tales como: hipotensión sanguínea, hipotensión ortostática, hipotensión nocturna, migrañas, apnea del sueño o diabetes (He, Vingrys et al. 2011, Ramli, Nurull et al. 2013, Bilgin 2014, Klemm and Gesser 2014, Doucette, Rasnitsyn et al. 2015).

La forma más común de glaucoma es el glaucoma de ángulo abierto (GAA). La salida del humor acuoso desde la cámara anterior se produce a través del ángulo que forman la unión de la córnea, el iris y la esclera (ángulo camerular). Este ángulo permite la salida del humor acuoso hacia el exterior del ojo y así se mantiene la PIO. No obstante, pese a que este ángulo se encuentre abierto, por diferentes motivos puede ocurrir que no funcione adecuadamente, lo que produce la salida del humor acuoso tenga lugar más lentamente provocando un aumento de la PIO y el consiguiente daño del nervio óptico (Figura 9) (Erichiev and Egorov 2014).

El glaucoma de tensión normal (GNT) se caracteriza por presentar 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 (Mi, Yuan et al. 2014).

El glaucoma por cierre angular o glaucoma de ángulo cerrado (GAC) es provocado por un bloqueo de los canales de drenaje del humor acuoso debido a que el ángulo camerular se cierra y ello desencadena un repentino aumento de la PIO (incluso por encima de los 50 mmHg) y daño sobre el nervio óptico (Figura 9). La patología se desarrolla rápidamente y la elevación de la PIO suele ser sintomática (dolor ocular, enrojecimiento, visión borrosa) y puede originar cambios estructurales oculares como pérdida de células endoteliales corneales con edema estromal, daño isquémico en la musculatura iridiana con midriasis arrefléxica o necrosis focal del epitelio cristalino (Patel and Patel 2014, Ahram, Alward et al. 2015).

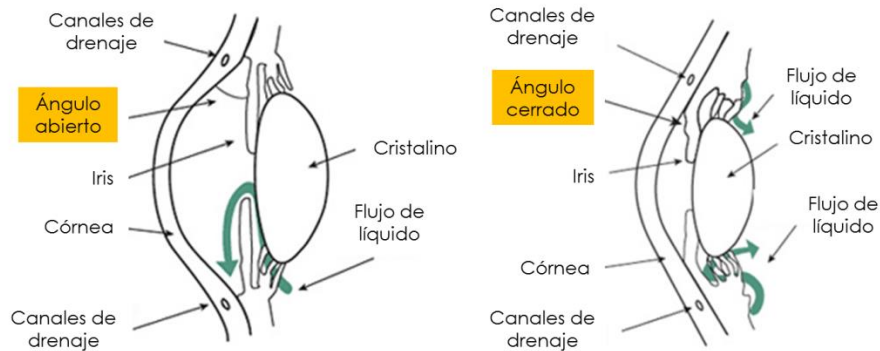


Figura 9. Esquema del mecanismo de producción del glaucoma de ángulo abierto (GAA) y del glaucoma de ángulo cerrado (GAC). Ilustración adaptada de [<http://www.glaucoma.org>].

El glaucoma congénito primario (GCP) es poco frecuente ya que afecta aproximadamente a 1:10000 neonatos. Responde a un desarrollo incorrecto o incompleto de los canales de drenaje durante el periodo prenatal (Moore, Tomkins et al. 2013, Chen, Chen et al. 2014).

Aunque a día de hoy no existe un tratamiento eficaz para paliar el glaucoma, tras una detección precoz, la progresión puede ralentizarse e incluso detener utilizando la terapia adecuada (Weinreb, Aung et al. 2014). Así, el tratamiento del glaucoma se basa en mantener la función y el campo visual del paciente mediante la protección de las estructuras oculares afectadas por la patología. Las estrategias llevadas a cabo para la consecución de estos objetivos se resumen a continuación (Schmidl, Schmetterer et al. 2015):

(1) Reducción de la PIO por debajo o hasta el valor considerado como seguro mediante tratamiento hipotensor (Toris 2010, Chen, Runyan et al. 2011, Tanna and Lin 2015). El descenso de la PIO que se busca conseguir con el tratamiento es la denominada *presión diana*, definida como la PIO media obtenida con tratamiento que evita la progresión del daño glaucomatoso (Kass, Heuer et al. 2002). El tratamiento de inicio en la mayoría de las ocasiones consiste en la administración tópica de agentes hipotensores, reservando el tratamiento quirúrgico para aquellos pacientes en los que no se obtenga una

PIO que permita controlar la enfermedad. Dentro de los agentes hipotensores se distinguen varios grupos terapéuticos, tales como los análogos de prostaglandinas, los agonistas adrenérgicos, los beta bloqueantes, los inhibidores de la anhidrasa carbónica o los simpaticomiméticos entre otros, siendo actualmente los análogos de prostaglandinas la primera línea en el tratamiento del glaucoma debido a su potencia hipotensora, mecanismo de acción y la simplicidad de su posología (una vez al día). En España se encuentran comercializados cuatro fármacos de este grupo terapéutico: latanoprost, bimatoprost, travoprost y tafluprost (Lin, Zhao et al. 2014, Sanford 2014, Quaranta, Riva et al. 2015). Por su parte, entre las modalidades de tratamiento quirúrgico de reducción de la PIO encontramos: trabeculoplastia láser; cirugía filtrante penetrante o trabeculectomía; cirugía filtrante no penetrante; dispositivos de derivación o drenaje artificiales y uso de dispositivos bypass trabecular.

(2) Mantenimiento o incremento de la presión de perfusión ocular (PPO) del nervio óptico y la retina: tratamiento vasoprotector. Como se comentó con anterioridad, la pérdida de fibras nerviosas y CGR en el glaucoma responde a un doble mecanismo; por un lado se produce compresión mecánica, y por otro sucede un evento de remodelación tisular inducido por la isquemia y la falta de perfusión a nivel de la cabeza del nervio óptico (Caprioli and Coleman 2010). La PPO se define como la diferencia entre la presión de las arterias que irrigan el ojo y la PIO. La alteración en la PPO afecta al flujo sanguíneo ocular ocasionando cambios en la perfusión de la retina y el nervio óptico. Al incrementar la PIO, la PPO disminuye de forma proporcional. Por tanto, la reducción de la PIO es el tratamiento más directo para aumentar la PPO. De igual modo, la vasoprotección, entendida como la capacidad de algunas sustancias de mejorar el flujo sanguíneo a nivel de la cabeza del nervio óptico, se plantea como una alternativa para el tratamiento del glaucoma. En este sentido, los fármacos calcio-antagonistas al incrementar el flujo sanguíneo ocular y tener un efecto neuroprotector sobre las CGR, podrían tener un efecto muy positivo sobre el pronóstico de los pacientes con glaucoma. (Koseki, Araie et al. 2008, Araie and Mayama 2011).

(3) Neuroprotección. De acuerdo a la definición de Casson et al. la neuroprotección es la preservación relativa de la estructura y/o función neuronal (Casson, Chidlow et al. 2012). La neuroprotección consiste en la aplicación de distintos agentes terapéuticos para intentar prevenir, frenar e incluso revertir la muerte de éstas células neuronales, cualquiera que sea la naturaleza del daño primario. En glaucoma, el objetivo de la neuroprotección consiste en limitar o retrasar el daño dependiente o independiente de la PIO en las CGR. Para ello, se interfiere con los procesos y/o sustancias que provocan la muerte neuronal o se promueve la supervivencia neuronal mediante la mejora de las vías de señalización axonal e inhibiendo la muerte celular (Osborne, Chidlow et al. 1999, Osborne, Ugarte et al. 1999). Además se ha demostrado la eficacia aislada y/o combinada con agentes antioxidantes en terapia neuroprotectiva en estudios experimentales (Baltmr, Duggan et al. 2010, Nucci, Strouthidis et al. 2013). Este epígrafe será desarrollado con mayor detenimiento en otro apartado.

2.3. Retinopatía diabética (RD)

La retinopatía diabética (RD) es un efecto secundario de la diabetes. Aproximadamente un tercio de pacientes diabéticos presenta alguna forma de esta patología ocular. Es una de las cuatro causas más frecuentes de pérdida de visión, siendo la principal en personas de mediana edad y ancianos (Figura 10). La RD está íntimamente relacionada con la cronicidad de la diabetes, la hiperglucemia y la hipertensión. Aunque tradicionalmente estaba considerada como una enfermedad microvascular, la neurodegeneración de la retina también está involucrada. En el mundo, aproximadamente 93 millones de personas padecen esta enfermedad (Yau, Rogers et al. 2012, Wong, Cheung et al. 2016).



Figura 10. Visión normal (A) y visión de un paciente con retinopatía diabética (B).
Fotografía obtenida de [<http://www.aliciapareja.com>].

La RD se produce por una alteración vascular y parenquimatosa secundaria a una microangiopatía que afecta al lecho vascular retiniano. La causa de la microangiopatía diabética es desconocida en la actualidad, sin embargo existen evidencias de la implicación de una serie de alteraciones anatomopatológicas, hemorreológicas y bioquímicas en el desarrollo de la enfermedad (Figura 11).

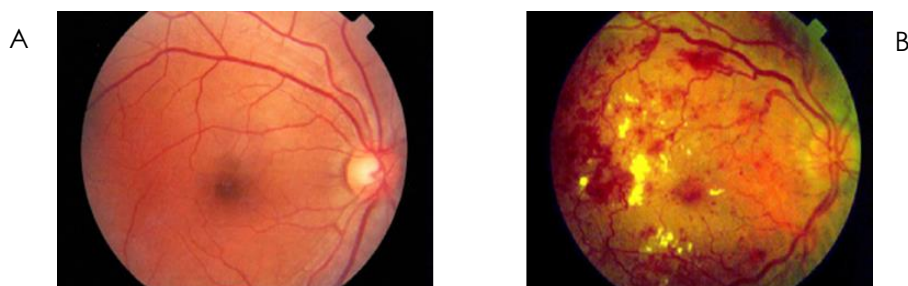


Figura 11. Retina de un ojo sano (A) y retina de un ojo con retinopatía diabética (B).
Fotografía obtenida de [<http://www.aliciapareja.com>].

No obstante, es difícil establecer una secuencia de los mecanismos implicados. En cualquier caso, tal y como se ha comentado anteriormente, cada vez existen más evidencias que sugieren que la neurodegeneración de la retina es un evento relacionado en la patogénesis de la RD y que participa en las alteraciones de la microcirculación producidas en la enfermedad. Además, estudios recientes señalan que los fotorreceptores podrían

desempeñar un papel crítico en la degeneración de los capilares de la retina (Simo and Hernandez 2012, Kern and Berkowitz 2015, Kowluru and Mishra 2015, Stitt, Curtis et al. 2015).

Existen dos tipos de RD; Una temprana o retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) y una más avanzada o retinopatía diabética proliferativa (RDP).

La RD no proliferativa se caracteriza por la formación de microaneurismas y dilataciones capilares inicialmente asintomáticas. A medida que se incrementa la severidad de la patología pueden aparecer otros síntomas tales como exudados duros o céreos compuestos por proteínas séricas, hemorragias retinianas, alteraciones venosas y oclusiones vasculares que pueden originar isquemia vascular o edema macular (Figura 12). En este sentido, una complicación de la RD es el edema macular. Se desencadena cuando los vasos sanguíneos en la retina tienen escapes de fluido, lo que produce la inflamación de la mácula. Dado que la mácula es la responsable de la visión central, este hecho provoca la pérdida de visión en personas con diabetes, especialmente si no es tratada. La pérdida de visión puede ser leve o severa, pero en muchos casos, la visión periférica (lateral) se mantiene (Talu, Calugaru et al. 2015).

La RD proliferativa está definida por la formación de vasos retinales de neoformación o neovasos, los cuales, junto a un tejido fibroso que los acompaña, proliferan más allá de la retina (Figura 12). Este proceso de neovascularización ocurre básicamente como consecuencia de la isquemia progresiva que se produce en la RD. En respuesta, la retina produce factores vasoproliferativos que dan lugar a esos nuevos vasos sanguíneos que no son capaces de proporcionar a la retina el flujo sanguíneo adecuado. Además, a menudo van acompañados por tejidos fibrosos que pueden originar hemorragias vítreas y desprendimiento de retina. Por otro lado, la complicación más grave de la RD proliferativa es el glaucoma hemorrágico o neovascular, producido por la neovascularización a nivel de los vasos del iris,

que se extiende hasta la cámara anterior obstruyendo la salida del humor acuoso (Tremolada, Del Turco et al. 2012, Stitt, Curtis et al. 2015).

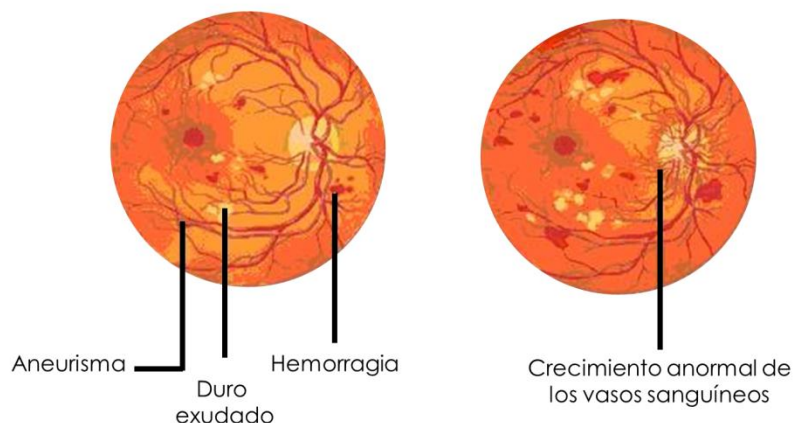


Figura 12. Representación que muestra la apariencia de una retina con RD no proliferativa (A) y una retina con RD proliferativa (B). Ilustración adaptada de [<http://clinica.ciegosordos.org>].

Para el tratamiento de la RD es imprescindible un estricto control de los niveles de glucosa en sangre combinado con una terapia farmacológica basada en la disminución de los valores de hipertensión arterial e hiperlipemia. Otros recursos terapéuticos empleados en la práctica clínica son la fotocoagulación láser, la crioterapia y la vitrectomía. En el caso de que el paciente con RD desarrolle edema macular diabético, se emplea la inyección intravítrea de agentes anti-VEGF como ranibizumab (Lucentis®), aprobado por la FDA en 2015 (Behl and Kotwani 2015, Simo and Hernandez 2015). En esta misma línea, hay también ensayos clínicos en marcha enfocados al tratamiento del edema macular diabético mediante la administración de acetónido de triamcinolona o bevacizumab en monoterapia o en terapia combinada. Por ejemplo, un estudio aleatorizado de fase IV (NCT00737971) para la evaluación de la eficacia de triamcinolona y bevacizumab administrados por vía intravítrea de forma individual o simultánea para el tratamiento del edema macular diabético, ha sido completado recientemente.

2.4. Retinosis pigmentaria (RP)

La retinosis pigmentaria (RP) es un conjunto de enfermedades oculares crónicas de origen genético y carácter degenerativo que afectan a 1 de cada 3500-5000 personas en el mundo. Es la primera causa de ceguera de origen genético, y su prevalencia es mayor en mujeres que en hombres. Se caracteriza por la aparición de una degeneración progresiva de la retina. Inicialmente afecta a los fotorreceptores ubicados en el ecuador del ojo, y posteriormente al epitelio pigmentario de la retina que comienza a mostrar cambios degenerativos y proliferativos. La RP provoca la pérdida gradual de la visión nocturna y del campo visual periférico con una conservación relativa del campo visual central (Figura 13). La enfermedad puede ser heredada con un patrón autosómico recesivo, autosómico dominante o ligado al cromosoma X. También se han reportado patrones de herencia simples (casos esporádicos). Entre las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad se encuentran: agregaciones pigmentarias, alteraciones circulatorias de la coroides, agudeza visual deteriorada, degeneración del EPR, atrofia coriocapilar, opacificaciones corneales o estrechamiento de los vasos retinianos (van Soest, Westerveld et al. 1999, Hamel 2006, Anasagasti, Irigoyen et al. 2012, Wert, Lin et al. 2014). Debido a la alta heterogeneidad y diversidad de los patrones de herencia, el diagnóstico molecular de la RP resulta muy complicado; Sin embargo, las nuevas metodologías de secuenciación impulsadas por el proyecto genoma humano, han contribuido a los avances en esta línea. En la actualidad no existe ningún tratamiento eficaz que permita restablecer la visión o detener el curso natural de su evolución. Las estrategias terapéuticas que se emplean se orientan hacia a la ralentización del proceso degenerativo, el tratamiento de las complicaciones oculares y a la ayuda psicológica de los pacientes afectados (Anasagasti, Irigoyen et al. 2012, Zheng, Li et al. 2015). En este sentido, los diferentes enfoques terapéuticos que existen están directamente relacionados con el estado de la patología:

En las fases tempranas de la enfermedad todavía existe supervivencia de fotorreceptores, por lo que el tratamiento está dirigido a la detención de la degeneración de las células, corrigiendo la alteración bioquímica del ciclo

visual. Con este objetivo hay ensayos clínicos centrados en la terapia génica. Por ejemplo actualmente hay un estudio en curso de fase I/II de escalado de dosis para la evaluación de la de seguridad y tolerabilidad de la inyección intravítrea de RST-001, una terapia génica, en pacientes con retinosis pigmentaria (NCT02556736). Otro ensayo clínico de fase I, tiene como objetivo el remplazo del gen MERTK, directamente implicado en la patología mediante el empleo de un vector AAVV2 (Boye, Boye et al. 2013). También se ha estudiado con éxito la terapia génica con CNTF que ha demostrado la protección sobre la degeneración de los fotorreceptores en un modelo animal (Lipinski, Barnard et al. 2015).

En etapas más avanzadas en las que es necesario hacer frente a la muerte de fotorreceptores, se plantean terapias basadas en la administración de factores neurotróficos (como CNTF) y antiapoptóticos, que limitan la producción de moléculas tóxicas en la retina y reducen el daño oxidativo. No obstante, son alternativas que se encuentran todavía en investigación (Leonard, Petrin et al. 2007, Lipinski, Singh et al. 2011, Birch, Weleber et al. 2013, Lipinski, Barnard et al. 2015). Sin embargo, se han desarrollado sistemas artificiales como son Argus® I y Argus® II (Second Sight, USA), las primeras prótesis electrónicas retinianas para el tratamiento de pacientes adultos con retinosis pigmentaria avanzada, y que fueron aprobados por la FDA en 2013. El dispositivo, sustituye la función de las células retinianas degeneradas y puede mejorar la capacidad del paciente para percibir imágenes y movimiento.

En las etapas finales de la RP, no existen o quedan muy pocos fotorreceptores activos. Los últimos avances postulan el trasplante autólogo de injertos de células del EPR derivadas de iPSC (células pluripotenciales inducidas) corregidas genéticamente, terapia que se encuentra en fases de ensayo clínico. También hay varios ensayos clínicos en desarrollo con células progenitoras de la retina humana (hCPR). Concretamente, el primer estudio en humanos está en marcha en la actualidad, en fase de reclutamiento de pacientes. En este ensayo clínico de fase I/II (NCT02464436), los pacientes con retinosis pigmentaria recibirán una sola inyección subretiniana de células hCPR con el objetivo de evaluar la seguridad y la tolerancia de este tratamiento. Por su parte, el trasplante de fotorreceptores se enfrenta a desafíos técnicos

todavía no resueltos, pero sigue siendo uno de los avances pioneros en este campo (Zheng, Li et al. 2015).

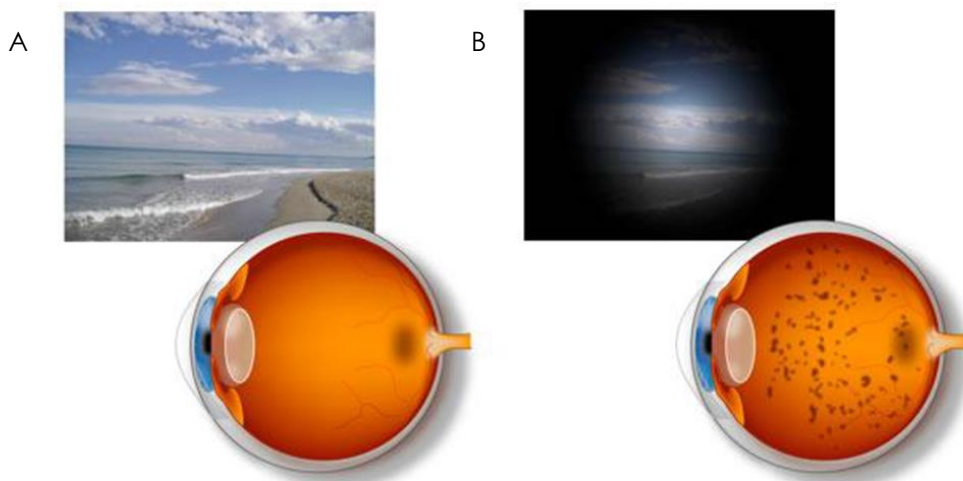


Figura 13. Representación de la visión y fondo de ojo de un sujeto sano (A) y un sujeto afectado por RP (B). Imagen obtenida de [<http://retinosis.umh.es/retinosis.html>].

2.5. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL)

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) es una degeneración de las células ganglionares de la retina y sus axones, que cursa con una pérdida aguda o subaguda de visión central. Se debe fundamentalmente a mutaciones patogénicas puntuales en el ADN mitocondrial. Aunque esta enfermedad afecta fundamentalmente a varones jóvenes, son las mujeres las únicas transmisoras genéticas de la misma. El inicio de la enfermedad de Leber suele ser repentino, sin dolor, provocando una pérdida de visión central generalmente en ambos ojos. Durante la fase aguda se observa una apariencia edematosa en la capa de fibras nerviosas de la retina y vasos peripapilares inflamados (microangiopatía). Además la vasculatura retiniana también resulta alterada. Durante la evolución de la enfermedad se produce una atrofia óptica severa y una disminución permanente de la agudeza visual debido a la rápida pérdida axonal. Algunos de los síntomas que acompañan a la enfermedad de Leber son la sensación de niebla en los ojos, trastornos en la

visión de los colores, cansancio rápido al leer, oscilación de la visión, cefalea o dolor orbitario (Meyerson, Van Stavern et al. 2015). A día de hoy los tratamientos para esta neuropatía son muy limitados. No obstante, el paciente puede seguir ciertas pautas que le permitan la mejora de su calidad de vida y minimizar el curso de la enfermedad. Es importante que los pacientes se abstengan de tomar alcohol, tabaco y ciertos antibióticos que puedan interferir en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Por otro lado la administración de fármacos neuroprotectores, antioxidantes, antiinflamatorios, antiapoptóticos y la terapia génica se plantean como futuras estrategias para el tratamiento de la NOHL (Gueven and Faldu 2013). Cabe resaltar Raxone® (idebenona) de Santhera Pharmaceuticals, el único fármaco específico aprobado para tratar la discapacidad visual en adolescentes y adultos con neuropatía óptica hereditaria de Leber. El mecanismo de acción de la idebenona implica sus propiedades antioxidantes y su capacidad para actuar como portador de electrones mitocondriales, de tal forma que es capaz de transferir electrones directamente al complejo mitocondrial III, restaurando así la producción de energía celular (ATP) y reactivando las células ganglionares retinianas inactivas pero viables. En última instancia, previene la pérdida de la visión, promoviendo la recuperación de la misma. Hasta el momento parece que la idebenona tiene efectos beneficiosos persistentes en la prevención del deterioro de la visión y en la recuperación de la visión en pacientes con NOHL en relación con el curso natural de la enfermedad (Lyseng-Williamson 2016).

3. Vías de administración de fármacos para el tratamiento de patologías oftálmicas del segmento posterior del ojo

El tratamiento de patologías oftálmicas requiere concentraciones eficaces de la sustancia activa en el tejido diana. Para ello, el agente terapéutico deberá alcanzar su lugar de acción teniendo que atravesar en determinados casos las distintas barreras biológicas. Aunque en los últimos años se han producido numerosos avances en el campo de la farmacoterapia

oftálmica, siguen existiendo obstáculos en su aplicación debido sobre todo a las limitaciones derivadas de la dosificación y biodisponibilidad ocular (Ranta and Urtti 2006). Además, en el caso de las patologías que afectan al segmento posterior del ojo, la presencia de barreras estáticas (córnea, esclera, retina y barrera hematorretiniana) y dinámicas (flujo sanguíneo conjuntival y coroideo, aclaramiento linfático y producción lagrimal) en el globo ocular, representan un reto importante a la hora de administrar el agente activo. Por esta razón, una selección adecuada de la vía de administración de acuerdo a la localización del tejido diana, minimiza en gran medida los problemas asociados a este nivel (Patel, Cholkar et al. 2013).

Existen cuatro potenciales vías de administración encaminadas a la consecución de concentraciones eficaces del agente activo en el segmento posterior del ojo: la vía tópica, la intravítrea, la periorcular y las vías que implican efecto sistémico. En la (Figura 14) se representan las principales vías de administración de fármacos a nivel ocular.

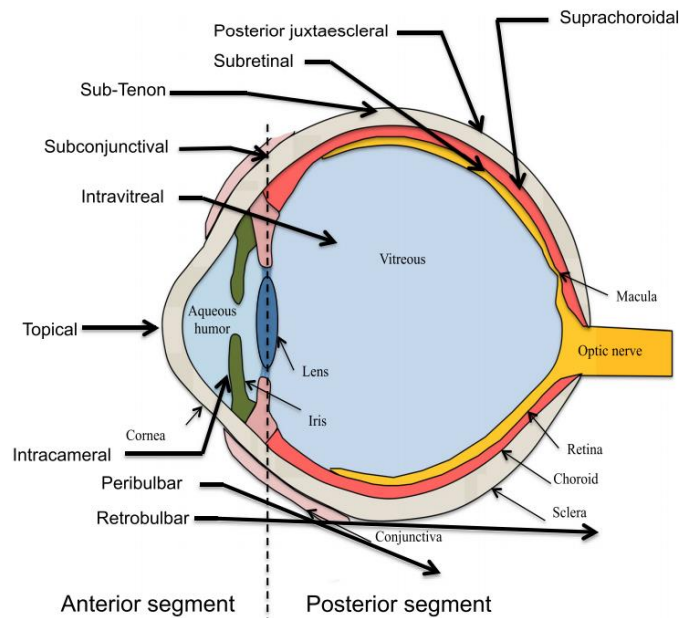


Figura 14. Principales vías de administración de fármacos a nivel ocular. Imagen extraída del trabajo que lleva por título: Pharmaceutical microscale and nanoscale approaches for efficient treatment of ocular diseases (Bravo-Osuna, Andres-Guerrero et al. 2016).

3.1. Administración tópica

La administración por vía tópica es la preferida para el tratamiento de patologías en oftalmología debido a su simplicidad, su bajo coste económico, la aceptación por parte del paciente y el hecho de ser una vía no invasiva. Los principios activos administrados por vía tópica pueden penetrar en el ojo a través de dos vías: corneal y no corneal, englobando esta última el paso de la sustancia a través de la conjuntiva y la esclera (Hughes, Olejnik et al. 2005, Gaudana, Jwala et al. 2009). Aunque la penetración de sustancias medicamentosas a través de la conjuntiva es poco significativa comparada con la córnea, la presencia de espacios celulares de mayor tamaño en esta barrera mecánica supone un incremento de la permeabilidad, de tal forma que las sustancias activas hidrófilas pueden llegar a alcanzar, en ciertas ocasiones, el segmento posterior del ojo (Urtti 2006). No obstante, la anatomía y fisiología de la superficie ocular dificultan en gran medida la penetración de la sustancia activa. Cuando un agente terapéutico es administrado por vía tópica en el ojo (en forma de gotas, suspensiones o pomadas), se estimulan distintos mecanismos como el lagrimeo, el parpadeo 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. Se estima que menos de un 5% de la dosis total administrada por vía tópica ocular accede al interior del ojo (Urtti 2006, Herrero-Vanrell 2007, Gaudana, Jwala et al. 2009, Patel, Cholkar et al. 2013). Por esta razón, la vía tópica oftálmica está destinada fundamentalmente al tratamiento de afecciones en la superficie ocular y en aquellos casos en los que el lugar de acción se encuentra en el segmento anterior del ojo (Geroski and Edelhauser 2000, Kompella, Kadam et al. 2010).

3.2. Administración por vías que implican efecto sistémico

El empleo de vías de administración que implican efecto sistémico está muy limitado debido fundamentalmente al acceso tan restringido que tiene el agente activo a los tejidos oculares como consecuencia de la existencia de distintas barreras. La barrera hematoocular consta de la barrera hematoacuosa, que dificulta el paso de fármacos a la cámara anterior, y la barrera hematorretiniana, que dificulta el acceso de las sustancias medicamentosas al espacio extravascular de la retina y al cuerpo vítreo. Estos hechos hacen que las dosis requeridas para alcanzar niveles terapéuticos en el segmento posterior del ojo sean muy elevadas, lo que supone un mayor riesgo de generar efectos adversos no deseados a nivel sistémico (Geroski and Edelhauser 2001).

3.3. Administración intravítrea

El depósito directo del fármaco en el segmento posterior del ojo mediante inyección intravítrea permite la obtención de concentraciones eficaces de principio activo en el vítreo desde el primer momento y superiores a las que se logran empleando otras vías de administración (Figura 15). Además, el uso de esta vía evita los efectos secundarios derivados de la administración por vías que implican efecto sistémico y la baja penetración de las moléculas terapéuticas a través de la vía tópica (Herrero-Vanrell and Refojo 2001, Herrero-Vanrell 2007, Eljarrat-Binstock, Pe'er et al. 2010, Patel, Cholkar et al. 2013).

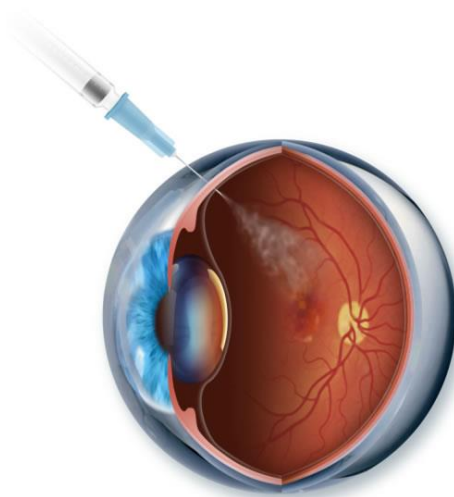


Figura 15. Inyección intravítrea. Imagen obtenida de [<http://www.hertseyesurgeon.co.uk/treatments/antivegf-therapy/>].

La administración intravítrea es ampliamente utilizada en patologías que afectan a la retina y al nervio óptico, tales como la retinopatía diabética, retinosis pigmentaria, uveítis, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma, procesos infecciosos causados por el virus del herpes y melanomas (Veloso, Zhu et al. 1997, Jiang, Moore et al. 2007, Jaisle, Ulmer et al. 2008, Rechtman, Stalmans et al. 2011, Scalinci, Scorolli et al. 2011, Siqueira, Messias et al. 2011, Kim, Cho et al. 2015). Los procesos de eliminación del fármaco desde el vítreo se producen por dos vías: a través de la cámara anterior o a través de la retina. Tanto la eliminación como la distribución del principio activo dependen de la velocidad de difusión a través del vítreo y de la geometría del ojo. En términos generales, las moléculas de mayor peso molecular son retenidas durante periodos más prolongados en el vítreo (incluso semanas), mientras que aquellas de menor peso molecular (< 500 Da) y baja lipofilia se eliminan con mayor rapidez (Thrimawithana, Young et al. 2011). Aunque la administración de sustancias activas por vía intravítrea se utiliza con frecuencia en el tratamiento de vitreoretinopatías, no está exenta de problemas debido principalmente a que se trata de una técnica invasiva, lo que implica ciertos riesgos a nivel ocular, como formación de cataratas, desprendimiento de retina, hemorragias vítreas, endoftalmitis y/o elevación de la presión intraocular

(Jager, Aiello et al. 2004, Fagan and Al-Qureshi 2013, Falavarjani and Nguyen 2013, Smith, Smith et al. 2014, Grzybowski 2015). Además de los riesgos inherentes al empleo de una vía invasiva, la administración del fármaco se realiza en forma de bolus. Además el tratamiento de enfermedades crónicas requiere concentraciones de principios activos mantenidas en el vítreo, y eso implica la necesidad de administrar inyecciones sucesivas, hecho que aumenta el riesgo de aparición de efecto secundarios (Ruiz-Moreno, Montero et al. 2007). Por esta razón, se hace patente la necesidad de formas farmacéuticas alternativas que proporcionen concentraciones terapéuticas en el lugar de acción durante periodos prolongados de tiempo, reduciendo en la medida de lo posible el número de inyecciones. Estos hechos fundamentan el interés en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos para el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo (Patel, Cholkar et al. 2013, Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014, Morrison and Khutoryanskiy 2014, Pearce, Hsu et al. 2015).

3.4. Administración periocular

En la vía periocular los agentes terapéuticos son depositados en la parte externa de la esclera, en aquellas zonas en las que hay un espacio virtual donde pueden ser almacenados a modo depósito para su liberación progresiva. La administración periocular se puede realizar en distintas zonas: subconjuntival, subtenon, yuxtaescleral posterior, retrobulbar y peribulbar (Gaudana, Jwala et al. 2009, Ranta, Mannermaa et al. 2010, Kang-Mieler, Osswald et al. 2014). El espesor de la esclera varía de 0,3 mm a 1 mm, aumentando en su porción posterior, cercana a la salida del nervio óptico y siendo más delgada a nivel del ecuador del globo) y de la superficie de la misma. Tras la administración periocular, el agente activo o formulación queda emplazado en el espacio periocular, desde el cual, puede acceder al vítreo a través de distintas rutas: hemática, transescleral o a través de la cámara anterior del ojo (Raghava, Hammond et al. 2004). La sustancia administrada accede a los vasos sanguíneos presentes en la conjuntiva, la coroides o la episclera, pasando así a la circulación sistémica y desde aquí a los tejidos

intraoculares gracias al flujo sanguíneo retiniano. Sin embargo, la cantidad de sustancia activa que alcanza el segmento posterior del ojo es muy limitada. Por otro lado, a través de la ruta transescleral, la sustancia administrada atraviesa los tejidos oculares subyacentes (esclera, coroides, membrana de Bruch-EPR y retina neurosensorial) para alcanzar el vítreo. También, desde la cámara anterior la sustancia activa puede difundir a la cámara posterior, y desde allí llegar hasta el vítreo superando la barrera del cristalino a través de la zónula de Zinn (Figura 16).

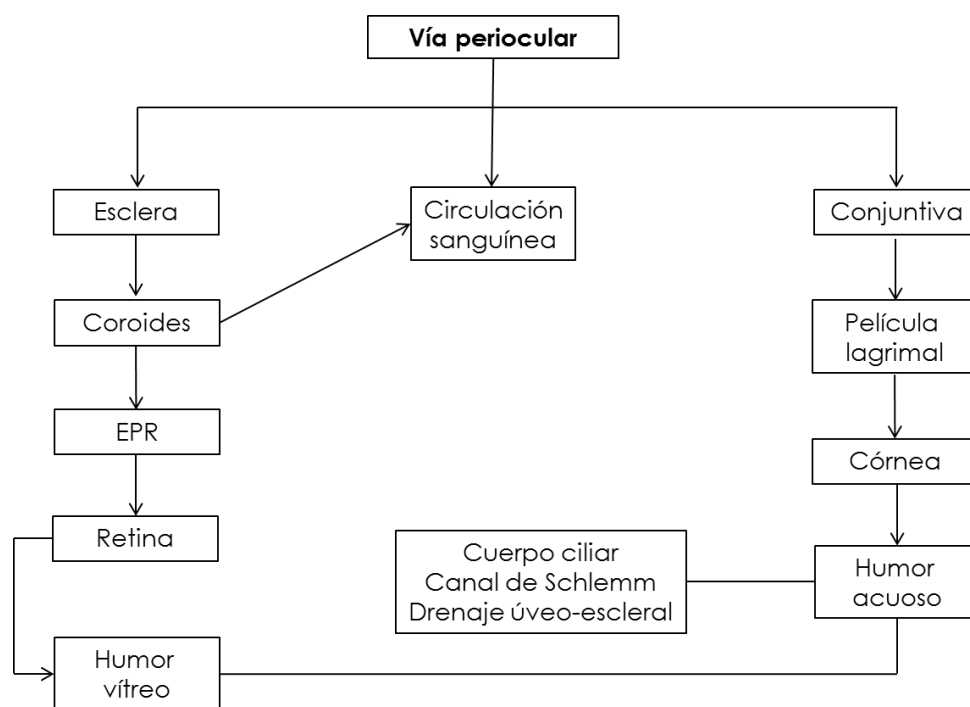


Figura 16. Esquema que ilustra las tres vías de penetración tras la administración periocular traducido del trabajo que lleva por título: Periocular routes for retinal drug delivery (Raghava, Hammond et al. 2004).

Cuando se recurre a la inyección subconjuntival, la formulación es depositada debajo de la membrana conjuntival que recubre la esclera (Kompella, Bandi et al. 2003, Raghava, Hammond et al. 2004, Jiang, Lv et al. 2015, Voss, Falke et al. 2015). Por esta vía el paso de agentes activos se ve limitado debido a la existencia de barreras dinámicas, estáticas y metabólicas. Aun así, la inyección subconjuntival permite alcanzar concentraciones en el

segmento posterior del ojo, superiores a las obtenidas en las vías con efecto sistémico. Sin embargo, también presenta efectos secundarios tales como la aparición de hemorragias subconjuntivales masivas, desprendimiento de retina, irritación ocular, dolor y depósitos de fármaco en la zona de inyección (Weijtens, Feron et al. 1999, Kompella, Bandi et al. 2003, Ghate, Brooks et al. 2007).

La inyección subtenon por su parte, implica la administración de la formulación entre la esclera y la cápsula de Tenon. La penetración del agente activo aumenta tras la administración debido a que el tiempo de contacto entre este y la esclera se prolonga dada la naturaleza avascular de esta última. En contraposición, esta vía presenta un elevado riesgo de perforación accidental del globo ocular (Raghava, Hammond et al. 2004, Thrimawithana, Young et al. 2011).

A través de la inyección yuxtaescleral posterior, la formulación es depositada en la zona más cercana de la mácula, consiguiendo elevadas concentraciones a este nivel. Además presenta la ventaja de disminuir el riesgo de endoftalmitis y desprendimiento de retina, eventos asociados a la inyección intravítrea (Van de Moere, Sandhu et al. 2005, Vinos 2005).

Por último, con la inyección retrobulbar se deposita la formulación directamente en el cono muscular, una zona ubicada entre los cuatro músculos oculares en la parte posterior del ojo. Fundamentalmente es utilizada para la inyección de anestésicos en determinadas cirugías oftálmicas, sin embargo, dada la proximidad del nervio óptico, los nervios motores y los nervios sensoriales, tienen riesgo de lesionarse.

Una forma de reducir los riesgos asociados a la inyección retrobulbar, es el empleo de la inyección peribulbar, que a diferencia de la anterior, se deposita la formulación en la parte externa del cono muscular. En cualquiera de los casos, los riesgos ligados al empleo de estas vías de administración existen, sobre todo debido al gran número de complicaciones asociadas

(perforación del globo ocular, traumatismo del nervio óptico, hemorragia orbitaria, etc) (Raghava, Hammond et al. 2004, Alhassan, Kyari et al. 2015).

4. Sistemas de liberación controlada de fármacos por vía oftálmica en el segmento posterior del ojo

Como ya se ha comentado anteriormente, el tratamiento eficaz de las patologías oculares que afectan al segmento posterior del ojo a través del empleo de las vías y formulaciones convencionales (p.ej. colirios), se ve limitado por diferentes factores. Por ello se hace necesario el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada en el tratamiento de patologías crónicas que afectan al segmento posterior del ojo. En esta línea, las terapias basadas en el empleo de formulaciones capaces, en una única aplicación, de liberar de forma inicial una cantidad de fármaco igual a la dosis de choque, seguida de una liberación lenta y gradual de la molécula activa durante un periodo de tiempo determinado resultan de gran interés (Rincon Alarcon and Molina-Martinez 2006). Así, el objetivo principal de la liberación controlada consiste en conseguir la cantidad correcta del agente activo en el lugar de acción y en el momento adecuado. Esta estrategia tecnológica está encaminada principalmente a mantener concentraciones eficaces de la sustancia activa durante el mayor tiempo posible y así eliminar o minimizar las concentraciones que exceden los requerimientos terapéuticos o evitar una posología en la que se necesiten administraciones repetidas de agente activo (Yasukawa, Tabata et al. 2011, Pearce, Hsu et al. 2015).

De acuerdo a su tamaño, los sistemas de liberación controlada pueden clasificarse en:

- Implantes (> 1mm): En función del biomaterial empleado para su elaboración pueden ser biodegradables y no biodegradables. Suelen requerir cirugía para su implantación y en el caso de los no biodegradables también para su retirada. Resultan de gran interés como sistemas de liberación prolongada.

- Micro y nanosistemas: Compuestos principalmente por liposomas (10-1000 nm), micropartículas (1-1000 μm) y nanopartículas (1-1000 nm). La principal ventaja de este tipo de formulaciones radica en su fácil administración como suspensión a través de una inyección convencional. Sin embargo, a diferencia de las micropartículas, los liposomas y las nanopartículas, resultan más interesantes en la vectorización y protección de sustancias activas que como sistemas de liberación prolongada debido a su elevada superficie específica.

4.1. Implantes

Los implantes intraoculares surgen del intento de superar el problema asociado a las administraciones repetidas de principio activo en el tratamiento de diversas enfermedades oftálmicas. Estos sistemas están diseñados con el objetivo de alcanzar concentraciones eficaces de sustancia terapéutica en el lugar de acción durante periodos prolongados de tiempo, que pueden comprender desde meses hasta años, por lo que resultan muy útiles en el tratamiento de patologías crónicas (Kang-Mieler, Osswald et al. 2014). En el caso de patologías del segmento posterior del ojo, se emplean implantes intravítreos y supracoroideos (Short 2008, Gaudana, Jwala et al. 2009, Eljarrat-Binstock, Pe'er et al. 2010, Morrison and Khutoryanskiy 2014). La liberación de la sustancia activa a partir del implante puede llevarse a cabo por simple difusión a través de una membrana permeable, en el caso de sistemas reservorio o a través del entramado polimérico si se trata de un sistema matricial. Además, si el polímero es biodegradable, su degradación también contribuirá a la liberación del fármaco. Las características de los implantes hacen que sean dispositivos con numerosas ventajas, entre las que cabe destacar: liberación sostenida de fármaco en el lugar de acción, eliminación de efectos secundarios asociados a la administración con efecto sistémico y a las inyecciones intravítreas repetidas. Sin embargo, también presentan inconvenientes, ya que, en muchos casos, la técnica empleada para su implantación es invasiva debido al tamaño del dispositivo y en ocasiones también se requiere incisión quirúrgica para su retirada (Del Amo and Urtti

2008, Eljarrat-Binstock, Pe'er et al. 2010, Yasukawa, Tabata et al. 2011, Kang-Mieler, Osswald et al. 2014).

En función de la naturaleza del polímero empleado para su elaboración, los implantes pueden clasificarse en dos categorías: biodegradables y no biodegradables (Figura 17). En ambos casos el material empleado ha de ser biocompatible y bien tolerado.

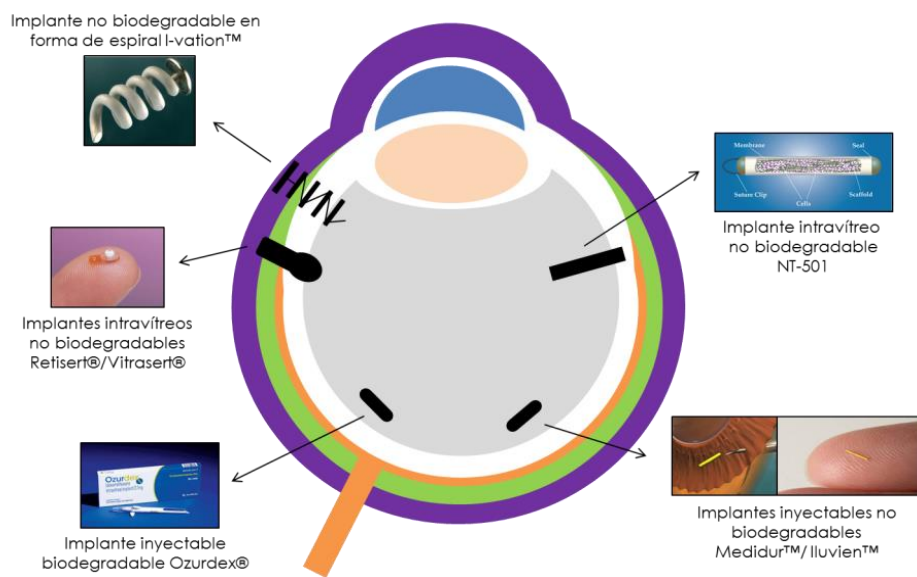


Figura 17. Ejemplos de implantes de liberación controlada.

Los implantes no biodegradables requieren su retirada una vez liberada la sustancia activa. La utilización de estos sistemas se asocia a efectos adversos tales como el desprendimiento de retina, hemorragias intravítreas, endoftalmítis, fibrosis y edema macular cistoide. Sin embargo, desde el punto de vista tecnológico, este tipo de implantes proporcionan una mayor precisión en la velocidad de liberación del agente activo y una liberación más prolongada que en el caso de aquellos que son biodegradables (Yasukawa, Ogura et al. 2006, Yasukawa, Tabata et al. 2011, Kang-Mieler, Osswald et al. 2014). Los polímeros utilizados en la elaboración de dispositivos intraoculares no biodegradables son principalmente la silicona, el alcohol polivinílico (PVA) y el

acetato de etilvinilo (EVA). Su fabricación se basa en el recubrimiento del agente activo con mezclas de polímeros, dando lugar a una serie de capas que conforman el sistema reservorio. De este modo, si se controla la composición de cada una de las capas, se puede modular la velocidad de liberación del agente terapéutico (Eljarrat-Binstock, Pe'er et al. 2010, Morrison and Khutoryanskiy 2014). Se citan a continuación algunos de los implantes empleados en clínica o en fase de investigación para el tratamiento de diferentes patologías oculares:

- Vitrasert® (Control Delivery Systems, Inc., ahora pSivida Corp.): Es un implante de ganciclovir, fabricado con PVA y EVA, aprobado por la FDA en 1996 para el tratamiento de la retinosis causada por citomegalovirus. Libera el fármaco durante 8 meses (Choonara, Pillay et al. 2010, Morrison and Khutoryanskiy 2014).

- Retisert® (pSivida Corp.): Fue aprobado en EEUU por la FDA en 2005 para el tratamiento de uveítis crónica no infecciosa. Contiene acetónido de fluocinolona, un corticoesteroide que se libera durante 30 meses (Choonara, Pillay et al. 2010, Morrison and Khutoryanskiy 2014).

- Iluvien®/Medidur® (Alimera Sciences, Inc., Alpharetta, GA/pSivida Inc.): Este implante de forma cilíndrica y 3.5 mm de longitud puede ser insertado mediante un sistema inyector acoplado a una aguja de calibre 25G sin necesidad de cirugía. Es capaz de liberar acetónido de fluocinolona durante tres años y está indicado para el tratamiento de edema macular diabético. También está aprobado por la FDA (Morrison and Khutoryanskiy 2014).

- I-Vation™: Es un implante de titanio intravítreo que contiene acetónido de triamcinolona. Recientemente ha concluido un ensayo clínico en fase II (NCT00692614), en el que se evalúa el efecto del implante con tres dosis distintas de acetónido de triamcinolona (100 µg, 500 µg, 925 µg) para el tratamiento de edema macular diabético. No obstante, los resultados no han sido publicados todavía (Choonara, Pillay et al. 2010, Boyer 2013).

- Existen otros dispositivos intravítreos que utilizan una tecnología basada en la encapsulación de células humanas del epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19) modificadas genéticamente para secretar distintos factores. Estos

dispositivos están siendo desarrollados por la compañía Neurotech Pharmaceuticals Inc. (Cumberland, RI, USA). Se basan en la implantación del sistema en el vítreo a través de una incisión escleral, y se caracterizan por la difusión hacia el exterior del agente activo, evitando el ataque inmunológico en su interior. Actualmente tienen en fase de investigación tres versiones del dispositivo; (1) El NT-501 secreta el factor neurotrófico ciliar (CNTF) para el tratamiento de la DMAE y la retinosis pigmentaria (fase II; NCT00447993 y NCT00447980) y para el tratamiento glaucoma (fase pre-clínica); (2) el NT-503, que secreta un factor antiangiogénico (anti-VEGF) está en fase II de investigación clínica para el tratamiento de la DMAE neovascular (NCT02228304) y (3) el NT-506 secreta anti-VEGF y anti-PDGF (antagonista del factor de crecimiento derivado de plaquetas) para el tratamiento de la DMAE húmeda (fase pre-clínica) (Choonara, Pillay et al. 2010, Zhang, Hopkins et al. 2011, Boyer 2013).

Los implantes biodegradables son especialmente interesantes sobre todo porque, como ya se ha comentado, una vez implantados, desaparecen progresivamente del lugar de acción, evitando de este modo los riesgos asociadas a la retirada quirúrgica. Estos sistemas se han desarrollado en forma de sólido y semisólido. Su implantación es más sencilla que en los dispositivos no biodegradables, pues en la mayoría de los casos pueden ser administrados a través de una inyección convencional (Yasukawa, Ogura et al. 2006, Eljarrat-Binstock, Pe'er et al. 2010). Los polímeros empleados en la elaboración de este tipo de dispositivos pueden ser hidrofílicos o hidrofóbicos. Entre los polímeros hidrofílicos, los más ampliamente utilizados son la gelatina, la albúmina, el colágeno, el quitosano, el dextrano y el almidón. Por otro lado, dentro de los polímeros hidrofóbicos, se encuentran el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros, ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (Yasukawa, Ogura et al. 2006, Yasukawa, Tabata et al. 2011). El PLA, el PGA y sus respectivos copolímeros están aceptados tanto por la FDA (Food and Drug Administration) como por la EMA (European Medicines Agency) para su uso en humanos y son utilizados en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas, debido en gran parte a su biocompatibilidad y biodegradabilidad (Janoria,

Gunda et al. 2007, Del Amo and Urtti 2008, Yasukawa, Tabata et al. 2011). Las cadenas poliméricas presentan la gran ventaja de ser hidrolizadas en el organismo, dando lugar como metabolitos, ácidos láctico y glicólico, que se eliminan fácilmente a través del ciclo de Krebs sin presentar toxicidad (Colthurst, Williams et al. 2000). Además, la velocidad de degradación de estos polímeros puede controlarse, ya que este factor depende de la composición y el peso molecular del polímero seleccionado para la elaboración de los sistemas, pudiendo abarcar desde meses hasta años (Gopferich 1996, Wang, Wu et al. 2000, Herrero-Vanrell and Refojo 2001, Wu and Wang 2001, Wu 2004, Makadia and Siegel 2011). El agente encapsulado dentro de estos dispositivos es liberado como consecuencia de los procesos de hidrólisis, entre otros, que provocan la ruptura de las cadenas poliméricas dando lugar a la erosión del sistema (Park 1995). El empleo de polímeros de diferentes pesos moleculares o el uso de distintas proporciones de PLA o PGA en el caso del copolímero, permite la modulación de la velocidad de liberación del agente activo (Kuno and Fujii 2010, Lee, Hughes et al. 2010, Yasukawa, Tabata et al. 2011). Los implantes desarrollados con polímeros hidrofóbicos han demostrado ser eficaces en la liberación de diferentes tipos de fármacos: antivirales, antifúngicos, esteroides o inmunosupresores (Hashizoe, Ogura et al. 1997, Miyamoto, Ogura et al. 1997, Mello-Filho, Guven et al. 2009, Shin, Park et al. 2009, Morrison and Khutoryanskiy 2014, Whitcup and Robinson 2015). Dentro de los implantes biodegradables comercializados cabe destacar Ozurdex® (Allergan Inc.) que fue el primer implante biodegradable aprobado por la FDA para el tratamiento del edema macular causado por oclusión venosa retiniana (2009), para el tratamiento de uveítis no infecciosa (2010) y edema macular diabético (2014). Actualmente, también está aprobado su uso por la EMA. Ozurdex® es un implante matricial basado en la tecnología Novadur™, elaborado con el polímero PLGA y que contiene dexametasona (700 µg, antiinflamatorio esteroideo). Este implante libera el principio activo al menos durante 6 meses y su principal ventaja es que puede ser inyectado mediante un aplicador que tiene incorporada una aguja de calibre 22 G (Bansal, Gupta et al. 2015, Jimenez-Gomez, Gonzalez-Montpetit et al. 2015, Kuo, Chen et al. 2015, Yap, Papathomas et al. 2015).

No obstante, también existen otros implantes intravítreos basados en la tecnología Novadur™, como por ejemplo un implante intravítreo elaborado con brimonidina, un potente y selectivo agonista alfa-adrenérgico que induce la liberación de varias neurotrofinas como BDNF, CNTF y el factor de crecimiento fibroblástico (b-FGF) (Kuno and Fujii 2010, Lee, Hughes et al. 2010). Se está evaluando su utilidad para el tratamiento de la DMAE, la retinopatía óptica glaucomatosa y la retinosis pigmentaria, con ensayos clínicos en fase II ya concluidos (NCT00693485, NCT00972374, NCT00658619).

4.2. Liposomas

Los liposomas son estructuras esféricas que se forman espontáneamente cuando los lípidos formadores, una vez disueltos, se dispersan en un medio acuoso formando bicapas lipídicas (Bangham, Standish et al. 1965). Su composición está íntimamente relacionada con la de las membranas celulares ya que los lípidos que las constituyen se caracterizan por presentar una parte polar (cabeza) y otra parte hidrófoba (cola), que les confieren propiedades anfifílicas. Su parte polar puede ser no iónica o estar cargada positiva o negativamente. Suele ser un fosfo o glicogrupos esterificados, que da lugar a diferentes lípidos polares. La parte apolar consiste normalmente en una o dos cadenas de ácidos grasos de 14-18C de longitud, saturados o insaturados (de 1 a 4 dobles enlaces). Los lípidos pueden contener también un «grupo esqueleto» que sirve de puente entre la parte polar y la apolar que generalmente se trata de glicerol o esfingosina, y da lugar a los denominados glicerolípidos y esfingolípidos. Su estructura depende de la naturaleza química, longitud y grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas presentes, el pH y la carga iónica de la fase acuosa. Los fosfolípidos pueden ser de origen natural o sintético. Dentro de los de origen natural destacan los procedentes del huevo y de la lecitina de soja (p.ej. fosfatidilcolina, fosfatidilserina y glicerofosfocolina) por ser los más utilizados. Por su parte, los derivados de la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, y fosfolípidos conjugados con polietilenglicol (PEG) son los fosfolípidos sintéticos más empleados (Maruyama, Yuda et al. 1992, Lin, Ko et al. 1996, Gabizon,

Horowitz et al. 2003). La composición de los liposomas influye de manera decisiva en su eficacia y estabilidad. Además las vesículas lipídicas incluyen generalmente aditivos tales como colesterol, con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de la bicapa y antioxidantes (p.ej. α -tocoferol y ácido ascórbico) que protegen los fosfolípidos de la oxidación (Liebler, Kling et al. 1986, Niki, Noguchi et al. 1995). Durante el proceso de formación, los liposomas son capaces de captar principios activos en su fase acuosa o lipídica: las moléculas altamente polares y relativamente pequeñas son atrapadas en el compartimiento acuoso, las moléculas no polares se intercalan entre las bicapas, y las anfifílicas se fijan a la vesículas a través de su resto lipófilo (Figura 18) (Mishra, Bagui et al. 2011).

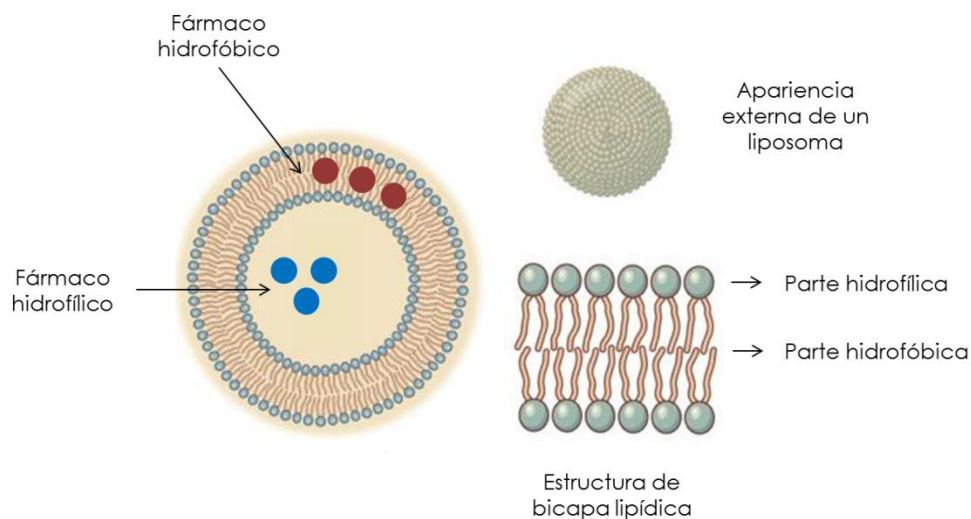


Figura 18. Representación esquemática de la estructura de un liposoma y la incorporación de fármacos en su interior. Ilustración adaptada de [<http://www.encyclopediasalud.com>].

Estas vesículas coloidales presentan un tamaño comprendido entre 10 nm y algunas micras (10 μ m) y están constituidas por uno o varios espacios acuosos, encerrados en un número igual de lamelas o bicapas fosfolipídicas (Figura 19). De acuerdo a su tamaño, morfología y el número de bicapas que los conforman los liposomas se clasifican en:

-Vesículas unilaminares pequeñas (SUV) (20-200 nm de diámetro): Están formadas por una única bicapa. Debido a su elevado radio de curvatura, una alta proporción de fosfolípidos se encuentra en la monocapa externa. Presentan una importante relación superficie/lípido. Debido a su bajo porcentaje de encapsulación, no están recomendados para incorporar moléculas hidrosolubles.

-Vesículas unilaminares grandes (LUV) (>200 nm de diámetro): Están formadas por una única bicapa y dado su tamaño, presentan una elevada capacidad de encapsulación. El elevado volumen del compartimiento interno permite la encapsulación de moléculas hidrosolubles.

-Vesículas multilaminares (MLV) (>500 nm de diámetro): Están formadas por varios compartimentos acuosos concéntricos. La distancia entre las capas lipídicas es función de la naturaleza de la pared y condiciona el volumen de las capas acuosas. Estas capas se forman cuando el fosfolípido es suspendido y sometido a agitación en un exceso de solución acuosa.

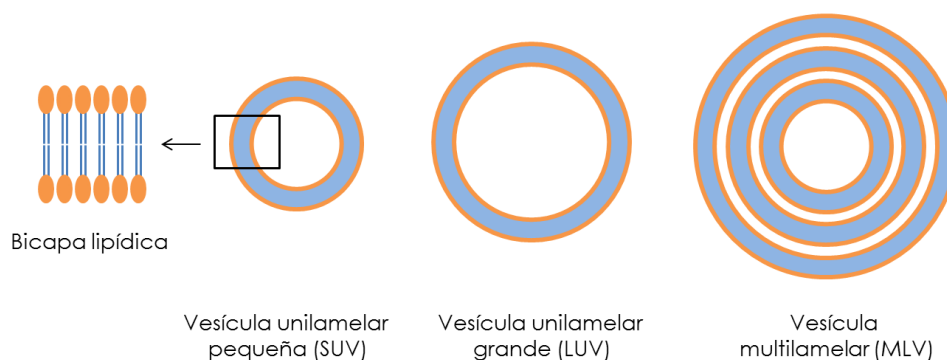


Figura 19. Representación esquemática de la estructura de los distintos tipos de liposomas. Figura adaptada del trabajo: *Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview* (Herrero-Vanrell, Vicario de la Torre et al. 2013).

En terapia oftálmica la eficacia de los liposomas como sistemas de liberación controlada depende de una serie de factores como son la eficacia de encapsulación de la sustancia activa, el tamaño, la carga superficial de las vesículas, la distribución del agente activo en los sistemas y la estabilidad de

los mismos (Elorza, Elorza et al. 1993, Mishra, Bagui et al. 2011). Estos nanosistemas encapsulan moléculas utilizadas para el tratamiento de vitreorretinopatías que pueden ser liberadas de forma controlada en el lugar de acción. Además protegen moléculas frágiles y pueden mejorar la estabilidad del principio activo en los fluidos biológicos además de reducir la toxicidad a nivel de la retina (Bochot and Fattal 2012). Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que presentan estos sistemas, tienen un uso terapéutico limitado debido principalmente a su corto periodo de conservación, su baja estabilidad en medios acuosos y la dificultad de esterilización (Mishra, Bagui et al. 2011). La administración de liposomas para el tratamiento de patologías del segmento posterior, se centra fundamentalmente en la protección y la orientación de la sustancia activa hacia el tejido diana con el fin de mejorar su efecto terapéutico (Bourges, Touchard et al. 2007, Mishra, Bagui et al. 2011). En la actualidad, una formulación liposomal en uso clínico es Visudyne® (Novartis Pharmaceuticals, USA), cuyo principio activo, la verteporfina es empleado en terapia fotodinámica por vía intravenosa para el tratamiento de la neovascularización corooidal y la DMAE (Eljarrat-Binstock, Pe'er et al. 2010).

4.3. Micro- y nanopartículas

El desarrollo de sistemas de liberación controlada de sustancias activas surge ante la necesidad de mantener concentraciones eficaces del fármaco en los tejidos diana durante periodos prolongados de tiempo. Así, el tratamiento puede realizarse en una única inyección o al menos con administraciones separadas en el tiempo. En la actualidad, las micro- y nanopartículas se postulan como sistemas versátiles para el tratamiento de patologías oftálmicas. Este tipo de estructuras permiten la encapsulación de sustancias activas en su interior. La principal diferencia entre ambos sistemas radica en el tamaño. Las nanopartículas poseen un tamaño comprendido entre 1-1000 nm, mientras que las micropartículas tienen tamaños entre 1-1000 µm. Desde el punto de vista estructural, se pueden clasificar en dos categorías: micro- y nanocápsulas o micro- y nanoesferas. Las micro- y nanocápsulas son

sistemas reservorio que están formados por una cavidad central sólida, líquida o semisólida, donde se encuentra el principio activo, rodeada de una cubierta polimérica. Las micro- y nanoesferas son sistemas matriciales en los que la sustancia activa se encuentra dispersa de forma uniforme, generalmente en un entramado polimérico (Figura 20). Ambos sistemas permiten transportar sustancias activas de distinta naturaleza, tanto hidrofílicas como lipofílicas. Aunque el potencial de las nanopartículas de mayor tamaño para la liberación controlada se haya demostrado, las micropartículas ofrecen mejores resultados si se pretende una liberación del fármaco durante largos periodos de tiempo. Tras la administración a través una inyección, las micropartículas quedan retenidas cerca del lugar de administración, donde liberan progresivamente la sustancia contenida en su interior (Yasukawa, Tabata et al. 2011, Kompella, Amrite et al. 2013, Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014).

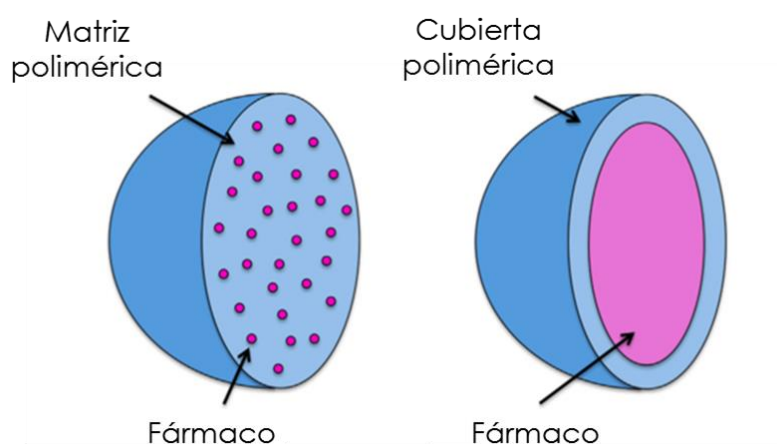


Figura 20. Representación esquemática de la estructura de una micro- o nanoesfera (A) y una micro- nanocápsula (B) y la incorporación de fármacos en su interior.

Para la elaboración de nano- y micropartículas destinadas a la administración de agentes terapéuticos por vía intraocular se pueden emplear una gran variedad de materiales tanto de origen natural como sintético. En general se prefiere el empleo de polímeros biodegradables tales como gelatina, albúmina, poliortoésteres, polianhídridos y poliésteres, ya que desaparecen del lugar de administración (Herrero-Vanrell, Vicario de la Torre

et al. 2013). Una de las mayores ventajas de estos sistemas es su fácil administración ya que se puede llevar a cabo mediante la inyección de una suspensión del sistema en un vehículo apropiado, a través de una aguja o cánula cuyo diámetro se selecciona en función del tamaño de las partículas y la vía de administración empleada (intravítrea o periorcular, Figura 21) (Herrero-Vanrell and Refojo 2001, Yasukawa, Tabata et al. 2011, Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014). Los vehículos utilizados para la preparación de la suspensión son soluciones fisiológicas biocompatibles con el organismo.

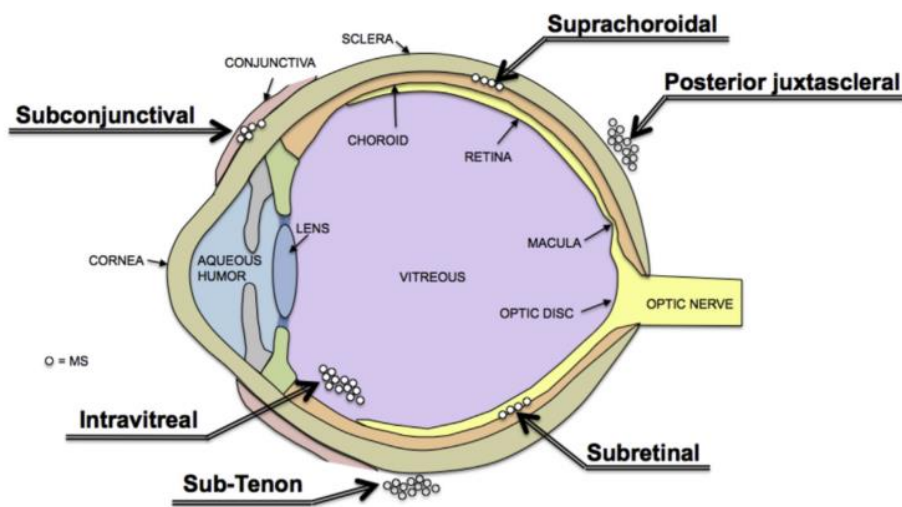


Figura 21. Vías de administración de microesferas para el tratamiento de patologías de la retina y otras enfermedades oculares. Imagen tomada del trabajo de revisión titulado: *The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases* (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014).

Teniendo en cuenta el potencial de los sistemas nano- y microparticulares en el tratamiento de enfermedades crónicas que afectan al segmento posterior del ojo, es importante conseguir una adecuada eficacia de encapsulación, controlar el tamaño de partícula y la velocidad de liberación del principio activo, mantener la bioactividad de las moléculas activas durante el proceso de elaboración, poder desarrollar una fabricación a gran escala y preparar formulaciones estériles a fin de obtener un sistema

óptimo (Thrimawithana, Young et al. 2011). Tal y como se ha mencionado anteriormente, tras la administración intravítrea de nano- y micropartículas estos sistemas van a tener un comportamiento diferente en función de su tamaño. Lejos de interferir o limitar la visión, las micropartículas de tamaño superior a 2 μm , tienden a sedimentar por acción de la gravedad, mientras que las nanopartículas son capaces de difundir rápidamente, localizándose en el interior de los tejidos oculares. Las micropartículas también pueden agregarse, formando un depósito capaz de ceder la sustancia activa durante periodos más prolongados al disminuir la superficie específica (Hsu 2007, Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014). Las nano- y microesferas han sido ampliamente estudiadas como herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades vitreoretinianas en modelos animales. Algunos ejemplos de sistemas microparticulares cargados con diferentes sustancias activas se muestran en la Tabla 1.

Patología	Sustancia activa	Ruta de administración	Estudios	Referencia
Vitreorretinopatía proliferativa	Adriamicina	Intravítrea	Conejos	(Moritera, Ogura et al. 1992)
	Ácido retinoico	Intravítrea	Conejos	(Giordano, Refojo et al. 1993)
Uveítis	Ciclosporina	Intravítrea	Conejos	(He, Liu et al. 2006)
	Dexametasona	Intravítrea	Conejos	(Barcia, Herrero-Vanrell et al. 2009)
Edema macular	Acetónido de Triamcinolona	Intravítrea	Humanos	(Cardillo, Souza-Filho et al. 2006)
Necrosis Retinal Aguda	Aciclovir	Intravítrea	Conejos	(Conti, Bucolo et al. 1997)
	Guanosina	Intravítrea	Conejos	(Chowdhury and Mitra 2000)
Retinosis por citomegalovirus	Ganciclovir	Intravítrea	Conejos	(Duvvuri, Janoria et al. 2007)
Neovascularización coroidal	PKC412 (inhibidor kinasa)	Periocular	Cerdos	(Saishin, Silva et al. 2003)
Glaucoma	GDNF	Intravítrea	Ratas	(Jiang, Moore et al. 2007)
	GDNF/Vit E	Intravítrea	Ratas	(Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011)
Retinosis Pigmentaria	TUDCA	Intravítrea	Ratas	(Herrero-Vanrell, Fernández-Sánchez et al. 2011)
Retinosis pigmentaria	rhGDNF	Intravítrea	Ratones	(Andrieu-Soler, Aubert-Pouessel et al. 2005)
Medicina Regenerativa	Co-trasplante de CPR y MMP2	Subretiniana y Co-trasplante	Ratones	(Yao, Tucker et al. 2011)

Tabla 1. Resumen de microesferas para el tratamiento de patologías de la retina y otras enfermedades oculares. Tabla tomada del trabajo de revisión titulado: *The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases* (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014).

También se han desarrollado formulaciones nanoparticulares para el tratamiento de distintas afecciones del segmento posterior del ojo como nanopartículas de PLGA cargadas con dexametasona para el tratamiento de la neovascularización coroidea (Xu, Wang et al. 2007) o cargadas con tamoxifeno para el tratamiento de uveoretinitis (de Kozak, Andrieux et al. 2004). En esta misma línea, Patel et al, desarrollaron un sistema nanoparticular basado en copolímeros pentabloque biodegradables para la liberación controlada de proteínas como IgG o bevacizumab en el segmento posterior del ojo (Patel, Vaishya et al. 2015). Yandrapu et al. también encapsularon bevacizumab en sistemas de nanopartículas en micropartículas porosas de PLA, obteniendo en sus experimentos liberaciones de hasta 4 meses (Yandrapu, Upadhyay et al. 2013).

Por su parte, la tecnología recombinante de ARN, ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de enfermedades oculares. En este sentido, el RNA puede ser encapsulado en dispositivos a nanoescala, lo que ofrece una alternativa tecnológica muy interesante. Recientemente, Feng et al. han estudiado la distribución y el aclaramiento en córnea y retina de nanopartículas de ARN administradas mediante inyección subconjuntival. Estos estudios, realizados en ratones, mostraron la presencia de ARN en esclera, córnea, conjuntiva y retina. Sus resultados sugieren que el ARN, administrado en el segmento posterior del ojo, puede ser útil para el tratamiento de las enfermedades neovasculares del segmento posterior (Feng, Li et al. 2014). Otra alternativa, es el empleo de vectores no virales, como las nanopartículas basadas en lípidos (complejo liposoma-protamina-ADN [LPD]), para administrar un gen funcional en la retina. Sin embargo, una de las limitaciones de este tipo de complejos, es la falta de especificidad celular. Si el mismo gen se expresa en múltiples tipos de células o está ausente en el tipo celular deseado, el suministro de genes mediados por LPD a cada célula puede tener efectos no deseados. No obstante, se ha publicado recientemente, que si se emplean promotores específicos de células, las nanopartículas basadas en lípidos pueden entregar genes a células específicas de la retina, lo que permitiría dirigir la expresión de una manera específica (Wang, Rajala et al. 2016).

En base a lo anteriormente expuesto, se postula que los sistemas nanoparticulares pueden ser orientados más hacia la vectorización, y las micropartículas, para la liberación de sustancias activas durante periodos prolongados de tiempo.

5. Neuroprotección ocular

La neuroprotección es la preservación relativa de la estructura y/o función neuronal (Casson, Chidlow et al. 2012). Se trata de la terapia basada en prevenir, limitar y, en algunos casos, revertir la degeneración o muerte de las células neuronales mediante el bloqueo de los mecanismos que la desencadenan, independientemente de cuál haya sido el daño primario (Cheung, Guo et al. 2008, Baltmr, Duggan et al. 2010, Nucci, Strouthidis et al. 2013). El concepto de neuroprotección está íntimamente ligado con el de neurodegeneración, proceso que puede describirse cronológicamente en tres etapas: (1) daño axonal primario; (2) muerte de la neurona dañada, y (3) daño y posterior muerte de neuronas adyacentes, en lo que se denomina "degeneración secundaria". Este proceso de degeneración secundaria ocurre en células neuronales que inicialmente no estaban dañadas, pero que, debido a la exposición a agentes citotóxicos que han ido liberando las neuronas con daño axonal primario, terminan muriendo. A nivel ocular, tanto las células ganglionares de la retina (CGR) como los fotorreceptores son susceptibles de sufrir este proceso (Wert, Lin et al. 2014). En este sentido, la neuroprotección se basa en la protección de las células neuronales susceptibles de sufrir "degeneración secundaria" y resulta útil incluso cuando se desconoce la causa inicial de la enfermedad (Ritch 2005). Es importante recalcar que la neuroprotección no debe entenderse exclusivamente como la protección de las células nerviosas dañadas o susceptibles de daño, sino que incluye la restauración de la fisiología normal a este nivel (Payne, Kaja et al. 2013).

Algunas patologías oculares como la retinosis pigmentaria, la degeneración macular asociada a la edad, el glaucoma o la retinopatía

diabética se producen por la muerte por *apoptosis* de las células de la retina. El término apoptosis se describe como una muerte celular programada que se activa cuando una célula deja de ser necesaria o ha sido lesionada de forma severa (Kerr, Wyllie et al. 1972). Frente a la muerte accidental de las células debida a una lesión aguda, la muerte celular programada es un proceso activo que se caracteriza por una alteración morfológica. Estos cambios morfológicos producidos durante la apoptosis incluyen: fragmentación del ADN cromosómico, condensación de la cromatina, acidificación del citoplasma y ruptura del núcleo. Finalmente, la célula se encoge y se rompe en fragmentos rodeados por membranas denominados cuerpos apoptóticos. Las células apoptóticas son reconocidas y fagocitadas por macrófagos (microglía en el SNC, (McCarthy, Widdop et al. 2013)) o células adyacentes, y son retiradas de los tejidos de forma eficaz (Cohen 1993, Platt, da Silva et al. 1998). Los inductores de la apoptosis son de naturaleza diversa y tanto señales intracelulares como extracelulares pueden desencadenar la misma (Thompson 1995). En esta línea, las caspasas son moléculas que juegan un papel esencial en este proceso de muerte programada, por lo que su regulación es fundamental a la hora de determinar la supervivencia celular. Generalmente, dicha supervivencia se encuentra promovida por la puesta en marcha de vías de señalización que dependen de factores de crecimiento extracelulares (como por ejemplo los factores neurotróficos) o de interacciones célula-célula, que a su vez desencadenan la inhibición del proceso de apoptosis (Nunez, Benedict et al. 1998, Thornberry and Lazebnik 1998).

En el caso de las células fotorreceptoras, estas mueren cuando se separan físicamente del Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR) y la coroides, estructuras que proporcionan soporte metabólico y vascular a las capas más externas de la retina. Aunque las causas y las características clínicas propias de cada patología de la retina que cursa con muerte de fotorreceptores son distintas (DMAE, RP o RD), las vías moleculares que conducen a la misma parecen ser compartidas al menos en parte. Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto que la activación de distintos tipos de caspasas en la cascada de señalización conduce a la apoptosis de los fotorreceptores ante

un daño, sin embargo, muchos de los mecanismos que desencadenan el proceso todavía no están claros. Por lo tanto, la identificación de los mecanismos implicados en la muerte celular de fotorreceptores será fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias para tratamiento de estas patologías (Murakami, Notomi et al. 2013).

Por su parte, el proceso apoptótico en las células ganglionares de la retina, es ampliamente conocido y se activa como se comentó anteriormente cuando la célula no es necesaria por más tiempo o cuando ha sido lesionada de forma severa. Este "suicidio celular" codificado genéticamente puede ocurrir tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La apoptosis fisiológica tiene dos funciones principales, por un lado, es una la regulación del número de células durante el desarrollo. Por ejemplo, cuando las células ganglionares no son capaces de llevar a cabo la sinapsis con los núcleos del ganglio geniculado lateral, son eliminadas mediante esta vía. Por otro lado se trata también de un mecanismo de homeostasis que regula el recambio celular normal. En cuanto a la apoptosis en condiciones patológicas, ésta se ve activada de forma inapropiada en enfermedades neurodegenerativas. No obstante, es posible que en el desarrollo de patologías neurodegenerativas oftálmicas, existan diferentes procesos degenerativos en los distintos compartimentos de las CGR, por lo que el abordaje terapéutico en este sentido puede realizarse de forma muy diversa. Hasta la fecha, sin embargo, la mayoría de las terapias se han centrado en rescatar los somas de las CGR. (Howell, Soto et al. 2013).

A continuación se muestran las diferentes estrategias neuroprotectoras que se barajan en la actualidad:

5.1. Terapia farmacológica

Entendemos por terapia farmacológica aquella en la que se administran moléculas activas (fármacos, neurotrofinas, agonistas, etc.) para aumentar la supervivencia celular (Chidlow, Wood et al. 2007). Las diferentes

líneas terapéuticas que se detallan a continuación se han establecido en función de los mecanismos que desencadenan la apoptosis en las CGR y/o en los fotorreceptores.

5.1.1. Prevención de la excitotoxicidad inducida por glutamato

El glutamato es un aminoácido esencial que actúa como principal neurotransmisor excitador de la retina. Es por tanto un mediador de la transmisión de señales desde los fotorreceptores a las células bipolares y las CGR. Sin embargo, cuando sus niveles se encuentran anormalmente elevados, puede producirse un fenómeno denominado excitotoxicidad que conduce a la muerte neuronal. Cuando las concentraciones de glutamato son muy elevadas, se produce una hiperestimulación de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), que a su vez abren los canales de Ca^{2+} y Na^{+} presentes en las células, aumentando la concentración de ambos iones a nivel intracelular. Este aumento conduce a la formación de radicales libres de oxígeno (ROS) y la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial, que desencadena la liberación del citocromo C y la posterior activación de caspasas involucradas en la apoptosis (Lucas and Newhouse 1957, Cheung, Guo et al. 2008, Baltmr, Duggan et al. 2010, Fang, Jiang et al. 2012, Bai, Aida et al. 2013). La excitotoxicidad inducida por glutamato puede ser prevenida mediante la administración de antagonistas de los receptores NMDA, entre los que destacan la memantina y la dizocilpina (MK801).

La memantina (1-amino-3,5-dimetiladamantano), es un derivado de la amantadina. Su estructura se compone de tres anillos, un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y dos grupos metilo ($-\text{CH}_3$) que son responsables de prolongar el tiempo de residencia y la afinidad de la memantina por su receptor (Figura 22). En determinadas condiciones patológicas, las neuronas que han sufrido un daño liberan glutamato. Este neurotransmisor actúa sobre los receptores NMDA ubicados en las neuronas próximas, que a su vez activan canales iónicos, que permanecen abiertos demasiado tiempo, permitiendo la entrada de Ca^{2+} . Como consecuencia del aumento de Ca^{2+} intracelular, las células se hinchan

y se rompen, liberando el glutamato que almacenan. Este glutamato estimula a su vez los receptores de NMDA cerrando un círculo vicioso cuyo resultado final es la muerte de la neurona en el área afectada (Lipton 2004, Ishikawa, Yoshitomi et al. 2014). La memantina actúa en condiciones patológicas de sobreexcitación, cuando el exceso de glutamato en el espacio intersináptico induce la apertura del canal iónico con la entrada masiva de Ca^{2+} al interior (Cheung, Guo et al. 2008, Ju, Kim et al. 2015). La memantina fue aprobada por la FDA en 2003 para el tratamiento del Alzheimer (Cosman, Boyle et al. 2007) y también ha demostrado ser eficaz en la enfermedad de Parkinson (Stubendorff, Larsson et al. 2014, Wesnes, Aarsland et al. 2015, Wictorin and Widner 2015). Además, es el único agente neuroprotector que ha llegado a completar la fase III de dos ensayos clínicos aleatorizados en pacientes con glaucoma (NCT00168350, NCT00141882). Sin embargo, aunque la progresión de la enfermedad fue menor en pacientes que recibían altas dosis de memantina respecto a los que recibían dosis menores, no demostró un efecto superior frente al placebo. Este hecho se atribuyó a que probablemente este fármaco actúa sólo en un número determinado de CGR con una determinada densidad de receptores NMDA, mientras que la apoptosis podría producirse en otras células ganglionares por otros mecanismos (Osborne 2009, Baltmr, Duggan et al. 2010, Dahlmann-Noor, Vijay et al. 2010).

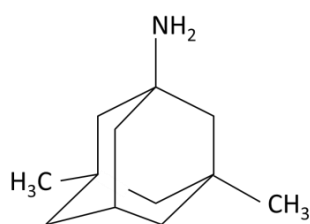


Figura 22. Estructura química de la memantina.

El MK801 o maleato de dizocilpina (5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] cicloheptan-5,10-imina), es otro antagonista no competitivo de los receptores NMDA que ha demostrado su efecto neuroprotector tanto *in vitro*, protegiendo las CGR (Tsuda 2004) como *in vivo*, en modelos experimentales de daño del

nervio óptico (Russelakis-Carneiro, Silveira et al. 1996) e hipertensión ocular (Chaudhary, Ahmed et al. 1998). Sin embargo, dados sus efectos neurotóxicos, el MK801 no puede ser utilizado en la práctica clínica. Esto es debido a su elevada afinidad por los receptores NMDA y el tiempo de permanencia de la unión. Este hecho, provoca la acumulación de MK801 en los canales bloqueando las funciones fisiológicas (Cheung, Guo et al. 2008, Baltmr, Duggan et al. 2010, Baltmr, Duggan et al. 2010, Kwong, Quan et al. 2011, Omodaka, Nishiguchi et al. 2014).

5.1.2. Prevención de la disfunción mitocondrial

Cuando la función mitocondrial se ve alterada, se produce una disminución del potencial de membrana que conlleva un incremento en la permeabilidad de esta. Este hecho está implicado en la apoptosis de las CGR (Almasieh, Wilson et al. 2012). Estudios previos confirman que factores como el estrés oxidativo, la hipoxia y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), pueden desencadenar disfunción mitocondrial mediante la producción de ROS, cuyos niveles neurotóxicos inducen la muerte celular (Cheung, Guo et al. 2008, Baltmr, Duggan et al. 2010, Almasieh, Wilson et al. 2012). En este contexto, la disfunción mitocondrial puede ser prevenida por varios agentes capaces de evitar la apoptosis de las CGR. Entre este tipo de compuestos se encuentran la eritropoyetina, el ácido lipoico, el tracolimus (FK506) o la Coenzima Q₁₀ (Tsai, Song et al. 2007, Zhong, Bradley et al. 2007, Koriyama, Nakayama et al. 2013, Choi, Kim et al. 2015, Song, Huang et al. 2015). De todos ellos, la Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) o ubiquinona, presenta un gran potencial como neuroprotector, ya que juega un papel crucial en el metabolismo energético. La CoQ₁₀ (1,4-benzoquinona; Figura 23) es un cofactor presente en la mayoría de las células eucariotas que se localiza principalmente en la mitocondria. Forma parte de la cadena de transporte de electrones desde el complejo I y II hasta el complejo III y participa en la respiración celular aeróbica, facilitando la producción de ATP. Presenta tres estados redox: totalmente oxidado (ubiquinona), semiquinona (ubisemiquinona), y totalmente reducido (ubiquinol), hecho que le permite desempeñar sus funciones dentro de la cadena de transporte de

electrones y como antioxidante (Crane 2001). A nivel ocular, la CoQ₁₀ ha demostrado su efecto neuroprotector en patologías como el glaucoma y en la prevención de la apoptosis de las CGR, tanto *in vitro* como *in vivo* (Russo, Cavaliere et al. 2008, Lee, Kim et al. 2014, Lee, Shim et al. 2014, Parisi, Centofanti et al. 2014). También ha demostrado ser efectiva en otras patologías neurodegenerativas tales como el Parkinson, el Alzheimer o la enfermedad de Huntington (Teixeira, Silva et al. 2013, Li, Wang et al. 2015, Shannon and Fraint 2015, Yang, Zhang et al. 2015).

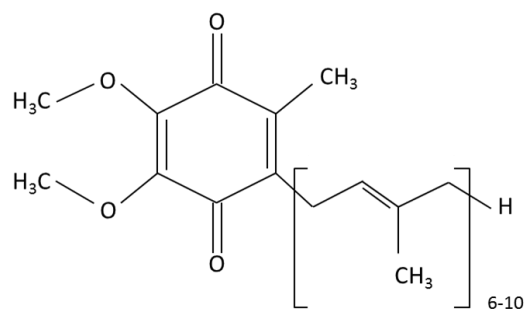


Figura 23. Estructura química de la Coenzima Q₁₀.

5.1.3. Prevención de los procesos oxidativos

El estrés oxidativo juega un papel esencial en la degeneración de las células neuronales de la retina. El término de estrés oxidativo hace referencia a la situación en la cual la producción de radicales libres de oxígeno alcanza niveles muy elevados (patológicos), de tal forma que la capacidad antioxidante de la célula es insuficiente para poder protegerse frente al daño oxidativo. Por ejemplo, la isquemia, que se produce generalmente por una disfunción a nivel vascular, produce alteraciones en la autorregulación del flujo sanguíneo a nivel ocular y fluctuaciones en la perfusión de la cabeza del nervio óptico. Estas situaciones pueden desencadenar estrés oxidativo, que a su vez activa los mecanismos de muerte celular en las CGR, y también provoca daños en la malla trabecular, la cabeza del nervio óptico y la retina

(Cheung, Guo et al. 2008, Baltmr, Duggan et al. 2010, Dahlmann-Noor, Vijay et al. 2010, Almasieh, Wilson et al. 2012). A nivel ocular la retina es particularmente susceptible de sufrir estos procesos de oxidación debido a diversas razones:

(1) Los fotorreceptores y las CGR son células ricas en ácidos grasos poliinsaturados, por tanto, altamente susceptibles de sufrir peroxidación lipídica. Además, los procesos metabólicos, la degradación de oxígeno y la síntesis de ATP están aumentados en estas células, mientras que la velocidad de regeneración celular está disminuida.

(2) La coroides es una capa altamente vascularizada lo que aporta una elevada concentración de oxígeno a la retina. Este hecho puede favorecer la peroxidación, cuando el flujo sanguíneo está mal regulado (debido a un exceso de vasodilatadores y un defecto de vasoconstrictores) y existe una baja cantidad de antioxidantes en el organismo.

(3) En la fovea, dada la elevada densidad celular la actividad metabólica se ve incrementada, lo que hace que sea más probable la aparición de estrés oxidativo.

(4) En la retina existen compuestos fotosensibilizadores que estimulan la generación de radicales libres.

En estas condiciones, es fácil deducir que la retina posee un ambiente pro-oxidativo. Por esta razón, tanto la retina como el epitelio pigmentario de la retina tienen su propio sistema antioxidante de protección, compuesto fundamentalmente por vitaminas (vitaminas C y E) y carotenoides (luteína y zeaxantina) (Lien and Hammond 2011). Por lo tanto, la estrategia terapéutica para combatir el estrés oxidativo en aquellas patologías de la retina y del nervio óptico que cursan con la muerte de CGR y fotorreceptores, se centra en muchas ocasiones en la administración de agentes antioxidantes. Ejemplos de este tipo de compuestos son la melatonina, el EGb761 y la vitamina E.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona que se encuentra de forma natural en el cuerpo humano. Presenta un potente carácter antioxidante, atenuando el daño celular causado por los radicales

libres que se ha visto tanto en las CGR (Kaur, Sivakumar et al. 2013) como en los fotorreceptores (Marchiafava and Longoni 1999). Además, la melatonina ha demostrado su potencial como neuroprotector incrementado la supervivencia de las CGR en un modelo experimental de rata con isquemia (Park, Lee et al. 2012) y también en las células fotorreceptoras en un modelo de ratón rd1/rd1 (Liang, Aleman et al. 2001). Además de esta actividad antioxidante, esta neurohormona presenta distintas funciones. Dentro de estas, se pueden destacar las siguientes: protección de la ruptura de las cadenas de ADN, reducción de la apoptosis inducida por NO, protección de neuronas frente al daño inducido por el ácido kaínico (potente excitotoxina) e inhibición de la liberación de Citocromo C desde la mitocondria (Baltmr, Duggan et al. 2010, Agorastos and Huber 2011). Dada la importancia en esta tesis doctoral de la melatonina, este apartado será desarrollado con más detalle posteriormente.

El extracto procedente de las hojas de Ginkgo Biloba (EGb761) está constituido mayoritariamente por flavonoides (24%) y terpenoides (6%). Es capaz de inhibir la apoptosis inducida químicamente y es un antiagregante plaquetario, presentando también propiedades antiinflamatorias y vasomoduladoras sobre los vasos sanguíneos (incrementa la velocidad del flujo sanguíneo a nivel ocular) (Baltmr, Duggan et al. 2010, Cybulska-Heinrich, Mozaffarieh et al. 2012). El EGb761 ha demostrado tener efecto neuroprotector sobre las CGR que han sido avaladas por numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* (Ahlemeyer and Krieglstein 2003, Hirooka, Tokuda et al. 2004, Cybulska-Heinrich, Mozaffarieh et al. 2012). Además también ha demostrado su capacidad para el rescate funcional de los fotorreceptores (Ranchon, Gorrand et al 1999). Su acción se debe principalmente a la capacidad antioxidante que presentan los flavonoides, neutralizando los ROS. De este modo, las membranas vuelven a ser permeables favoreciendo la captación de glucosa, normalizando el consumo de oxígeno y se aumentando la síntesis de ATP. Además el EGb761 también está implicado en la modulación de la transducción de señales en distintas vías apoptóticas (reduce la transducción de señales dependientes de Ca^{2+} e inhibe la actividad de la proteína kinasa C) e incluso actúa a nivel de

los receptores de NMDA de glutamato (Bastianetto, Zheng et al. 2000, Hirooka, Tokuda et al. 2004).

La vitamina E o α -tocoferol es una vitamina liposoluble que actúa como antioxidante y secuestrador de radicales libres a nivel celular. Ha demostrado actividad en diferentes enfermedades de la retina en las que se produce, entre otros, estrés oxidativo (Engin 2009). La vitamina E será descrita con mayor detalle posteriormente.

5.1.4. Prevención de la agregación proteica

El plegamiento de las proteínas depende tanto de su secuencia de aminoácidos como de la maquinaria presente en la célula. Los eventos de plegamientos anómalos (conocidos en inglés como *protein misfolding*) desembocan en la agregación de proteínas en tejidos específicos y han sido asociados a muchas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington o el glaucoma, entre otras. Durante el desarrollo de patologías neurodegenerativas, las proteínas implicadas en el proceso pueden sufrir fenómenos de autoensamblaje, que dan lugar a estructuras fibrilares en forma de agregados proteicos. Estos agregados alteran la funcionalidad de estas proteínas, provocando toxicidad y muerte celular. Se han propuesto múltiples mecanismos por los cuales los agregados proteicos conducen a la toxicidad celular incluyendo la pérdida de la función normal de la proteína, la ganancia en toxicidad de las nuevas conformaciones y la inducción de procesos inflamatorios (Baltmr, Duggan et al. 2010, Almasieh, Wilson et al. 2012). Los agregados proteicos o "amiloides" se componen de diferentes proteínas, siendo la más habitual la proteína β -amiloide. A nivel estructural, las proteínas presentes en este tipo de organizaciones se caracterizan por tener plegamiento del tipo β , favoreciendo la hidrofobicidad y la agregación en estructuras específicas denominadas hoja β -plegada. Esta disposición conformacional, confiere a las proteínas resistencia a la proteólisis, la desnaturalización y a los mecanismos generales de eliminación presentes en la célula (Blake, Serpell et al. 1996, Soto 2003). La alteración de la proteína β -

amiloide se ha demostrado en patologías oftálmicas como el glaucoma y la DMAE (Guo, Salt et al. 2007, Salt, Nizari et al. 2014, Ratnayaka, Serpell et al. 2015, Zhao, Gao et al. 2015). Por otro lado existen un grupo de chaperonas denominadas proteínas de choque térmico (HSP), normalmente expresadas en cantidades pequeñas, que también están relacionadas con los procesos neurodegenerativos. En pacientes glaucomatosos, sus niveles se encuentran elevados como mecanismo de respuesta celular frente a situaciones de estrés oxidativo (Tezel, Hernandez et al. 2000, Guo, Salt et al. 2007, Chidlow, Wood et al. 2014). La estrategia terapéutica empleada para evitar la agregación proteica típica en patologías neurodegenerativas, consiste en la administración de compuestos que actúen directamente sobre las proteínas involucradas (β -amiloide y HSP). Dentro de este grupo de terapias se encuentran los inhibidores β amiloides (rojo congo o anticuerpos anti- β amiloide) y los inhibidores de la enzima β secretasa (Z-VLLCHO), que han demostrado tener actividad neuroprotectora, disminuyendo la apoptosis de las CGR tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, se ha observado que la triple terapia combinando un inhibidor de la enzima β secretasa, rojo congo y un anticuerpo anti- β amiloide , posee un efecto neuroprotector superior en un modelo de rata con hipertensión ocular comparado con el tratamiento de estos compuestos por separado (Guo, Salt et al. 2007).

5.1.5. Modulación de la inflamación

Se sabe que en la muerte de las células neuronales de la retina está implicado el mecanismo inmune. Además, algunas investigaciones señalan la implicación de la microglía, que cuando es activada en respuesta a un daño, desencadena una serie de acontecimientos inflamatorios (Danesh-Meyer 2011, Gallego, Salazar et al. 2012, Ha, Moon et al. 2012, Kurihara, Ozawa et al. 2012). Por ello, se ha despertado el interés de la utilización terapéutica de ciertos inhibidores de la microglía o compuestos moduladores de la neuroinflamación. Por ejemplo el copolímero 1 (Cop-1), es un oligopéptido con actividad antiinflamatoria formado por residuos de tirosina, glutamato, lisina y alanina, que ha sido aprobado por la FDA en el tratamiento de esclerosis múltiple. Se

trata de un análogo sintético de baja afinidad de la proteína básica de mielina, que activa una respuesta neuroprotectora autoinmune mediante su unión al complejo mayor de histocompatibilidad y la activación de células T. En la retina, el Cop-1 ha demostrado tener actividad neuroprotectora sobre las CGR en diversos modelos animales (Kipnis, Yoles et al. 2000, Bakalash, Kessler et al. 2003). Por otro lado también cabe destacar la minociclina, un análogo semisintético de la tetraciclina que presenta potentes efectos anti-inflamatorios, neuroprotectores e inmunomoduladores. La minociclina ha demostrado *in vivo* su eficacia sobre los fotorreceptores y puede resultar un agente prometedor en el tratamiento de patologías de la retina (Scholz, Sobotka et al. 2015).

Dentro de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), el ketorolaco, un derivado heterocíclico del ácido acético ha demostrado recientemente *in vivo* su capacidad para retrasar la muerte de las CGR provocada por daño axonal traumático (Nadal-Nicolas, Rodriguez-Villagra et al. 2016). En este mismo contexto, el ibuprofeno ha demostrado en ratones C57BL6 mejorar la retinopatía inducida por oxígeno cuando se administra durante la fase de lesión sin afectar al desarrollo normal de la retina de los animales (Sharma, Barr et al. 2003). Recientemente Rovere et al. estudiaron el efecto de la administración tópica de bromfenaco, también un AINE, sobre la gliosis de la retina y los niveles de prostaglandina E2 después del daño completo del nervio óptico, demostrando que es un tratamiento eficaz y no invasivo para controlar la gliosis retiniana y la liberación de mediadores proinflamatorios que siguen a un daño masivo de las CGR (Rovere, Nadal-Nicolas et al. 2016). También citar una citoquina proinflamatoria (TNF) con capacidad para promover los mecanismos de muerte celular a nivel mitocondrial. Cuando el TNF se une al receptor 1, se forma un complejo TNF-R1 que ha demostrado estar implicado en procesos neurodegenerativos como el glaucoma o la isquemia retiniana (Baltmr, Duggan et al. 2010). En este sentido, la administración de sustancias activas con capacidad para modificar la liberación de TNF, resultaría muy interesante en el tratamiento de este tipo de patologías. Es el caso del GLC756, un fármaco antiglaucomatoso y dopaminérgico que ha demostrado inhibir la

producción de TNF en mastocitos activados de rata (Laengle, Markstein et al. 2006).

5.1.6. Suplementación con factores neurotróficos exógenos

Una de las aproximaciones terapéuticas más interesante en la neuroprotección ocular consiste en la administración de factores neurotróficos exógenos. Los factores neurotróficos o neurotrofinas (NT) son una familia de proteínas encargadas de modular el crecimiento, la diferenciación, la reparación y la supervivencia de las neuronas gracias a su unión a receptores específicos. Una de sus funciones fundamentales es la de impedir que las neuronas inicien la muerte celular programada (apoptosis), y así favorecer su supervivencia. Además son capaces de inducir la diferenciación celular de ciertas células progenitoras para formar neuronas (proceso conocido como neurogénesis). El primer factor neurotrófico descubierto fue el factor de crecimiento neural (nerve growth factor, NGF), descrito alrededor de los años 50 (Levi-Montalcini 1987). A día de hoy, este grupo de proteínas engloba una amplia variedad de compuestos. Entre otros, se encuentran las neurotrofinas 3, 4 y 5 (NT-3 y NT4/5), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), el Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF), así como el Factor Neurotrófico Derivado de Nervio Ciliar (CNTF) (Cheung, Guo et al. 2008, Baltmr, Duggan et al. 2010, Almasieh, Wilson et al. 2012, Nafissi and Foldvari 2015). Los mecanismos de supervivencia celular son activados cuando éstos factores neurotróficos se unen a dos tipos de receptores específicos, uno perteneciente a la familia de los receptores tirosina kinasa (TRK) y otro es el receptor P75NTR. Tras la unión, se desencadena una cascada de eventos que activan el mecanismo de supervivencia celular (Johnson, Guo et al. 2009, Dahlmann-Noor, Vijay et al. 2010, Qu, Wang et al. 2010). La fuente principal de síntesis a nivel endógeno de factores neurotróficos y sus receptores es el cerebro. Sin embargo, también pueden ser sintetizados a nivel local en otros tejidos como la retina, aunque en menor medida (Perez and Caminos 1995, Vecino, Garcia-Crespo et al. 2002). Por esta razón, en muchas ocasiones se hace necesario un transporte retrógrado que haga llegar a las neurotrofinas hasta la retina. Este

transporte es llevado a cabo mediante señalización endosómica, para lo que es imprescindible la unión de estos factores a los receptores TRK ubicados en el extremo del axón. De este modo, se forma un complejo que es internalizado por endocitosis para ser transportado de forma retrógrada hasta el cuerpo celular. Sin embargo, hay ciertas condiciones que pueden alterar este transporte como por ejemplo una elevación de la PIO. Cuando esto ocurre, se compromete el aporte sanguíneo que llega a la retina, afectando al tejido neural. Además al aumentar la presión sobre el tejido conectivo de la cabeza del nervio óptico (lámina cribosa), también se interrumpe el flujo axoplasmático, lo que conduce a un bloqueo de la llegada de los factores neurotróficos endógenos al cuerpo neuronal. Ante estas carencias, las células pueden desencadenar un proceso natural de muerte celular programada (Pease, McKinnon et al. 2000, Johnson, Guo et al. 2009, Baltmr, Duggan et al. 2010, Dahlmann-Noor, Vijay et al. 2010, Qu, Wang et al. 2010, Almasieh, Wilson et al. 2012). La obstrucción del transporte retrógrado en la cabeza del nervio óptico da lugar a la privación de factores neurotróficos en las neuronas de la retina originando muerte celular, por ello, la administración de NT para el tratamiento de patologías neurodegenerativas está siendo ampliamente estudiado por numerosos grupos de investigación, pues parece ser una alternativa terapéutica idónea para favorecer la supervivencia celular.

El GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de la Glía) es un agente neurotrófico ampliamente estudiado para la supervivencia de las CGR y de los fotorreceptores. Su efecto neuroprotector se ha demostrado en diversas patologías neurodegenerativas (Koeberle and Ball 1998, Chen, He et al. 2000). Su estructura, actividad y mecanismos de acción serán detallados más adelante.

El CNTF (Factor Neurotrófico derivado del Nervio Ciliar) es una proteína citosólica que se expresa en células gliales del sistema nervioso central y periférico y en el músculo esquelético. Estimula la expresión génica, la supervivencia celular y la diferenciación en neuronas sensitivas y motoras (Sleeman, Anderson et al. 2000, Bartlett, Banks et al. 2001). El receptor de esta

citoquina neurotrófica es un complejo formado por una subunidad específica alfa (CNTFR α) y dos subunidades beta (gp130 y LIFR β). Cuando el CNTF se une a este receptor, se activa, desencadenando un proceso de transcripción (JAK-STAT), a través del cual promueve la supervivencia de neuronas en el sistema nervioso central (Mey and Thanos 1993, Sleeman, Anderson et al. 2000). Los estudios realizados sobre el CNTF, indican que este agente neuroprotector promueve la supervivencia de determinadas neuronas a nivel del sistema nervioso periférico y puede provocar cambios fenotípicos en el sistema nervioso central (Mey and Thanos 1993). El efecto neuroprotector del CNTF sobre las CGR fue estudiado en un modelo experimental de glaucoma (ratas con elevada PIO inducida mediante laser) (Ji, Elyaman et al. 2004). Como se ha comentado anteriormente, se ha estudiado el potencial que presentan los implantes que encapsulan células madre ARPE-19. Éstas actúan favoreciendo la expresión de CNTF endógeno una vez administrados por vía intravítrea, y su eficacia terapéutica combatiendo la muerte de CGR (Flachsbarth, Kruszewski et al. 2014). También existen evidencias científicas que apuntan a la actividad neuroprotectora del CNTF sobre los fotorreceptores. Se ha visto que cuando el CNTF exógeno se administra en un modelo animal de RP, se dirige inicialmente a las células de Müller, y posteriormente induce la producción de citoquinas que actúan a través del receptor gp130 en los fotorreceptores, lo que promueve la supervivencia neuronal (Bravo-Osuna, Andres-Guerrero et al. 2016).

El BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro) es una NT cuyos receptores están ubicados en la capa nuclear interna de la retina, en la capa de CGR y en los axones del nervio óptico (Ko, Hu et al. 2000, Quigley, McKinnon et al. 2000). Se une con alta afinidad y especificidad al receptor tirosina kinasa TRKB y a la glicoproteína P75NTR con baja afinidad. Existen altos niveles de expresión de BDNF en el hipocampo, cerebelo, tejido ocular fetal y placenta (Barbacid 1995, O'Leary and Hughes 2003, Lambert, Clark et al. 2004, Koennings, Sapin et al. 2007). Hasta el momento, el BDNF es uno de los factores más ampliamente estudiados a nivel ocular. En el ojo, el BDNF se expresa en varias células de la retina, incluidas las células gliales de Müller y las CGR

(Whitmire, Al-Gayyar et al. 2011). La administración exógena de este agente neuroprotector ha demostrado prolongar la supervivencia de CGR y de fotorreceptores en diversas patologías neurodegenerativas oftálmicas (Caffe, Soderpalm et al. 2001, Domenici, Origlia et al. 2014, Khalin, Alyautdin et al. 2015, Valiente-Soriano, Nadal-Nicolas et al. 2015). Además, el BDNF parece tener un importante papel como protector del sistema nervioso central, en casos de excitotoxicidad inducida por glutamato y estrés oxidativo (Peinado-Ramon, Salvador et al. 1996, Lewis, Linberg et al. 1999, Quigley, McKinnon et al. 2000).

5.2. Terapia génica

Con la finalización del proyecto del genoma humano, la comprensión de la naturaleza de muchas enfermedades, su diagnóstico y tratamiento ha sufrido una auténtica revolución ofreciendo una nueva esperanza para los pacientes afectados. Hasta la fecha, se han identificado más de 240 genes patógenos y miles de mutaciones asociadas a determinados *loci* en enfermedades hereditarias de la retina, lo que ha permitido que la terapia génica haya experimentado un desarrollo considerable en los últimos años (Zhang, Wang et al. 2015). Concretamente, en lo que respecta a la manipulación genética propiamente dicha, la terapia génica puede abordarse principalmente de dos formas: a través de la inhibición de la expresión de una proteína, utilizando moléculas que degradan el RNA mensajero (RNAm) y, en consecuencia, impiden la expresión de la proteína codificada; o insertando un gen mediante un plásmido para inducir la expresión de una proteína (Wirth, Parker et al. 2013). En esta línea, dentro de las estrategias encaminadas al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas oftálmicas, destacan principalmente la terapia de sustitución génica, la terapia con citoquinas y la terapia optogénica.

Por ejemplo, el glaucoma presenta una clara base genética, sin embargo no se conoce la relación existente entre estas mutaciones y la degeneración de las CGR (Fan and Wiggs 2010, Wilson and Di Polo 2012). Además, dado que existen numerosos factores de riesgo individuales y ambientales que contribuyen a desencadenar la enfermedad, las terapias

génicas se dirigen a la disminución de la PIO con el fin de evitar la degeneración de las CGR en lugar de orientarse a la corrección del defecto genético primario (Spiga and Borrás 2010, Demetriades 2011, Wilson and Di Polo 2012).

Por su parte, también se ha demostrado el componente genético de la RP y se han descubierto un gran número de genes implicados en la patología. Recientemente se ha estudiado la terapia de reemplazo de genes MERTK, ya que se ha demostrado su implicación en la apoptosis de los fotorreceptores y su posterior degeneración en un modelo animal (D'Cruz, Yasumura et al. 2000).

5.3. Terapia celular

En los últimos tiempos, la terapia celular ha sido una de las estrategias más investigadas, debido a su potencial terapéutico y a su innovación. El trasplante de células madre o células progenitoras ha demostrado ser una alternativa muy interesante para reemplazar las neuronas que se han perdido. En el caso del trasplante de células precursoras de fotorreceptores, se han obtenido muy buenos resultados en modelos murinos de degeneración retiniana (Tucker, Park et al. 2011, Pearson, Barber et al. 2012). Por ejemplo, el trasplante de hCPR (células progenitoras de la retina humana) se postula como una estrategia terapéutica de gran interés para las enfermedades degenerativas de la retina que implican la pérdida de fotorreceptores. Estudios previos han demostrado que las hCPR transplantadas en el espacio subretiniano de un modelo de degeneración retiniana de rata dieron lugar a la preservación de la agudeza visual durante 12 semanas (Luo, Baranov et al. 2014). Sin embargo el trasplante de CGR supone un reto aún mayor, debido a que estas células una vez transplantadas deben no solo integrarse en la retina, sino que además han de regenerar sus axones hasta el cerebro y restablecer sinapsis funcionales. En este sentido, lo que se intenta es proteger el tejido de la degeneración a través de la terapia celular. Las células más estudiadas como neuroprotectoras han sido las células madre mesenquimales y las células gliales (Bull, Irvine et al. 2009). Estas células favorecen la expresión de factores neurotróficos, cuya disminución y/o ausencia está directamente relacionada

con la muerte de CGR en el glaucoma (Johnson, Guo et al. 2009). Por ejemplo, un estudio realizado en un modelo de hipertensión ocular inducida por ligadura de las venas episclerales, el trasplante intravítreo de células madre mesenquimales pluripotenciales dos semanas después del inicio de la hipertensión ocular aumentó la supervivencia de las CGR en un 15%. Este hecho fue relacionado con el incremento de neurotrofinas tales como CNTF, bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) y HGFa (factor de crecimiento de hepatocitos) (Yu, Tanabe et al. 2006). En último término, es importante tener en cuenta que aunque la ventaja de las células trasplantadas es que expresan NT, puede ocurrir que concentraciones elevadas y sostenidas generen una disminución de la expresión de su receptor y, por tanto, reduzcan el potencial neuroprotector. Es más, una concentración elevada de NT puede activar los receptores pro-apoptóticos de baja afinidad de las NT y disparar la apoptosis en respuesta a la NT, como se ha demostrado en modelos de glaucoma y axotomía (Bai, Xu et al. 2010).

6. Selección de agentes terapéuticos para el tratamiento de patologías neurodegenerativas offálmicas del segmento posterior del ojo en este trabajo experimental.

6.1. Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF)

El Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF) es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Fue purificado y caracterizado inicialmente en un medio de cultivo de la línea celular B49 de rata (Lin, Zhang et al. 1994). Se trata de un polipéptido homodimérico glicosilado de 211 aminoácidos altamente conservado (93% de homología entre el gen de la rata y el humano). Cada monómero polipeptídico idéntico presenta 134 aminoácidos con una masa comprendida entre 15.000 – 20.000 g/mol que llegan a la forma activa como dímeros a través de uniones disulfato. En cada subunidad aparecen siete residuos de

cisteína que dan lugar a tres uniones intramonoméricas (Cys₆₈-Cys₁₃₁, Cys₇₂-Cys₁₃₃ y Cys₄₁-Cys₁₀₂) que participan en la unión y conformación tridimensional del dímero. Concretamente, ambos monómeros forman el dímero a través de las Cys₁₀₁, por medio de un único puente disulfuro (Haniu, Hui et al. 1996, Hui, Chow et al. 1998). Desde el punto de vista estructural, cada monómero está formado por dos regiones β -plegadas y una cadena α -hélice (Figura 24).

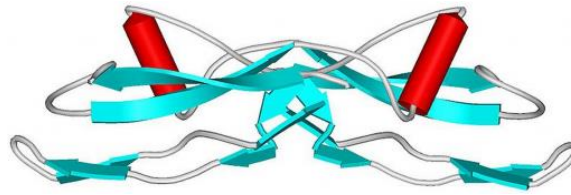


Figura 24. Estructura cuaternaria del GDNF. Imagen obtenida de [<http://www.creative-biolabs.com>].

El GDNF ejerce sus efectos biológicos a través de su unión y posterior activación del receptor GFR α . Principalmente se une al receptor GFR α 1, sin embargo también puede unirse a los receptores GFR α 2 y GFR α 3 pero con menor afinidad. La participación en la unión de la región β -plegada del GDNF al receptor GFR α 1 es esencial para la acción biológica de esta NT. Por otro lado la región α -hélice (región aminoacídica 76-91) es fundamental para su actividad neurotrófica y los últimos 17 aminoácidos del extremo carboxi-terminal intervienen en la estabilidad estructural de este factor neurotrófico (Haniu, Hui et al. 1996, Parkash, Leppanen et al. 2008). El GDNF se une directamente al receptor de superficie GFR α 1 e indirectamente al receptor transmembrana RET (Receptor tirosina Kinasa, TRK) induciendo la formación del complejo GDNF-GFR α 1-RET que señala a través de dos vías intracelulares (Eketjall, Fainzilber et al. 1999). Esto supone un aumento de la supervivencia y diferenciación de las neuronas.

En el sistema nervioso central el GDNF es un potente factor trófico, aunque también se han encontrado evidencias sobre una posible regulación no neuronal. Las primeras evidencias de su actividad biológica fueron observadas para la enfermedad del Parkinson, donde se vió una clara

supervivencia de neuronas dopaminérgicas y motoneuronas (Grondin and Gash 1998). Sin embargo el espectro de aplicación del GDNF se ha extendido a otros trastornos neurodegenerativos, concretamente en la médula espinal y las neuronas noradrenérgicas centrales. También se ha descrito la implicación de este agente neurotrófico en procesos tales como la regulación de la innervación entérica, la modulación de la espermatogénesis o la formación de los riñones (Eketjall, Fainzilber et al. 1999, Wordinger, Lambert et al. 2003).

A nivel ocular, tanto el GDNF como sus receptores son expresados por la retina, las células de la lámina cribosa y los astrocitos que forman la cabeza del nervio óptico. La producción de GDNF endógeno aporta efectos neurotróficos a este nivel. Así la administración de GDNF exógeno ha demostrado ser eficaz en la terapia neuroprotectora, incrementando la supervivencia de las CGR y ralentizando la muerte de los fotorreceptores (Koeberle and Ball 1998, Andrieu-Soler, Aubert-Pouessel et al. 2005, Ward, Khoobehi et al. 2007, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). En los fotorreceptores, el GDNF actúa mediante el aumento de la expresión de opsina y ayuda a mantener la funcionalidad mitocondrial de estas células disminuyendo su muerte por apoptosis (Politi, Rotstein et al. 2001). Además ha demostrado ser uno de los agentes neurotróficos más efectivos para rescatar los fotorreceptores de la degeneración en el modelo de ratón rd1/rd1 de RP (Frasson, Picaud et al. 1999). Sin embargo, hay estudios que demuestran que el GDNF también actúa mediante un mecanismo indirecto sobre los fotorreceptores de la retina afectada, activando las células gliales retiniales de Müller (RMG) que a su vez liberan moléculas que soportan la supervivencia de estas células (Del Rio, Irmeler et al. 2011). Por otro lado, este factor neurotrófico juega un papel fundamental en la regulación de la permeabilidad vascular de la retina. Algunos trabajos relacionan esta macromolécula con la limitación de la permeabilidad vascular a través de las uniones existentes en las células capilares endoteliales que se encuentran en la barrera hematorretiniana. El GDNF parece que interfiere en la disminución de la hiperpermeabilidad que se origina en algunas patologías retinianas como son la RD o la DMAE (Nishikiori, Osanai et al. 2007).

Tal y como se ha citado anteriormente, existen numerosas evidencias que demuestran la actividad neuroprotectora de GDNF sobre las CGR. El GDNF tiene la capacidad de promover la supervivencia e influir en el crecimiento de las neuronas. La privación de este factor neurotrófico, entre otros (BDNF, CNTF, NGF) se ha propuesto como un mecanismo que conduce a la muerte de CGR en el glaucoma. De hecho, varios estudios han señalado el efecto protector de GDNF sobre las CGR tras la transección del nervio óptico (Koeberle and Ball 1998, Yan, Wang et al. 1999) y después de la isquemia retiniana (Kyhn, Klassen et al. 2009). Así también, nuestro grupo de investigación demostró que, tras la administración intravítrea de una formulación de microesferas biodegradables de GDNF y Vitamina E en un modelo animal de glaucoma, se producía un incremento significativo en la supervivencia de las CGR (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011).

No obstante, recientemente se ha postulado que la deficiencia en el transportador de glutamato-aspartato (GLAST) en un modelo animal de ratones, está directamente relacionada con la muerte espontánea de las CGR y la degeneración del nervio óptico sin elevación de la PIO, características patológicas que reúne el glaucoma de tensión normal. GLAST se expresa en las células de Müller y es esencial para mantener la concentración de glutamato extracelular por debajo de un nivel neurotóxico. Curiosamente, el GDNF es un regulador positivo de GLAST en las células de Müller, y este proceso es necesario para la protección de las CGR después de la transección del nervio óptico. Este proceso puede prevenir el daño excitotóxico en torno a las neuronas de la retina. Por tanto, GLAST juega un papel crítico en la supervivencia de los CGR lesionadas y su deterioro puede estar implicado en la patogénesis del glaucoma (Kimura, Namekata et al. 2016).

En conclusión, el GDNF ejerce efectos neuroprotectores directa e indirectamente a través de la glía, de ahí su gran potencial terapéutico en el tratamiento de las enfermedades de la retina, especialmente la retinosis pigmentaria y el glaucoma.

6.2. Vitamina E

La vitamina E forma parte del grupo de las vitaminas liposolubles y pertenece a la familia de los poliprenoides. En estado natural la vitamina E puede presentarse en forma de ocho isómeros, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos los isómeros presentan un anillo aromático (cromano) con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide saturada. En función del número y la posición de grupos metilos presentes en el anillo aromático existen cuatro formas para ambas familias de compuestos: alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ). Cada forma presenta su propia actividad biológica, sin embargo se ha demostrado que la más activa es el α -tocoferol (Figura 25) (Burton and Ingold 1986).

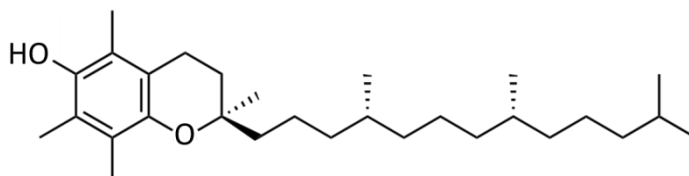


Figura 25. Estructura química del α -tocoferol.

La vitamina E es un excelente antioxidante biológico; previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las proteínas ricas en grupos tiol. Esto es debido a su estructura molecular ya que su grupo fenólico es capaz de fijar radicales libres como O_2^- , O_2^{2-} y OH , comportándose como un agente reductor (Van Acker, Koymans et al. 1993). Como ya se ha comentado, uno de los factores de riesgo implicados en la patogénesis de diversas enfermedades oftálmicas es el estrés oxidativo. La producción de radicales libres de oxígeno desencadena una reacción en cadena que provoca daño tisular. Los ROS interfieren en varios mecanismos de regulación y de transducción de señales a nivel intracelular provocando alteraciones en el DNA y en macromoléculas como las proteínas y los lípidos (Engin, Engin et al. 2007). La vitamina E en este sentido, es capaz de donar electrones a estas especies oxidadas, neutralizando de esta manera el

potencial oxidativo destructor de estos. Cuando el α -tocoferol libera el electrón, se oxida da lugar a una estructura intermedia que posteriormente se convertirá en α -tocoferilquinona (Figura 26) (Lien and Hammond 2011).

La administración de vitaminas antioxidantes y carotenoides se plantea por lo tanto como una estrategia terapéutica encaminada a contrarrestar el daño oxidativo que se produce diversas patologías oftálmicas. Los potenciales efectos terapéuticos de la vitamina E han sido postulados en varias patologías oculares. En glaucoma, un ensayo clínico desarrollado en pacientes demostró que la administración oral de α -tocoferol presentó efectos protectores en la retina contra el daño glaucomatoso (Engin, Yemisci et al. 2010). Otro ensayo clínico realizado en pacientes ancianos también evidenció que la suplementación en la dieta con antioxidantes tales como la vitamina E y C, los β -carotenos y el zinc disminuye la progresión de la DMAE (van Leeuwen, Boekhoorn et al. 2005). También se observó un efecto beneficioso tras la administración de una terapia combinada con vitamina E en un ensayo clínico en pacientes con retinosis pigmentaria en el que se observó una disminución de la velocidad de pérdida de campo visual debido probablemente al efecto sobre los radicales libres de los fotorreceptores afectados (Pasantés-Morales, Quiroz et al. 2002). Otras patologías en las que puede ser interesante el efecto del α -tocoferol son la retinopatía diabética (Bursell, Clermont et al. 1999) o la uveítis anterior (van Rooij, Schwartzberg et al. 1999). La vitamina E presenta también actividad antiproliferativa, lo que le proporciona un valor añadido si ésta se quiere administrar mediante inyección intraocular, ya que podría disminuir los riesgos de desprendimiento de retina asociados a las inyecciones repetidas debido a la proliferación de fibroblastos (Larrosa, Veloso Jr et al. 1997).

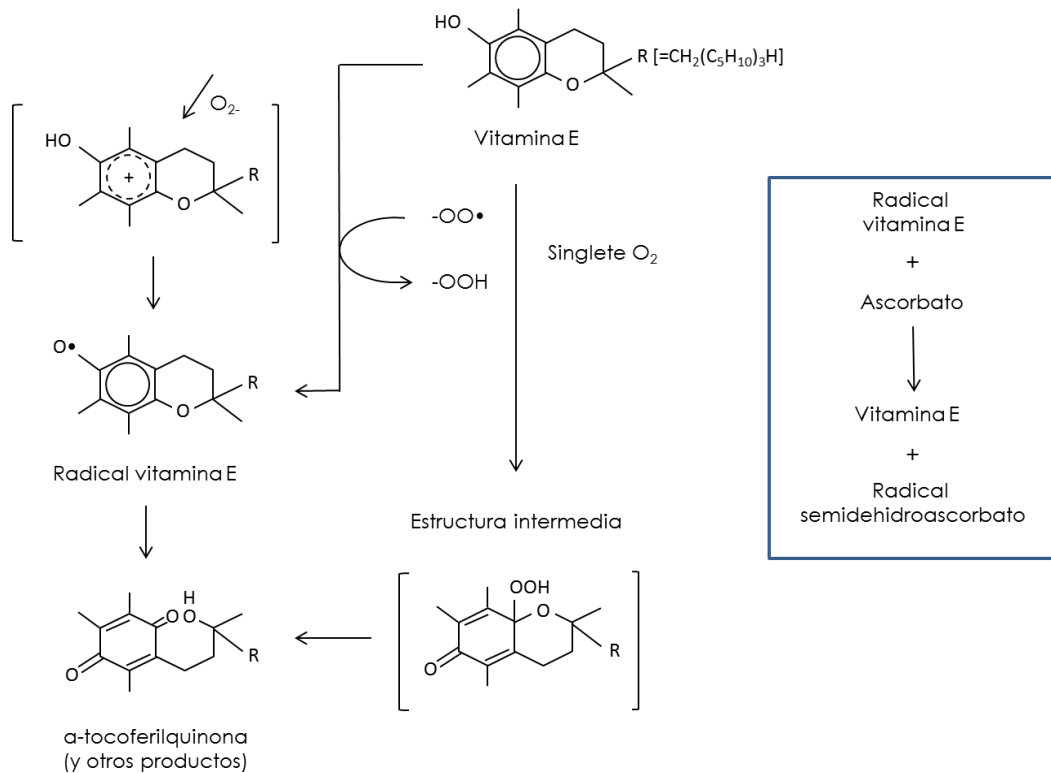


Figura 26. Mecanismo antioxidante del α -tocoferol.

6.3. Melatonina

Como ya se indicó anteriormente, la melatonina o N-acetil- 5-metoxitriptamina (Figura 27) es una neurohormona secretada por la glándula pineal que está implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos. Esta sustancia es considerada la piedra angular de los ritmos circadianos ya que además de regular los mismos, actúa como inductora del sueño. Sin embargo, es también un potente antioxidante, capaz de modular el sistema inmune. Además posee la capacidad de contrarrestar los radicales libres que dañan las células, proteger el sistema cardiovascular, estimular la producción de somatotropina (hormona del crecimiento) y actuar como un potente antidepresivo (Maestroni 1999, Sanchez, Calpena et al. 2015).

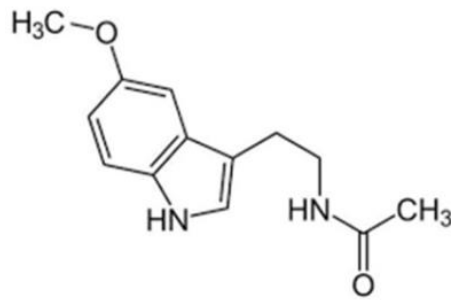


Figura 27. Estructura química de la melatonina.

La retina sintetiza pequeñas cantidades de melatonina que son empleadas como neuromoduladoras a nivel local. En el ojo, esta hormona posee tres tipos de receptores: MT1, MT2 y MT3, de los cuales, los subtipos MT1 y MT2 están presentes en distintos tejidos oculares como la retina humana, la córnea, la esclera, la coroides y la vasculatura retinal. Investigaciones recientes indican que el complejo heterómero formado por MT1/MT2 conforma la diana farmacológica específica para mejorar la función de los fotorreceptores y extender su viabilidad (Baba, Benleulmi-Chaachoua et al. 2013). De igual manera, la existencia de estos receptores en el cuerpo ciliar indicaría su participación en la regulación de la presión intraocular. Concretamente, la melatonina y sus análogos ejercen esta acción a través de sus receptores MT1, MT2 y MT3. Después de la activación de estos receptores, en su mayoría MT2 y MT3, la PIO disminuye, proporcionando valores normales de presión intraocular y por lo tanto, evitando posibles complicaciones oculares. El mecanismo a través del cual la melatonina produce esta disminución en los valores de PIO en el cuerpo ciliar es principalmente debido a la modificación en los valores intracelulares de AMPc (adenosin monofosfato cíclica). De esta manera, cuando la melatonina activa los receptores MT2 y MT3, se estimula la adenilato ciclasa, con la concomitante activación del PKA (proteína Kinasa A). Esta cadena de activación, produce la inhibición del flujo del ión cloruro, que es el responsable del movimiento acuoso desde el epitelio ciliar hasta la cámara posterior en el ojo. Así, la reducción del flujo de cloruro desencadena la disminución de la formación del humor acuoso y con ello la reducción de la PIO (Alkozi, Sanchez-Naves et al. 2016). Esto está relacionado con la

concentración de melatonina en el humor acuoso, que es similar a las concentraciones plasmáticas, con un pico máximo durante los periodos de oscuridad (Yu, Yee et al. 1990). En este contexto, el ciclo circadiano mediado por esta neurohormona parece estar implicado en la regulación de la producción del humor acuoso y por tanto en la presión intraocular, habiendo evidencias científicas que señalan que la melatonina reduce la PIO en humanos (Alkozi and Pintor 2015, Pescosolido, Gatto et al. 2015). Además la melatonina actúa como agente neuroprotector, previniendo los daños que produce el glaucoma a nivel del nervio óptico y favoreciendo la supervivencia de la CGR, la integridad estructural de las mismas y preservando la visión. En este sentido, esta molécula participa en los procesos de neurodesarrollo y en la regulación de factores neurotróficos en la retina (Iuvone, Boatright et al. 2014). Estudios en retina de ratones con isquemia demostraron que el tratamiento con melatonina aumentó la supervivencia de las CGR y que este efecto neuroprotector está mediado por la inhibición de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α), la estabilización y la reducción de actividad de las células gliales en la retina (Park, Lee et al. 2012).

7. Aspectos tecnológicos de microencapsulación de fármacos y proteínas para la administración intraocular.

Dado el notable interés que despiertan los microsistemas de liberación controlada en el tratamiento de patologías degenerativas del segmento posterior del ojo, las micropartículas han sido los dispositivos seleccionados para el desarrollo de la presente tesis doctoral. Como se ha reflejado previamente, la microencapsulación ofrece numerosas ventajas tales como el incremento de la estabilidad de la sustancia encapsulada, control de la liberación de la sustancia activa en el lugar deseado o el aumento de la biodisponibilidad del principio activo entre otras. Además, este tipo de microsistemas presentan una gran versatilidad ya que permiten la incorporación de sustancias activas de diferentes características y su elaboración es relativamente sencilla y reproducible. Por otro lado, presentan

un tamaño idóneo, ya que las micropartículas pueden prepararse en tamaños adecuados para su administración a través de una inyección convencional sin necesidad de cirugía, y al mismo tiempo mantener la liberación del principio activo encapsulado durante semanas y/o meses.

7.1. Métodos de microencapsulación de proteínas

La microencapsulación es el recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una capa de material polimérico o graso originando partículas de flujo libre de tamaño micrométrico. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe el nombre de micropartícula (microesfera y microcápsula). Esta técnica surge en los años 30, tras la publicación de un trabajo que describía la elaboración de microcápsulas de gelatina siguiendo un procedimiento denominado *coacervación* (Bungenburg de Jong and Kaas 1931). En la actualidad, existen diferentes métodos para la fabricación de micropartículas. El área de la tecnología farmacéutica y el desarrollo de sistemas de liberación controlada están en crecimiento progresivo, y es previsible que a medida que surjan nuevos materiales y avancen los descubrimientos de nuevos fármacos, aparezcan nuevas técnicas de microencapsulación más novedosas, eficientes y robustas. A la hora de seleccionar el tipo de método de fabricación de las micropartículas es necesario seguir un estricto criterio, basado fundamentalmente en las características físico-químicas del principio activo que se va a microencapsular, y en la naturaleza del material de recubrimiento o polímero que se va a emplear.

A continuación se recogen las técnicas de microencapsulación que habitualmente son empleadas para la elaboración de sistemas de cesión controlada (Vila-Jato 2001):

1. Métodos *químicos*:

- Técnica de polimerización interfacial
- Gelificación iónica

2. Métodos *mecánicos*:

- Técnica de atomización
- Técnica de atomización-congelación
- Técnica de suspensión en aire o recubrimiento en lecho fluido

3. Métodos *físicos*:

- Técnica de coacervación o separación de fases
- En medio acuoso:
 - Coacervación simple
 - Coacervación compleja
- En medio no acuoso (fase orgánica):
 - Coacervación por un cambio de temperatura
 - Coacervación por adición de un "no solvente"
 - Coacervación por adición de un polímero incompatible
- Técnica de extracción-evaporación del disolvente
 - En el seno de una emulsión o/w
 - En el seno de una emulsión o/o

Una de las técnicas más empleadas en la fabricación de microesferas destinadas a la administración intraocular de fármacos es la basada en la extracción-evaporación del disolvente a partir de una emulsión (Freitas, Merkle et al. 2005), y es el método que se ha utilizado en la elaboración de las distintas formulaciones desarrolladas en este trabajo experimental. Esta técnica incluye todos aquellos casos en los que inicialmente se forma una emulsión y posteriormente se produce la evaporación del disolvente que compone la fase interna en la que está disuelto el polímero.

En el caso de las técnicas destinadas a la microencapsulación de proteínas, se requieren generalmente metodologías altamente sofisticadas

debido principalmente a la complejidad estructural que presentan este tipo de moléculas, su fácil degradación e inestabilidad. Por tanto, resulta esencial seleccionar un método de encapsulación adecuado que garantice la integridad de la biomolécula y mantenga su actividad biológica (Sinha and Trehan 2003, Bilati, Allemann et al. 2005, Martín-Sabroso, Fraguas-Sánchez et al. 2015). Dentro de las técnicas más utilizadas destacan la atomización, la extrusión en caliente, la separación de fases o la extracción-evaporación del disolvente (Baras, Benoit et al. 2000, Ghalanbor, Korber et al. 2010, Andreas, Zehbe et al. 2011, Wang, Liu et al. 2013, Ma 2014). La formación de microesferas empleando el método de extracción-evaporación del disolvente a partir de una doble emulsión A/O/A es el más utilizado (Figura 28) (Mundargi, Babu et al. 2008, Karal-Yilmaz, Serhatli et al. 2011, Cardenas-Bailon, Osorio-Revilla et al. 2015). Aunque es una técnica relativamente sencilla, y se han conseguido elevados rendimientos de encapsulación, presenta ciertos inconvenientes y limitaciones que pueden comprometer la estructura de la proteína. Por ejemplo, el empleo de la proteína al estado molecular hace que éstas sean más susceptibles a la degradación. Este hecho es debido a la presencia de una interfaz agua/disolvente orgánico durante el proceso de microencapsulación que puede originar la adsorción interfacial de la proteína y como consecuencia su desplegamiento y posible agregación. Por otro lado, el empleo de técnicas de sonicación para favorecer la formación de la emulsión también pueden alterar a la proteína, ya que las altas temperaturas que se producen durante el proceso pueden ocasionar estrés en la biomolécula (Schwendeman 2002, Ye, Kim et al. 2010, Martín-Sabroso, Fraguas-Sánchez et al. 2015).

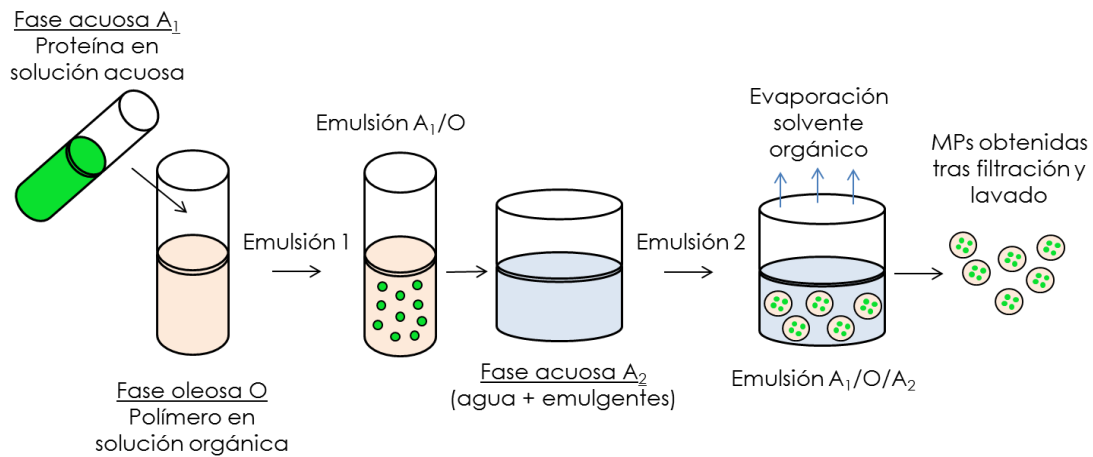


Figura 28. Esquema de elaboración de microesferas a través de la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión A₁/O/A₂.

Existe una alternativa a la metodología previamente expuesta que suprime la mayoría de los riesgos mencionados y que es la microencapsulación de proteínas al estado sólido. Este método se caracteriza esencialmente por minimizar considerablemente la movilidad de la macromolécula durante el proceso, de tal forma que se consigue la encapsulación de la proteína en su conformación inicial, reduciendo así los cambios estructurales que pudiera sufrir (Giri, Choudhary et al. 2013). Esta técnica incorpora dos variantes:

-Método S/O/O (sólido-oleo-oleoso): La proteína al estado sólido (generalmente liofilizada) es incorporada en una solución orgánica polimérica que posteriormente se emulsiona con la fase externa oleosa. Dada la ausencia de agua durante todo el proceso, la proteína no sufre prácticamente desplegamiento de su estructura (Tobio, Nolley et al. 1999, Carrasquillo, Carro et al. 2001, Leach, Simpson et al. 2005). Sin embargo, pueden existir ciertos problemas de toxicidad y/o de contaminación ambiental debido al empleo de grandes volúmenes de líquidos de carácter orgánico y oleoso (Yuan, Wu et al. 2009).

-Método S/O/A (sólido-oleo-acuoso): Esta técnica surge con el objetivo de evitar los problemas descritos en el método S/O/O. En este caso la proteína

se incorpora al estado sólido en la solución polimérica para después emulsificarse con una fase externa acuosa (Figura 29) (Morita, Sakamura et al. 2000, He, Zhou et al. 2011, Rawat, Kohli et al. 2012). Dadas las ventajas que reúne esta técnica de microencapsulación, ha sido la empleada en el presente trabajo de investigación para el desarrollo de las distintas formulaciones. Si bien presenta el inconveniente de que, dada la naturaleza hidrosoluble de las proteínas, parte se pierde en la fase externa, obteniéndose por tanto, rendimientos de encapsulación moderados.

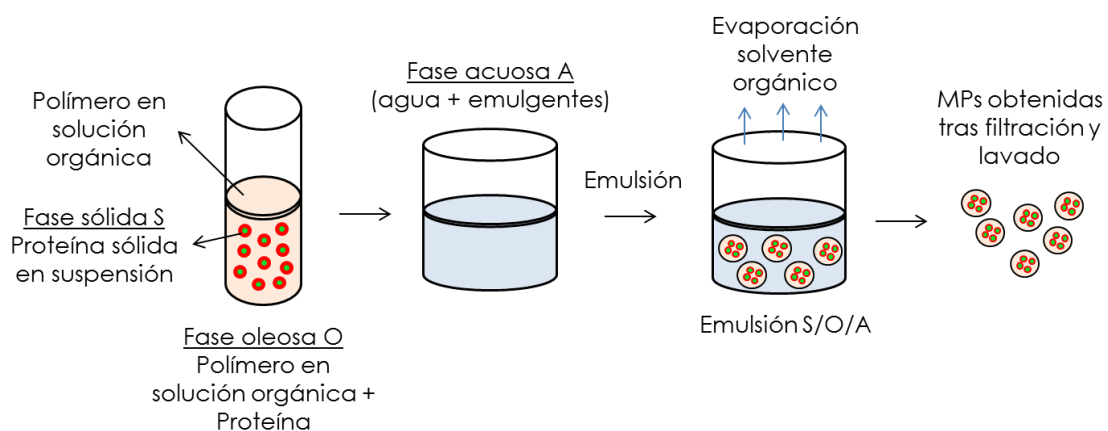


Figura 29. Esquema de elaboración de microesferas a través de la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A.

7.2. Esterilización

Las microesferas destinadas a la administración intraocular deben cumplir con los requisitos de garantía de calidad establecidos en las Farmacopeas. Generalmente es preferible una esterilización sobre el producto terminado. Una garantía del nivel de esterilidad de $N_F/N_0=10^{-6}$ (N_F , número de microorganismos finales/ N_0 ; número de microorganismos iniciales) es válida para los procedimientos de esterilización descritos en la Farmacopea Española (Real Farmacopea Española, 2015). Los métodos de esterilización más comúnmente empleados en producto terminado son la radiación gamma, el óxido de etileno y el autoclave (Lambert, Mendelson et al. 2011). Sin embargo

el empleo de estas técnicas está limitado debido a la inestabilidad de los materiales empleados (polímeros y/o proteínas) y a la producción de residuos tóxicos durante el proceso y la toxicidad inherente de ciertos productos como el óxido de etileno (Lyseng-Williamson 2016). Por ejemplo, algunos biopolímeros comúnmente utilizados en la elaboración de sistemas microparticulares como PLGA y PLA no pueden ser sometidos a la esterilización en autoclave. En estos casos, la opción más adecuada es la radiación gamma (γ). La dosis requerida para asegurar la esterilización de un producto farmacéutico es de 25 kGy (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). Sin embargo la radiación gamma puede inducir cambios estructurales tanto en el polímero como en la sustancia activa encapsulada. Además si la molécula activa es una proteína, pueden desencadenarse procesos que provoquen su desnaturalización y/o degradación, viéndose de este modo alterada la integridad y la bioactividad del agente terapéutico (Montanari, Costantini et al. 1998, Jain, Malyala et al. 2011). Existen varias estrategias para evitar los riesgos asociados al empleo de radiación gamma como por ejemplo, el empleo de bajas temperaturas (hielo seco) durante el proceso de esterilización. Sin embargo, en el caso de microesferas cargadas con productos biológicos no resulta suficiente. En este caso, de acuerdo a estudios previos de nuestro grupo de investigación, el empleo de técnicas de microencapsulación en las que se incorpore una sustancia oleosa combinada con el agente activo en su forma sólida, podría suponer una estrategia tecnológica que conferiría protección extra a la proteína, promoviendo su estabilidad durante el proceso (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012, Mohanan, Gander et al. 2012).

7.3. Propiedades tecnológicas de micropartículas

Una vez elaboradas las microesferas se procede a su caracterización mediante el análisis de distintas propiedades:

7.3.1. Morfología

El estudio morfológico se realiza fundamentalmente por técnicas de microscopía, tales como la microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM), entre otras o su estructura interna, marcando el polímero con un fluoróforo. A través de los estudios morfológicos se pueden determinar características importantes de las micropartículas tales como la forma, la regularidad de su superficie, la presencia de poros así como su tamaño. También permite observar la homogeneidad de las micropartículas y su agregación. Estos parámetros resultan de gran interés, pues pueden tener repercusión en las propiedades y aplicaciones de las micropartículas. Por ejemplo, la presencia de agregación afecta a la homogeneidad del producto elaborado, además puede influir en su inyectabilidad (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014). Por otro lado, el tamaño de los poros y la cantidad de los mismos en la superficie puede influir en la liberación de la sustancia encapsulada y hasta modificar el mecanismo por el cual ocurre (Kim and Park 2004, Reinhold and Schwendeman 2013, Paik and Choi 2014, Huang, Li et al. 2015). Las propiedades morfológicas de las micropartículas pueden verse afectadas por diferentes condiciones experimentales, como por ejemplo el tipo de solvente empleado y la velocidad de evaporación del mismo durante el proceso de fabricación (Bitz and Doelker 1996, Meng, Ma et al. 2003).

7.3.2. Tamaño de partícula

El tamaño de las microesferas es un parámetro crítico, sobre todo si estas van a ser inyectadas y además influye tanto en el perfil de liberación como en otras características como la eficacia de encapsulación. El análisis del tamaño de partículas se lleva a cabo generalmente mediante técnicas de difracción láser. El tamaño de partícula puede verse afectado por varias condiciones experimentales empleadas durante cualquiera de los métodos relacionados anteriormente. Por ejemplo, el tipo de polímero y su peso molecular (Alonso, Gupta et al. 1994, Haznedar and Dortunc 2004), la concentración del polímero en la fase orgánica (Cheng, Illum et al. 1998, Péan,

Venier-Julienne et al. 1998), la proporción entre el polímero y el fármaco (Sun, Jeong et al. 2003, Haznedar and Dortunc 2004), la concentración del agente tensoactivo en la fase externa (Cheng, Illum et al. 1998, Sun, Jeong et al. 2003, Kempen, Lu et al. 2004) o la velocidad de agitación al formar las gotículas (Lee, Oh et al. 1999, Mateovic, Kriznar et al. 2002, Dinarvand, Moghadam et al. 2003) son los factores que condicionan el tamaño de las micropartículas.

7.3.3. Carga y eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación (EE) es la fracción de sustancia activa encapsulada con respecto a la cantidad total que se emplea para realizar el proceso, expresada en porcentaje. La carga (Q) de sustancia activa en las microesferas es la cantidad encapsulada por masa de microesferas. Ambos parámetros se determinan mediante las siguientes ecuaciones matemáticas (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014):

$$EE = \frac{\text{fracción experimental de sustancia activa encapsulada}}{\text{fracción teórica de sustancia activa encapsulada}} \times 100$$

$$\text{Carga de sustancia activa en las MSs} = \frac{\text{cantidad de sustancia activa}}{\text{cantidad de microesferas}}$$

Para la determinación de estos parámetros es necesaria la extracción de la proteína de la estructura polimérica. Una de las técnicas más ampliamente utilizada es la extracción líquido-líquido en la que una de las fases es un disolvente orgánico que favorece la ruptura de las partículas por disolución del polímero y la otra fase es acuosa, donde la proteína queda disuelta para ser posteriormente cuantificada por diferentes técnicas, como ELISA o microBCA. Sin embargo, como ya se ha comentado, la presencia de la interfase agua-disolvente orgánico, puede originar alteraciones estructurales en la proteína, agregación o aceleración de su degradación química (Jiskoot, Randolph et al. 2012).

7.3.4. Liberación *in vitro*

La capacidad de los sistemas microparticulares para administrar el agente activo encapsulado de una manera controlada se estudia mediante los ensayos de liberación *in vitro*. Algunos de los factores que influyen en el perfil de liberación están relacionados directamente con la composición (matriz polimérica empleada, proteína encapsulada y co-encapsulación de aditivos con diversos fines), el método de elaboración empleado y las condiciones utilizadas durante el mismo (Freiberg and Zhu 2004). Además existen otros factores que pueden determinar el perfil de liberación y que están relacionados con las condiciones empleadas en el estudio, tales como la composición y el volumen del medio de liberación, la temperatura, la forma y velocidad de agitación, y el recambio del medio de cesión (parcial o completo) (Yang and Cleland 1997, Blanco-Prieto, Besseghir et al. 1999, Giteau, Venier-Julienne et al. 2008). Además en el caso de las proteínas es importante tener en cuenta que durante el periodo de liberación a partir del sistema biodegradable pueden producirse fenómenos indeseables ya que la proteína puede resultar afectada no solo por el entorno fisiológico durante la liberación *in vitro* como *in vivo* al encontrarse expuesta a humedad, temperaturas de 37°C o en contacto con superficies hidrofóbicas de la matriz polimérica, sino también a un ambiente que podría resultar adverso debido a la presencia de productos de degradación de la matriz que pueden originar una modificación del pH, fluido intersticial, enzimas proteolíticas, células y productos de degradación celular como las especies reactivas de oxígeno, etc (Pisal, Kosloski et al. 2010, Jiskoot, Randolph et al. 2012). También pueden tener lugar otros fenómenos indeseados durante la liberación tales como la degradación química de la proteína, su agregación, la liberación incompleta del producto microencapsulado debido principalmente a interacciones polímero-proteína, o la disminución de la actividad biológica de la macromolécula, fenómeno que indica que la proteína liberada se ha degradado o ha alterado su estructura (van de Weert, Hennink et al. 2000). Generalmente los estudios de liberación se realizan en tampón fosfato (PBS, pH 7,4) para mantener el pH fisiológico de la mayoría de los fluidos corporales, incluyendo el vítreo.

Además, con el objetivo de evitar los fenómenos de agregación proteica, que surgen durante la liberación de proteínas debido a la tendencia adherente de éstas a la superficie del PLGA, las albúminas como la albúmina sérica bovina (BSA) se emplean como agentes protectores de las proteínas, actuando mediante un mecanismo competitivo de adsorción al PLGA. Por último, la incorporación de azida sódica como conservante en los medios de cesión promueve la inhibición del crecimiento microbiano durante los estudios a largo plazo. Este tipo de medios de cesión también han sido utilizados por otros autores para realizar estudios de liberación *in vitro* con formulaciones de GDNF destinadas a inyección intravítrea (Andrieu-Soler, Aubert-Pouessel et al. 2005, Ward, Khoobehi et al. 2007, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

En las últimas décadas, la investigación en el campo de la micro- y nanotecnología ha demostrado que los sistemas de cesión controlada representan una estrategia que da respuesta a diferentes necesidades terapéuticas. Dentro de estos sistemas, las microesferas biodegradables de PLGA se presentan como dispositivos de gran interés para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oftálmicas.

El desarrollo de sistemas microparticulares de PLGA mediante la metodología de la extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A, ha permitido la liberación de pequeñas cantidades del agente neuroprotector GDNF (del orden de picogramos) durante un largo periodo de tiempo, lo que puede resultar eficaz en el tratamiento de patologías neurodegenerativas oculares crónicas. No obstante, la frecuencia con la que se requiere la administración de este tipo de dispositivos de liberación controlada depende del tiempo durante el cual el agente activo puede liberarse tras la administración. Por esta razón, resultaría de gran interés un estudio farmacocinético que permitiese la evaluación de los niveles en vítreo del factor neurotrófico GDNF tras una única inyección intravítrea de las microesferas.

Las enfermedades neurodegenerativas del segmento posterior del ojo son de etiología multifactorial, generalmente crónicas, y cursan con un daño progresivo del nervio óptico y la pérdida de fotorreceptores y células ganglionares de la retina (CGR). Ante esta situación, resultaría especialmente interesante emplear diversas sustancias activas que se ajustasen a los requerimientos terapéuticos del paciente. En este sentido, una terapia combinada basada en el empleo de distintos agentes terapéuticos como son GDNF, melatonina y vitamina E, que actúen sobre varios mecanismos implicados en la patogénesis, podría resultar muy útil en el tratamiento de este tipo de enfermedades.

Debido a la evolución de los conocimientos científicos y de sus aplicaciones tecnológicas, los métodos utilizados en experimentación están en continuo progreso. La evaluación de la bioactividad y bioseguridad de sustancias activas postuladas para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oftálmicas del segmento posterior del ojo, requiere el impulso de métodos alternativos que permitan una evaluación precoz de estos parámetros antes de poner en marcha ensayos *in vivo*. En este contexto, el empleo de herramientas basadas en cultivos organotípicos de retina que permitan la evaluación precoz de la bioactividad y/o toxicidad en la retina tanto de agentes terapéuticos microencapsulados (GDNF) como de las microesferas antes de los estudios *in vivo* podría resultar de gran interés.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

OBJECTIVES AND APPROACH

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

El objetivo global del presente trabajo de investigación se ha centrado en el diseño y caracterización de microesferas de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) –un polímero biocompatible y biodegradable– para su utilización como sistema intraocular de liberación controlada para la administración conjunta de agentes neuroprotectores. Con este fin, se han diseñado distintas formulaciones de microesferas del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y otras sustancias activas y/o coadyuvantes destinadas a la terapia neuroprotectora ocular, y más específicamente, como una nueva aproximación terapéutica para el tratamiento de patologías crónicas de la retina.

Para lograr dicho objetivo global nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos o parciales:

Objetivo 1: Evaluación de los niveles en vítreo del factor neurotrófico GDNF tras la administración intravítrea de microesferas de GDNF/VitE en animales de experimentación (conejos) durante 6 meses mediante un estudio farmacocinético.

Para la consecución de estos objetivos, el planteamiento de este trabajo fue el siguiente:

- ✓ Desarrollo de una formulación microparticulada de PLGA cargada con el agente neuroprotector GDNF y vitamina E empleando el método de extracción-evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A.
- ✓ Caracterización *in vitro* de la formulación mediante el estudio de su morfología, tamaño, eficacia de encapsulación y perfil de liberación del agente neuroprotector.

- ✓ Determinación de la distribución de la proteína y del aditivo oleoso en la matriz polimérica mediante microscopía confocal.
- ✓ Inyección intravítrea de la formulación de microesferas en animales de experimentación (conejos) y estudio farmacocinético *in vivo* durante 6 meses.

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en el capítulo I, titulado:

“Six month delivery of GDNF from PLGA/Vitamin E biodegradable microspheres after intravitreal injection in rabbits”.

Objetivo 2: Utilización de cultivos organotípicos de retina de rata como herramienta para la evaluación del efecto neuroprotector inducido por microesferas de PLGA cargadas con la combinación GDNF/VitE.

Para la consecución de estos objetivos, el planteamiento de este trabajo fue el siguiente:

- ✓ Desarrollo de dos formulaciones microparticulares de PLGA cargadas con la misma cantidad de agente neuroprotector GDNF y diferentes cantidades de vitamina E empleando el método de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A.
- ✓ Caracterización *in vitro* de las formulaciones mediante el estudio de su morfología, tamaño, eficacia de encapsulación y perfil de liberación del agente neuroprotector.
- ✓ Evaluación *ex vivo* de la eficacia y tolerancia de las formulaciones desarrolladas a través del empleo de modelos de cultivos organotípicos de retina de rata.

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en el capítulo II, titulado:

“Organotypic retinal cultures as a predictive tool to evaluate short and long-term neuroprotection induced by GDNF/VitE-PLGA microspheres”

Objetivo 3: Evaluación del potencial terapéutico del GDNF incluido en una formulación de microesferas de PLGA-VitE y de la combinación de GDNF/melatonina en las microesferas de PLGA-VitE en la supervivencia de células fotorreceptoras en un modelo animal de degeneración de fotorreceptores (rho-/-).

Para la consecución de estos objetivos, el planteamiento de este trabajo fue el siguiente:

- ✓ Desarrollo de dos formulaciones microparticulares de PLGA-VitE elaboradas a través del método de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A que incluyen (1) GDNF; (2) GDNF y melatonina.
- ✓ Caracterización *in vitro* de las formulaciones mediante el estudio de su morfología, tamaño, eficacia de encapsulación y perfil de liberación.
- ✓ Inyección intravítrea de las formulaciones de microesferas en animales de experimentación (ratones (rho-/-)) y posterior estudio de supervivencia de células fotorreceptoras.

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en el capítulo III, titulado:

“Intravitreal controlled co-delivery of GDNF and melatonin preserves photoreceptors in rhodopsin knockout mouse”.

OBJECTIVES AND APPROACH

This experimental work has been focused on the design and characterization of microspheres based on poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -a biocompatible and biodegradable polymer- as intraocular drug delivery system (IODDS) for simultaneous administration of neuroprotective agents. With this goal, several formulations based on PLGA microspheres have been developed including the Glial cell line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and other active substances intended for ocular neuroprotection therapy and, more specifically, as a novel therapeutic approach to treat chronic retinal diseases.

This main objective can be divided into the following specific objectives:

Objective 1: To evaluate vitreous levels of Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF) after a single intravitreal injection of GDNF/VitE microspheres in experimental animals (rabbits) over 6 months by a pharmacokinetic study.

To achieve these objectives, the approach of this work was the following:

- ✓ To develop a formulation based on PLGA microspheres loaded with the neuroprotective agent GDNF and vitamin E by using a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion solvent evaporation technique.
- ✓ To *in vitro* characterize the formulation by the study of their morphology, size, encapsulation efficiency and release profile of the neuroprotective agent.
- ✓ To evaluate the protein and oily additive distribution in the polymer matrix by confocal microscopy.

- ✓ To administrate by intravitreal injection the microspheres in experimental animals (rabbits) and *in vivo* pharmacokinetic study over 6 months.

Results obtained are provided in chapter I, entitled:

“Six month delivery of GDNF from PLGA/Vitamin E biodegradable microspheres after intravitreal injection in rabbits”.

Objective 2: Organotypic retinal cultures as tool for the evaluation of neuroprotective effect of PLGA microspheres loaded with the combination GDNF/VitE.

To achieve these objectives, the approach of this work was the following:

- ✓ To develop two formulations based on PLGA microspheres loaded with the same amount of the neuroprotective agent GDNF and different amounts of vitamin E by using a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion solvent evaporation technique.
- ✓ To *in vitro* characterize the formulations by the study of their morphology, size, encapsulation efficiency and release profile of the neuroprotective agent.
- ✓ To evaluate the *ex vivo* efficacy and tolerance of the formulations by employing organotypic culture rat retina models.

Results obtained are provided in chapter II, entitled:

“Organotypic retinal cultures as a predictive tool to evaluate short and long-term neuroprotection induced by GDNF/VitE-PLGA microspheres”

Objective 3: To evaluate the therapeutic potential of glial cell line derived neurotrophic factor in combination with vitamin E (GDNF/VitE) loaded in PLGA microspheres and GDNF/VitE/melatonin loaded in PLGA microspheres to rescue photoreceptors from determined cell death animal model (rhodopsin knockout mouse).

To achieve these objectives, the approach of this work was the following:

- ✓ To develop two formulations based on PLGA microspheres loaded with (1) GDNF or (2) GDNF and melatonin by using a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion solvent evaporation technique.
- ✓ To *in vitro* characterize the formulations by the study of their morphology, size, encapsulation efficiency and release profile.
- ✓ To administrate by intravitreal injection the microspheres in experimental animals (rhodopsin knockout mice) and photoreceptors survival study.

Results obtained are provided in chapter III, entitled:

“Intravitreal controlled co-delivery of GDNF and melatonin preserves photoreceptors in rhodopsin knockout mouse”.

CAPÍTULO I-CHAPTER I

Six month delivery of GDNF from PLGA/Vitamin E biodegradable microspheres after intravitreal injection in rabbit

ABSTRACT

Local long-term delivery of glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) from vitamin E/poly-lactic-co-glycolic acid microspheres (MSs) protects retinal ganglion cells in an animal model of glaucoma for up to 11 weeks. However, the pharmacokinetics of GDNF after intravitreal injection of MSs is not known. We evaluated the GDNF levels after a single intravitreal injection of GDNF/VitE MSs.

Biodegradable MSs were prepared by the solid-oil-in-water emulsion-solvent evaporation technique and characterized. Rabbits received a single intravitreal injection (50 μ L) of GDNF/VitE MSs (4%w/v; 24 right eyes; 74.85 ng GDNF), blank MSs (4%w/v; 24 left eyes), and balanced salt solution (4 eyes). Two controls eyes received no injections. At 24 hours, 1, 4, 6, 8, 12, 18, and 24 weeks after injection, the eyes were enucleated, and the intravitreal GDNF levels were quantified. Pharmacokinetic data were analysed according to non-compartmental model.

Intraocular GDNF levels of 717.1 ± 145.1 pg/mL were observed at 24 hours for GDNF-loaded MSs, followed by a plateau (745.3 ± 25.5 pg/mL) until day 28. After that, a second plateau (17.4 ± 3.7 pg/mL) occurred from 8 to 24 weeks postinjection, significantly higher than the basal levels. Eyes injected with GDNF/VitE and Blank-MSs did not show any abnormalities during the six-months follow up after administration. The single injection of GDNF/VitE MSs provided a sustained controlled release of the neurotrophic factor in a controlled fashion for up to six months.

KEYWORDS

Poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres, protein delivery, vitamin E, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), pharmacokinetics, intravitreal injection.

1. Introduction

Glaucoma is a group of neurodegenerative diseases in which the optic nerve is affected (Almasieh, Wilson et al. 2012). Although high intraocular pressure (IOP) is the main risk factor, some patients have glaucoma even with normal tension values (Sommer 1989). Neuronal damage can occur by different pathways, including excitotoxicity, protein misfolding, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, inflammation, and neurotrophin deprivation among others. All of these mechanisms ultimately lead to programmed cell death with loss of retinal ganglion cells (RGCs) (Qu, Wang et al. 2010).

Treatments directed to avoid irreversible damage of the neuronal cells are of great interest (Baltmr, Duggan et al. 2010). Taking into account that glaucoma is a multifactorial disease, the most feasible pharmacological approach is directed toward the combination of several active substances with additive or synergistic effects. Based on this, the combination of a neurotrophic factor and an antioxidant agent would seem to be an optimal therapeutic strategy.

Among the neurotrophic factors, the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) enhances the survival of dopaminergic and motor neurons in neurodegenerative diseases such as Parkinson and Alzheimer (Chen, He et al. 2000, Siegel and Chauhan 2000, Allen, Watson et al. 2013, Ghiso, Doudevski et al. 2013). At the ocular level, exogenous, intravitreally injected GDNF has neuroprotective effect for RGCs, promoting the survival of axotomized cells (Klocker, Braunling et al. 1997, Cuenca, Fernández-Sánchez et al. 2014).

Antioxidants are also beneficial in neurodegenerative diseases in which neuronal death is associated with the damage of healthy neurons located in the proximity of massive releases of oxidative molecules (Mozaffarieh, Grieshaber et al. 2008, Engin, Yemisci et al. 2010, McManus, Murphy et al. 2014). Among the antioxidants, the free radical scavenger vitamin E (α -tocopherol, VitE) produces results of great interest (Engin 2009). Furthermore, it has been proposed that VitE has antiproliferative properties that might reduce some of the side effects typically linked to repeated intravitreal injections such as

proliferative vitreoretinopathy and retinal detachments (Larrosa, Veloso Jr et al. 1997).

Due to the chronic nature of glaucoma, the applicability of GDNF and VitE in the neuroprotective therapy is totally linked to the development of effective administration devices that are able to supply therapeutic concentrations at the retina for extended periods of time (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). During the last two decades, the development of intraocular drug delivery systems (IODDS) is one of the main research areas for the treatment of chronic diseases affecting the back of the eye (Achouri, Alhanout et al. 2013, Kompella, Amrite et al. 2013, Goyal, Garg et al. 2014). Depending on the size, IODDS are classified as nanoparticles (1-1000 nm), microparticles (1-1000 μ m), and implants (>1 mm). Microparticles and implants have received a lot of interest because they can provide long-term delivery of the active substance. Microparticles have the advantage of easy administration because injection can be performed through conventional 25-34 gauge needles and thus avoiding surgery. Two structurally distinct types of microparticles are typically used to deliver the active substance: microcapsules and microspheres (MSs). Microcapsules are composed of a polymeric material that creates a reservoir in which the active substance is included. In contrast, MSs are composed of a polymer network that produces a matrix microsystem within which the active substance is dispersed (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014). Biodegradable MSs are an emerging therapeutic tool in the treatment of chronic intraocular pathologies because they are suitable for administration close to the target site by periocular or intraocular routes. Additionally, they disappear from the site of administration after releasing the therapeutic molecule (Herrero-Vanrell and Refojo 2001, Andres-Guerrero, Zong et al. 2015). Among the biodegradable polymers, poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) has been the most employed, with one device already used in clinical practice (Ozurdex®). IODDS made of PLGA are gradually converted into CO₂ and water *in vivo* and eliminated by ocular tissues (Makadia and Siegel 2011).

The potential inflammatory reactions and damage to retinas and vision function caused by intravitreally injected PLGA microspheres and their degradation products have been studied by several authors. They indicated

that no inflammation nor cell toxicity in the retinas was triggered by the microspheres, the degraded products, or the changed microenvironments in the eyes. Ocular tissues show great tolerability and biocompatibility after the intravitreal administration of PLGA material (Giordano, Chevez-Barrios et al. 1995, Veloso, Zhu et al. 1997, Rong, Yuan et al. 2014, Abrego, Alvarado et al. 2015). However, an initial foreign body response after intravitreal injection can occur under normal physiological conditions with no damage to the retina (Giordano, Chevez-Barrios et al. 1995). These same authors did not observe inflammatory signs 4 days after administration of microspheres and thereafter.

PLGA-based GDNF-loaded MSs have been developed by different authors to provide slow drug release and long-lasting therapeutic effects (Andrieu-Soler, Aubert-Pouessel et al. 2005, Jiang, Moore et al. 2007, Ward, Khoobehi et al. 2007). In a previous study, we developed GDNF/VitE-loaded MSs capable of providing *in vitro* release of the bioactive protein for up to 19 weeks. This formulation was intravitreally injected into rats with elevated IOP, an animal model of glaucoma. It effectively protected the RGCs for at least 11 weeks (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011).

The injection frequency of the IODDS depends on the length of time that the active substance can be delivered after administration. For this reason, the evaluation of drug delivery systems designed to target retinal tissues or surrounding areas requires pharmacokinetic studies in the vitreous (Behar-Cohen, El Aouni et al. 2002, Fernandes-Cunha, Saliba et al. 2014). Pharmacokinetic studies have been performed after injection of GDNF (bolus) in porcine eyes, and GDNF levels in the vitreous were quantified for seven days (Ejstrup, Kiilgaard et al. 2010). However, to the best of our knowledge, the study described here is the first to report the intravitreal pharmacokinetics of GDNF delivered from a microparticulate system over a long period (six months). The aim of the present study was to evaluate the GDNF levels after a single intravitreal injection of GDNF/VitE MSs. Pharmacokinetic study were done in rabbits, and data were analysed using non-compartmental treatment.

2. Materials and methods

2.1. Materials

GDNF and the enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) kit for GDNF quantification were supplied by R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). PLGA ratio 50:50 (Resomer®503) was purchased from Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Ingelheim, Germany). Polyvinyl alcohol 72,000 g/mol (PVA) was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). N-(tetramethylrhodamine-6-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (TRITC-DHPE) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). VitE (α -tocopherol acetate), bovine serum albumin (BSA), and human serum albumin fluorescein isothiocyanate (HSA-FITC) were obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany).

2.2. Microsphere elaboration

GDNF/VitE-loaded PLGA MSs were elaborated using a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion solvent evaporation technique previously developed by our group (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). Briefly, 20 μ g of GDNF was suspended in 20 μ L VitE by gentle sonication at low temperature (0°C) (Sonicator XL, Head Systems, Farmingdale, New York, USA) for 30 sec. The suspension was then mixed with 1 mL of PLGA solution in methylene chloride (20% w/v). This organic phase was emulsified with 5 mL of PVA MilliQ® water solution (2% w/v) in a homogenizer (Polytron® RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at 5,000 rpm for 1 min. The emulsion was subsequently poured onto 100 mL of an aqueous PVA solution (0.1%) and kept under constant stirring for 3 h to allow organic solvent evaporation. Once formed, the MSs were washed, filtered, freeze-dried, and kept at -20 °C under dry conditions until used.

2.3. Microsphere characterization

2.3.1. Production yield percentage (PY%)

The PY% of each formulation was calculated as the percentage of MSs weight divided by the total amount of the components (polymer, drug, and VitE) initially used in the formulation process.

$$\text{PY\%} = \frac{\text{weight of microspheres}}{\text{total amount of polymer, protein and VitE}} \times 100$$

2.3.2. Mean particle size and particle size distribution

The mean particle size and particle size distribution were measured by light scattering in a Microtrac® S3500 Series Particle Size Analyzer (Montgomeryville, PA, USA).

2.3.3. Morphological evaluation

The external morphology of freeze-dried MSs was evaluated by scanning electron microscopy (Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were gold sputter-coated prior to observation.

2.3.4. Protein and additive distribution in PLGA MSs

A model labelled-protein, HSA-FITC, was encapsulated in the same conditions described for GDNF (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). Combinations of the additive VitE with small proportions (6 µg) of the fluorescent lipid dye TRITC-DHPE (0.5 mg/mL in CH₂Cl₂) were also included in the Oil-phase. Samples of this formulation-were placed in release media for 24 h (see *in vitro* release studies). Freshly prepared MSs samples (time 0 h) and

samples taken 24 h after release were observed by confocal microscopy (Leica TCS SP2, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany).

2.3.5. Encapsulation efficiency

To determine the encapsulation efficiency, 5 mg of MSs were dissolved in 0.7 mL of methylene chloride. Then, the same volume of the reactive diluent composed of phosphate buffered saline, pH 7.4, and 1% BSA provided in the ELISA Kit (DY995, R&D System) was added. After vigorous mixing, the heterogeneous system was centrifuged (12,000 rpm, 15 min, 4°C) and the aqueous phase extracted. This liquid/liquid extraction was repeated four times to recover all of the encapsulated protein. Following the extraction, GDNF immunoassays were performed in triplicate.

2.3.6. *In vitro* release studies

To determine the rate of GDNF release from the MSs, duplicate samples of GDNF/VitE-loaded MSs (5 mg) were suspended in a release medium composed of 1.5 mL of phosphate buffered saline (pH 7.4 isotonic with NaCl) containing 1% BSA and 0.02% sodium azide. LoBind Eppendorf® vials were used in all cases. Samples were maintained under a constant agitation speed of 100 rpm (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd, Avon, UK) at 37°C. At 1 h, 24 h, and once a week until the end of the assay (24 weeks), the MSs suspension were gently centrifuged (5,000 rpm for 5 min), and the supernatants were recovered and replaced by the same volume of fresh medium. GDNF in the supernatant aliquots were then assayed by ELISA as described above. When necessary, the aliquots were diluted with the reactive diluent.

2.4. In vivo assays

2.4.1. Animals

All of the animals were handled according to the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609/EEC. Animal assays were carried out in compliance with the ARVO Statement for the use of animals in experimental procedures and other scientific purposes. All methods were carried out according to the Project License PI12/02285 approved by the in-house Ethics Committee for Animal Experiments for the University of Zaragoza (Spain).

Investigations were performed in 27 adult female New Zealand albino rabbits (2 – 3.5 Kg, Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal [SAEA], Zaragoza University, Zaragoza, Spain). The animals were housed singly in standard cages, in a light-controlled room (12 h/12 h dark/light cycle) at $20 \pm 2^\circ$ C with a relative humidity of 40 - 70%. Diet and water were available *ad libitum* and clinical observations were performed daily.

2.4.2. Intravitreal injections

All injections were performed under general anaesthesia and aseptic conditions. The animals were anaesthetized intramuscularly with a mixture of ketamine hydrochloride (25 mg/Kg; Ketolar 50®, Pfizer, Madrid, Spain) and medetomidine (0.5 mg/Kg; Domtor®, Esteve, Madrid, Spain). Topical anaesthesia was achieved by eyedrops with 1 mg/mL tetracaine chlorhydrate and 4 mg/mL oxibuprocaine chlorhydrate (Colircusí Anestésico Doble®, Alcon Cusí SA, Barcelona, Spain). Povidone-iodine solution (5%) was applied for ocular surface antiseptics before and immediately after the intravitreal injection. All of the injections were performed by the same ophthalmologist. Before the injection, aqueous humour paracentesis of 0.03-0.05 mL approximately with a 30-gauge needle was performed to prevent backflow of MSs and an increase of IOP (Aref 2012).

The animals were randomized into 9 groups (Groups 1 – 8, n = 3 each; Group 9, n = 2) and a single control rabbit (Table 1). During the anaesthesia, the right eyes of the 24 rabbits in Groups 1 – 8 were injected intravitreally with GDNF/VitE-loaded PLGA MSs. The left eyes of the same rabbits were injected with non loaded PLGA MSs (Blank-MSs). In Group 9, all four eyes were injected with 50 μ L of balanced salt solution vehicle (BSS®; Alcon Laboratories, Inc.; Fort Worth, TX, USA). The control rabbit received no injection, and both eyes were enucleated to compare the basal concentration of GDNF with rabbits that received the intravitreal injection. The bilateral injections were done to reduce the number of animals used for the study.

Group	No of rabbits	Injection	Time of enucleation	Treatment		No of eyes
				RE	LE	
1	3	MSs	24 h	GDNF-MSs	Blank-MSs	6
2	3	MSs	1 week	GDNF-MSs	Blank-MSs	6
3	3	MSs	4 weeks	GDNF-MSs	Blank-MSs	6
4	3	MSs	6 weeks	GDNF-MSs	Blank-MSs	6
5	3	MSs	8 weeks	GDNF-MSs	Blank-MSs	6
6	3	MSs	12 weeks	GDNF-MSs	Blank-MSs	6
7	3	MSs	18 weeks	GDNF-MSs	Blank-MSs	6
8	3	MSs	24 weeks	GDNF-MSs	Blank-MSs	6
9	2	BSS	24 h	BSS	BSS	4
Control	1	-	-	-	-	2
TOTAL	27					54

Table 1. Experimental groups.

To ensure a homogeneous dispersion of MSs in the injection, 4% (w/v) suspensions of the MSs were prepared in BSS and briefly vortexed immediately before each injection. A 50 μ L-volume of suspension was then injected intravitreally with a 25-gauge needle placed in the superior-temporal quadrant of the eye. According to the encapsulation efficiency of GDNF in the MSs, the dose administered was 74.85 ng of GDNF. Under surgical microscope visualization, the needle tip was directed to the centre of the vitreous body, about 3-5 mm posterior to the limbus. At post-injection time points of 24 h and

at 1, 4, 6, 8, 12, 18, and 24 weeks, the animals were humanely killed by rapid intravenous bolus injection of 30 mg/Kg sodium pentobarbital, and the eyes were enucleated and immediately dissected. The entire vitreous body was peeled from the everted globe and frozen at -20°C. The intravitreal concentration of GDNF was determined by ELISA as described below.

2.4.3. General health and clinical findings

IOP measurements for all animals were performed using a rebound tonometer (TonoVet® TV01, iCare Finland OY, Vantaa, Finland). Pressures were measured before and at 24 h and at 1, 4, 6, 8, 12, 18, and 24 weeks after the intravitreal injection. The ocular health status was observed over the study period by slit-lamp examination of the ocular anterior segments and by indirect fundus ophthalmoscopy through dilated pupils with a 20-diopter aspheric lens.

2.4.4. Quantification of vitreous samples by ELISA

All vitreous samples were sonicated (Sonicator XL) at a low temperature for 1 min. Afterwards, the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The GDNF content in the supernatant was determined by ELISA (DuoSet® ELISA Development System, R&D Systems Inc.). The assays were done according to the manufacturer's instructions on tissue culture treated 96-well plates (Costar® 3599, Corning Inc., Corning, NY, USA), and the absorption at 450 nm was read in a multi-detection microplate reader (BioTek® Synergy™ HT, BioTek Instruments, Inc., Friedrichshall, Germany). Experimental samples were tested in triplicate, and experimental GDNF concentrations were calculated using the average absorbance of the three readings plotted against the standard curve. Two anchoring points below the routine limit of 15.6 pg/mL (7.8 and 3.9 pg/mL) were used for GDNF quantification in vitreous (Smolec et al., 2005). The same restriction in the detection limit fixed for lower limit of quantification and upper limit of quantification (back calculated concentration within 25 % of nominal

value) was also demanded for this anchoring point for acceptance (EMA guideline on bioanalytical method validation, 2011).

2.4.5. Pharmacokinetics and statistical analysis

All values were expressed as means \pm standard deviations except for the mean concentration values from vitreous samples that were graphically represented by using the standard error of the mean. The data were analyzed by Statgraphics software (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). A p-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

The mean intravitreal concentrations (C_{vitreous}) of samples collected after injection of GDNF/VitE MSs were used to perform the pharmacokinetic analysis.

2.4.6. Non-compartmental analysis

The primary pharmacokinetic parameter “apparent vitreous clearance” ($Cl(\text{vitreous})$) was calculated using the general equation:

$$Cl(\text{vitreous})/Fr = \frac{\text{dose}}{AUC}$$

where the experimental area under curve (AUC) was estimated by a linear-trapezoidal method with the data collected during the 24 weeks of the *in vivo* study. “Fr” is a correction factor that does not represent bioavailability (considered 100 %) in this case, but the fraction dose released during 24 weeks of the *in vitro* study.

The profile of the intravitreal concentrations showed two consecutive plateaus: the first one from 24 h to 4 weeks (Stage 1) and the second one from 8 to 24 weeks (Stage 2). Both exhibiting zero-order release kinetics. The steady state concentrations (C_{ss1} and C_{ss2}) were calculated from the mean values of intravitreal concentrations corresponding to each stage.

The release rate constants at both stages (K_{01app} and K_{02app}), following the zero-order kinetics, were related to C_{ss1} and C_{ss2} according to the following equation:

$$K_{0app} = Cl(vitreous)/Fr \times C_{ss}$$

The K_0 data for both stages might be considered only as approximate values, according to the limitations offered by clearance calculations, that is why have named them "apparent" release constant.

The initial burst *in vivo* was estimated as follows:

Initial burst = Vitreal concentration at 24h x Anatomical volume of rabbit vitreous.

Where the anatomical volume of rabbit vitreous was taken as the value reported by Del Amo for albino rabbits (Del Amo, Vellonen et al. 2015). It is necessary to point out that it is an inaccurate estimation, so there is no guarantee that the true peak concentration occurs at 24 h, the first sampling point, and the apparent volume of distribution might be higher than the anatomical volume.

3. Results

3.1. Microsphere elaboration and characterization

The production yield for microencapsulation of GDNF/VitE MSs was $79.1 \pm 7.8\%$ and the mean particle size was $19.1 \pm 9.4 \mu\text{m}$ (Fig. 1, inset). The particles were spherical and had a high number of small pores on the surface (Fig. 1).

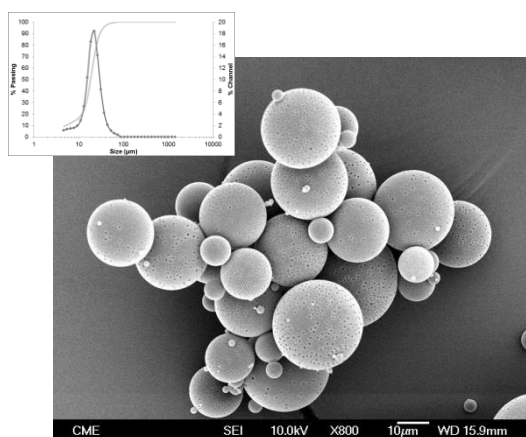


Fig. 1. Scanning electron microscopy images of GDNF/Vit E microspheres. Inset: Particle size distribution.

Confocal microscopy showed the initial distribution of HSA-FITC and VitE mixed with TRITC-DHPE in the MSs and the distribution after 24 h in the release medium (Fig. 2). Initially, the HSA-FITC was located mostly near the surface of the particles, and VitE (mixed with TRITC-DHPE during the microencapsulation procedure) was homogeneously distributed in the polymeric matrix. After 24 h in the release medium, the intensity and depth of the HSA-FITC fluorescent ring was diminished but still present. This fact can be related with an initial important release of the protein in the first 24 h, as occurs with GDNF. However, bleaching phenomena cannot be discarded.

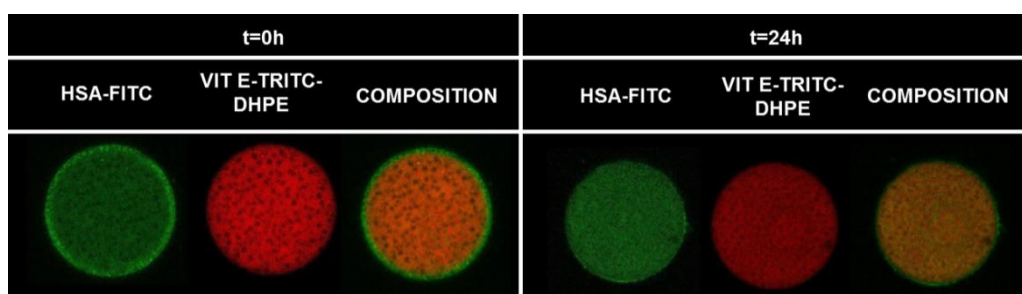


Fig. 2. Confocal microscopy images of HSA-FITC and VitE-TRITC-DHPE distribution in PLGA microspheres at $t = 0$ h and $t = 24$ h after incubation in the release medium. The combination images were created by merging the HSA-FITC images with the VITE-TRITC-DHPE images.

3.2. Encapsulation efficiency and *in vitro* release of GDNF

The GDNF/VitE formulation encapsulated 37.43 ± 0.74 ng/mg MSs of GDNF for an encapsulation efficiency of $42.74 \pm 1.66\%$. A sustained release of GDNF has been observed (Fig. 3).

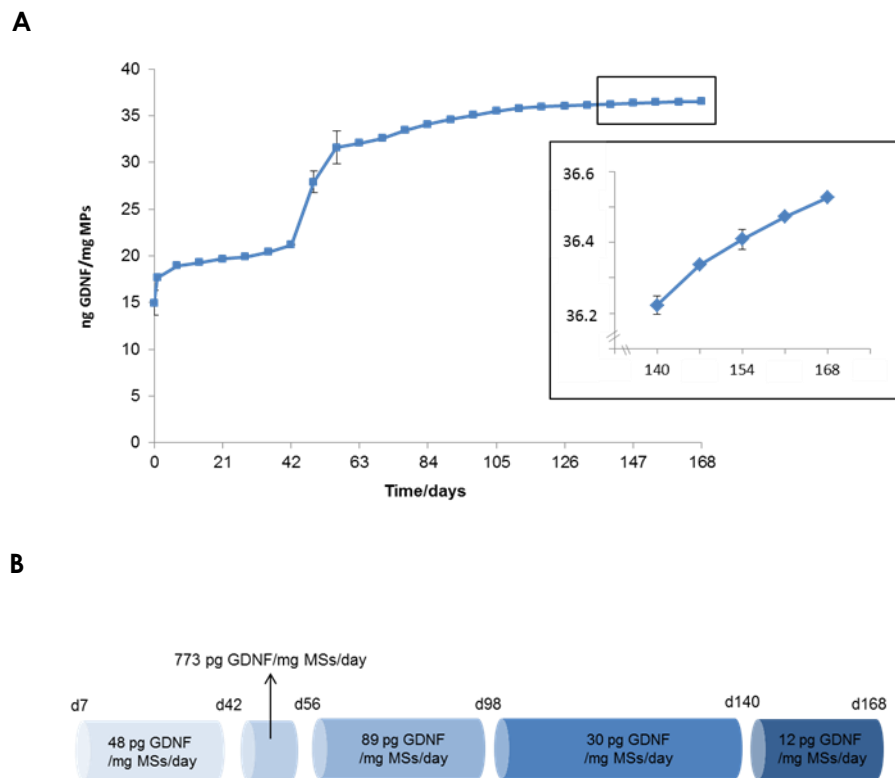


Fig. 3 (A) Cumulative *in vitro* release of GDNF from GDNF/Vit E microspheres (ng/mg MSs) over 168 days (six months) from the GDNF/VitE MSs. Release media: PBS (pH 7.4), 1% BSA and 0.02% Na azide. Inset: Cumulative release of GDNF from the GDNF/VitE formulation from day 140 to day 168. **(B)** Schematic representation of the release rate for formulation GDNF/VitE for 168 days.

During the first 24 h, 49.3% of the GDNF incorporated in the MSs was delivered from the GDNF/VitE formulation. After this initial GDNF burst, there was a sequence of fast and slow release steps (Fig. 3). First, there was a fast protein delivery for 7 days. After that, the release rate was 48 pg GDNF/mg MSs/day during the next 35 days (from 7th to 42nd day). After a fast delivery within 7 and 8 weeks (773 pg GDNF/mg MSs/day), the GDNF/VitE formulation released the GDNF in a sustained fashion for 42 days, from day 56 to day 98, with a release

rate of 89 pg GDNF/mg MSs/day. From day 98 to 140 a release rate of 30 pg GDNF/mg MSs/day was denoted and finally, also a sustained release at a rate of 12 pg GDNF/mg MSs/day was observed until the end of the assay (day 168). At the end of the *in vitro* release study, the remaining GDNF content was more than 4% of the originally encapsulated agent.

3.3. *In vivo* assays

3.3.1. General health and clinical findings

IOP and clinical signs of ocular inflammation such as abnormalities in the cornea and inflammation in the anterior and posterior segments were evaluated before and after treatments. The eyes injected with the GDNF/VitE-loaded and blank MSs did not show any abnormalities during the six-month follow up after administration. In all animals, the corneas remained clear, and there were no observable anterior chamber reactions or iris abnormalities. Also, the posterior segments, particularly the retina and optic nerves, were free of any inflammatory response. Four eyes developed cataracts in the posterior lens capsule, probably due to trauma associated with the injection itself. Moreover, the IOPs were within normal limits over the study period, and no case exceeded 14 mmHg. There were no significant differences in IOP between eyes injected with GDNF/VitE or blank MSs (Fig. 4).

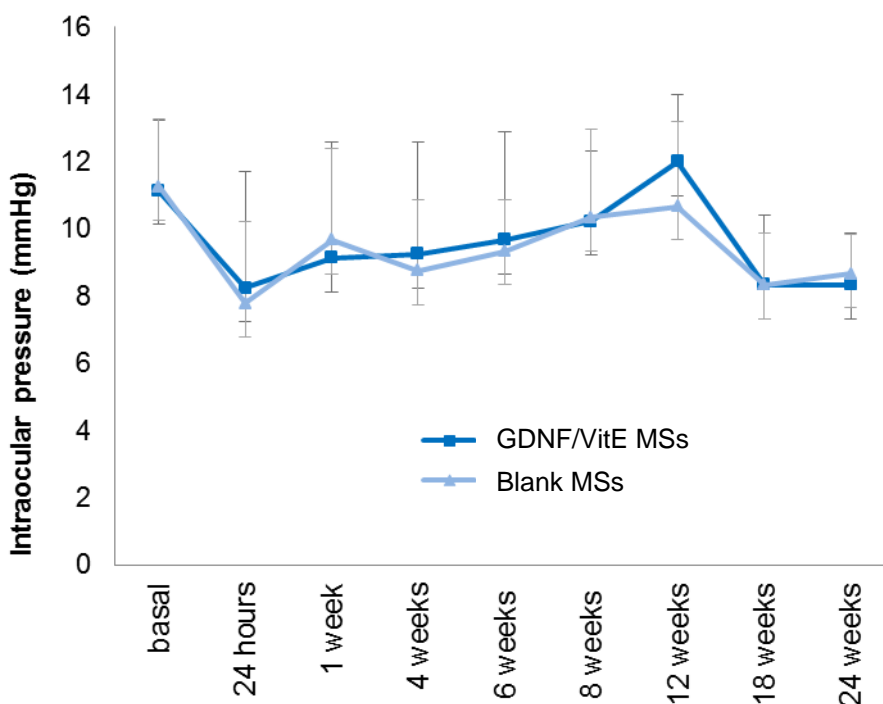


Fig. 4 Intraocular pressure before and after the intravitreal administration of a MSs suspensions of GDNF/VitE (■) and blank MSs (▲) in rabbits.

3.3.2. Ocular pharmacokinetics of GDNF after intravitreal administration

3.3.2.1. Vitreous levels of GDNF

The intravitreal GDNF concentrations after administration of 2 mg of GDNF/VitE and 2 mg of blank MSs are presented in Fig. 5. Consistent with the release burst observed *in vitro*, 24 h after injection of the GDNF-loaded particles, intravitreal GDNF concentrations reached 717.1 ± 145.1 pg/mL. At this initial point the injection of non-loaded MSs caused the basal levels of GDNF to increase to 10.2 ± 4.0 pg/mL, compared with the vitreous measured from non-treated animals (< 3.9 pg/mL, detection limit). During the following four weeks, GDNF levels were maintained at 745.3 ± 25.5 pg/mL (C_{ss1}) in eyes receiving GDNF-MSs, which was almost one hundred fold higher than the values in eyes receiving blank MSs, 7.8 ± 2.5 pg/mL. At six weeks post-GDNF MSs injection, the intravitreal GDNF concentration was 5.9 ± 0.6 pg/mL. After that, the GDNF concentration was maintained at 17.4 ± 3.7 pg/mL (C_{ss2}) from the 8th week to

the end of the assay (24th week). GDNF quantification in animals receiving blank microspheres were over the detection limit during the first 4 weeks of the *in vivo* study.

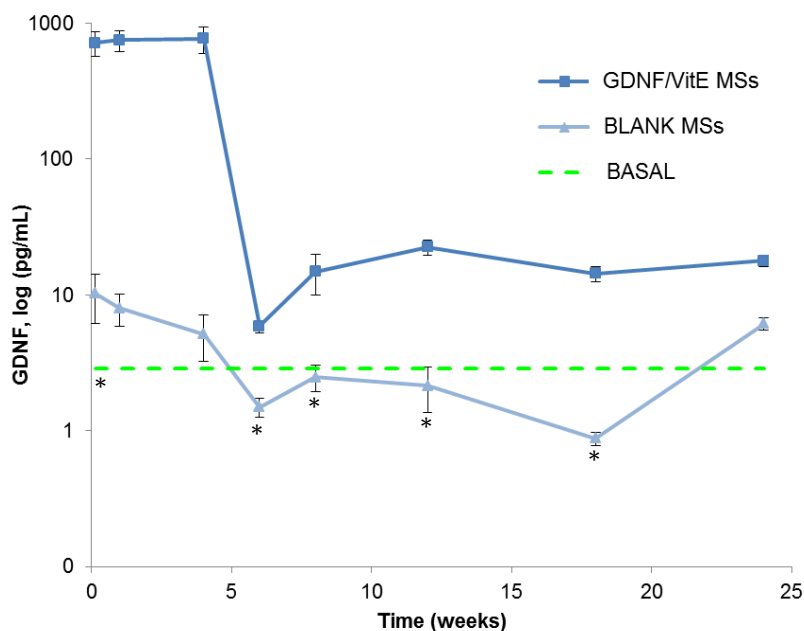


Fig. 5 Semilog GDNF time-dependent concentration profiles in rabbit vitreous humour after the administration of MS suspensions of the GDNF/VitE formulation (■), and blank MS suspensions (▲). The green dashed line represents the average basal concentration of intravitreal GDNF in two eyes of one rabbit. (*) GDNF values under the detection limit (< 3.9 pg/mL).

3.3.2.2. Pharmacokinetic parameters

Based on the determinations of GDNF concentrations in the vitreous over the course of the study, the pharmacokinetic parameters for the non-compartmental analysis were determined (Table 2).

Pharmacokinetic parameter	Non-compartment analysis
Cl(vitreous)/Fr (mL/day)	2.65
AUC (pg day/mL)	28238
K_{01app} (pg/day)	1973.4
K_{02app} (pg/day)	46.2
t₀₂ (day)	> 42

Table 2: Pharmacokinetic parameters of GDNF distribution in the vitreous Cl(vitreous), apparent vitreous clearance; AUC, area under the curve (0-168 days); K₀₁, zero-order release constant for 24 h to 4 weeks; K₀₂, zero-order release constant for 8 to 24 weeks; T₀₂, onset time of the stage 2.

Note: Calculation of AUC value from blank microspheres group resulted meaningless so part of the experimental data were under the detection limit (< 3.9 pg/mL)

Note: Fr does not represent bioavailability (considered 100%) but the fraction of dose released during the 24 weeks assay.

3.3.2.3. *In vivo* GDNF release from the MSs

Around 911 pg of the administered GDNF was initially released as a burst from the MSs during the first 24 hours. After that, GDNF was released during the following 4 weeks at a constant rate of 2 ng/day (Stage 1). The remaining neurotrophic factor was released at a constant rate of 46 pg/day until the end of the assay (Stage 2). These values were calculated considering that Cl(vitreous)/Fr describes the true vitreal clearance.

4. Discussion

Most neurodegenerative diseases induce irreversible loss of function in patients (Murakami, Notomi et al. 2013). GDNF has a neuroprotective effect in delaying the degenerative process of retinal pathologies (Klocker, Braunling et al. 1997, Cuenca, Fernández-Sánchez et al. 2014). This effect occurs even at

low concentrations if maintained for long periods of time. In fact, we have recently shown that 0.8 pg/day GDNF delivered by PLGA MSs resulted in RGC and axonal survival 11 weeks after injection in rats with induced glaucoma (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). These promising results indicated that biodegradable microparticulate systems can be considered as therapeutic tools in the treatment of chronic intraocular diseases in which the degeneration occurs slowly (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014). Furthermore, as the active substance is released close to the target site for long periods of time, the number of repeated applications can be significantly reduced (Herrero-Vanrell and Refojo 2001).

In the present work, we prepared a MSs formulation with GDNF and VitE. We have selected PLGA as biocompatible and biodegradable polymer to control the release of the neurotrophic factor. This polymer undergoes homogeneous hydrolytic degradation that promotes the formation of pores and cavities (Wang, Feng et al. 2010) releasing the active compound from the PLGA matrix through diffusion (Aubert-Pouessel, Venier-Julienne et al. 2004). The particle size of about 19 μm and the spherical shape made this formulation suitable for being injected as a suspension through small needles (30 – 32 gauge) used for intravitreal administration (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). Scanning electron microscopy images showed the presence of pores in the MSs surfaces. This fact has been previously reported, and it is attributed to the rapid removal of organic solvent during the elaboration of the formulation (Al Haushey, Bolzinger et al. 2007) and also to the presence of the oily additive VitE in the formulation (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011).

One of the most remarkable technological aspect in the MSs formulation reported in this work is the presence of an oil (VitE) that allows the incorporation of the GDNF as a solid in the MSs. This fact helps to maintain the integrity of the neurotrophic factor (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012) and extend the release of the active substance compared with the MSs without additive (data non shown). From a pharmacological point of view, the antioxidant properties of VitE presumably might help to reduce the oxidative stress associated with glaucomatous optic neuropathy (Mozaffarieh, Grieshaber et al. 2008).

For confocal studies, we used HSA-FITC to determine protein distribution in PLGA matrix instead of GDNF. Unfortunately to our knowledge, it does not exist GDNF fluorescently labelled commercially available. Although GDNF and HSA are two proteins with different molecular weight, it could be assumed that the handling procedures such as sonication in VitE and emulsification in homogenizer might have more influence in the final distribution of the protein in the polymeric matrix than its molecular weight, considering that the protein is always in its solid state (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). According to the confocal microscopy findings, the protein distribution among the polymeric matrix, seems to condition the release behaviour.

Although the main anatomical and physiological parameters in humans and rabbits' eyes show small differences, the pharmacokinetic parameters (clearance, volume of distribution and half-life) in the human and rabbit eye have good correlation and comparable absolute values. So, reliable rabbit-to-man translation of ITV pharmacokinetics should be feasible. For this reason, for pharmacokinetic studies, we selected rabbits (Bösze and Houdebine 2006, Los 2008, Zahn, Volk et al. 2010, Del Amo and Urtti 2015). We have intravitreally injected 50 μ L-volume of 4 % w/v homogeneous suspension of microspheres which lead to a concentration of microspheres in the rabbit vitreous of 1.6 mg/mL according to a theoretical rabbit vitreous volume of 1.27 mL (Del Amo, Vellonen et al. 2015). In other works, higher amount of PLGA microspheres were evaluated. For example, Giordano et al used amounts of microspheres (2.5 mg, microspheres vitreous concentrations of 1.97 mg/mL) in order to study the biodegradation and the tissue reaction of microspheres intravitreally injected in rabbits. They conclude that these PLGA microspheres were not toxic to ocular tissues (Giordano, Chevez-Barríos et al. 1995). In this line, Rong et al, have explored the eye biocompatibility and the safety of PLGA/PLA microspheres through intravitreal injection in New Zealand rabbits. Intravitreal administration of different doses of PLGA/PLA microspheres were evaluated: low (2.5 mg, microspheres vitreous concentrations of 1.97 mg/mL), medium (5 mg, microspheres vitreous concentrations of 3.94 mg/mL), or high (10 mg, microspheres vitreous concentrations of 7.81 mg/mL). Examinations were performed by evaluating retinal histological and functional changes up to 12

weeks post administration. This study demonstrated that intravitreal injection of a PLGA/PLA microspheres drug delivery system resulted biocompatible and safe (Rong, Yuan et al. 2014). In the present work a small amount of microspheres was used in an attempt to combine good tolerance at long term with the need of detectable GDNF concentrations in the vitreous during 24-weeks study. However, this amount can be increased according to patient's needs.

In order to reduce the number of animals used for the study and due to protocol ethical factors, bilateral injections were done. As microspheres are locally injected in the vitreous, the GDNF released from them might be confined to the treated eye. Although it is theoretically possible that part of the active substance could reach the blood stream by crossing the blood-retinal barrier, this phenomenon depends mainly on the compound molecular weight and also on its concentration. The access of the active compound to the contralateral eye in the present work was limited by the slow release of GDNF from the microspheres as well as by its molecular weight (23,000 g/mol). In fact, other authors such as Ward et al (2007) or Ejstrup et al., (2010), have also used the contralateral eye as negative control (Ward, Khoobehi et al. 2007, Ejstrup, Kiilgaard et al. 2010).

It has been postulated that the intravitreal injection itself is sufficient to cause substantial reactive changes in Müller cells and microglia throughout the entire retina at least for the first 24 hours (Seitz and Tamm 2014). Furthermore, attending to Igarashi et al, Müller cells and astrocytes express GDNF (Igarashi, Chiba et al. 2000). It is then reasonable to hypothesize that, if activity of Müller cells and astrocytes increases, the expression of GDNF may also increase. To evaluate this point measurement of GDNF in vitreous injected only with BSS were performed. Although detectable, the analytical data resulted under the quantification limit (<3.9 pg/mL) and by hence not significant in this case. Furthermore, we also measured the GDNF vitreous concentration in control eyes injected with blank microspheres. In this sense we were able to observe an increment in this control group during the first 4 weeks of the study (values beyond 3.9 pg/mL). This low but detectable increment in endogenous might be due to the presence of microspheres themselves in the vitreous.

MSs act like reservoirs in the vitreous, and the active substance delivered from the particles diffuses in the vitreous gel, as previously reported by Veloso et al. (Veloso, Zhu et al. 1997). After that, the released molecules are distributed and eliminated. These events largely depend on the physicochemical properties of the substance and the tendency of GDNF to diffuse to the retina (Ejstrup, Kiilgaard et al. 2010). According to our results, GDNF/VitE formulation released the neurotrophic factor into the vitreous body at least for six months following intravitreal injection.

It has been reported that PLGA MSs tend to aggregate after intravitreal injection (Barcia, Herrero-Vanrell et al. 2009) which surely might influence in the release profile of the protein. Although *in vitro*, also certain tendency of aggregation can be also observed after several weeks of incubation in release media (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011), these two phenomena cannot easily be compared. Furthermore, while in the *in vitro* study the released protein is maintained in the release media until quantification, *in vivo* occurs just the opposite, and the released protein can diffuse to the tissues (retina in this case) and/or is degraded in the vitreous once released. This could explain why the sequence of rapid then slow GDNF release steps *in vitro* was not correlated with the *in vivo* GDNF release behaviour postulated after pharmacokinetic data treatments. *In vivo*, the fast release of GDNF occurring at stage 1 can be explained for the diffusion of the active substance through the pores of the polymeric matrix, followed by a slow release due to polymeric matrix bulk erosion (stage 2). The *in vivo* assay was performed over a period of 168 days (24 weeks). At that time point, according to pharmacokinetic data, not all of the loaded GDNF had been released from MSs. It is possible that the remaining GDNF could have resulted in an extended second stage, although this should be experimentally confirmed.

Because of the potency and mechanism of action, the concentrations of neurotrophic factors needed to provide neuroprotection are low (Brodski, Vogt Weisenhorn et al. 2002). *In vitro*, the EC_{50} of GDNF that enhances dopaminergic neuron survival is 40 pg/mL (Lin, Doherty et al. 1993). This estimated minimal concentration could be previously considered by other authors as the therapeutic concentration able to promote RGC rescue in a

porcine elevated IOP glaucoma model (Ejstrup, Kiilgaard et al. 2010). These authors found that after the administration of 100 ng of GDNF in solution (bolus) into the porcine eye (vitreous volume 2.2 mL), values of the neurotrophic factor higher than the estimated minimal concentration were maintained for 15 days. However, other authors have observed neuroprotective effects for GDNF concentration in the vitreous that were lower than the estimated minimal value when it is continuously released from MSs. In fact, Ward et al. showed an increment in RGC survival in DBA/2J mice (vitreous volume 0.005 mL) after repeated injections of GDNF-loaded MSs with a total theoretical release of GDNF of 0.707 ng in two months (Ward, Khoobehi et al. 2007). The same formulation of GDNF-particles was also neuroprotective in a rat glaucoma model (vitreous volume 0.05 mL) with chronically elevated IOP (Jiang, Moore et al. 2007). MSs (0.05 mg) containing GDNF were injected into the vitreous. After nine weeks, the theoretical total release of GDNF was 1.77 ng, which provided RGC protection. Kyhn et al. demonstrated also RGC protection for 6 weeks in a pig model of acute retinal ischemia after administration of 2 mg of particles that provided a total GDNF release of 70.8 ng (Kyhn, Klassen et al. 2009). Finally, we previously demonstrated that even as little as 0.64 ng of GDNF administered by GDNF/VitE PLGA MSs in the chronic hypertension rat model of glaucoma protected RGCs for at least 11 weeks (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). In fact, we postulated that *in vitro* release rates of GDNF as low as 0.8 pg/day could be neuroprotective (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011).

Unfortunately, no GDNF quantification was performed in any of the *in vivo* studies. In the present study, we administered a total GDNF dose of 74.85 ng, which produced a high GDNF concentration, about 745 pg/mL. This was more than 18 fold higher than the estimated minimal threshold of 40 pg/mL that was detected in the rabbit vitreous for the first 28 days. According to our pharmacokinetic analysis, the *in vivo* release of the neurotrophic factor is consistent in a zero-order kinetic process that is followed by a predominant elimination step between weeks 4 and 6. After that, a second zero-order kinetic phase resulted in a low but sustained GDNF concentration, around 18 pg/mL and an estimated *in vivo* release rate of 50.2 pg/day, from day 56 until the end of the experiment.

Considering that there is no *in vivo* data concerning the therapeutic concentration of GDNF (Ward, Khoobehi et al. 2007), it is difficult to estimate the optimal dosage, especially if it is released from MSs like those that were neuroprotective for 11 weeks in a glaucoma model (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). It is then rational to consider that our MSs might be neuroprotective not only for the first 28 days, with GDNF values *in vivo* > 40 pg/mL, but also for at least six months. Extended activity *in vivo* studies should be made to confirm this hypothesis.

5. Conclusions

The method described in this work allowed for the encapsulation and controlled *in vitro* release of GDNF for at least 24 weeks. After a single injection of the novel formulation GDNF/VitE into the rabbit vitreous, GDNF was released in a sustained fashion for at least six months.

CAPÍTULO II-CHAPTER II

Organotypic retinal cultures as a predictive tool to evaluate short and long-term neuroprotection induced by GDNF/VitE-PLGA microspheres

ABSTRACT

An organotypic culture of neonatal rat retina has been validated as a platform to evaluate *ex vivo* tolerance and neuroprotection of GDNF/VitE-loaded microspheres.

Microspheres (MSs) were prepared using an S/O/W emulsion solvent extraction-evaporation technique and were *in vitro* characterized. PN9DIV7 and PN10DIV20 organotypic cultures from wild type (*wt*) rat retinas were developed for analysis of candidate therapeutic substances. Cultures were classified into different groups according to the applied treatment: GDNF-VitE20 MSs, GDNF-VitE40 MSs, VitE20 MSs, VitE40 MSs, blank (non-loaded) MSs or kept as untreated control. Retinal sections were analyzed using immunohistochemistry and transferase dUTP nick end labeling (TUNEL).

PN9DIV7 cultures showed that GDNF-VitE20 MSs ($1.06 \pm 0.61\%$) and GDNF-VitE40 MSs ($1.06 \pm 0.52\%$) remarkably reduced the number of neuronal cell death when compared to VitE20 MSs ($1.74 \pm 0.78\%$), VitE40 MSs ($2.85 \pm 0.44\%$), blank MSs ($3.71 \pm 2.61\%$) and control ($2.70 \pm 0.76\%$) ($p < 0.05$). This neuroprotective effect was also observed in photoreceptor cells in PN10DIV20 cultures. In terms of safety, blank MSs did not show any cytotoxic effect.

We have shown for the first time a novel platform based on an *ex-vivo* retina model that allows the determination of tolerance and efficacy of intraocular drug delivery systems (microspheres).

KEYWORDS

Retinal organotypic cultures, Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres, antioxidants, α -tocopherol (vitamin E), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neuroprotection.

1. Introduction

Neurotrophic factors, such as glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or ciliary derived neurotrophic factor (CNTF) have been proved to exhibit neuroprotective effects on retinal neural cells and have been demonstrated to rescue photoreceptors (PR) (Azadi, Johnson et al. 2007, Del Rio, Irmeler et al. 2011). In particular, GDNF is a potent neurotrophic factor able to promote neuronal survival, neurite outgrowth, cell differentiation, and cell migration of many types of neurons within the central and peripheral nervous systems (Airaksinen and Saarma 2002, Allen, Watson et al. 2013). It is a glycosylated, disulfide-bonded homodimer that is a distantly related member of the transforming growth factor-beta superfamily. GDNF activates intracellular signalling pathways through the receptor tyrosine kinase (RET) which is activated when the GDNF binds to the GDNF-family receptor α (GFR α) (Airaksinen and Saarma 2002). Direct delivery of GDNF into the eye in neurodegenerative diseases of the posterior segment enhances the survival of a variety of neurons in the retina, including retinal ganglion cells (RGCs) and PR (Jiang, Moore et al. 2007, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011, Del Rio, Irmeler et al. 2011).

It is also known that the development of retinal degenerative pathologies is accompanied by oxidative stress. For this reason, the use of antioxidant substances can be beneficial and could result of interest in the treatment of these pathologies (Larrosa, Veloso et al. 1997, Engin 2009, McManus, Murphy et al. 2014). Since several years ago, a lot of efforts have been done to find effective treatments with active substances (alone or in combination) for the treatment of chronic degenerative diseases of the posterior segment (Wyględowska-Promienska, Piotrowska-Gwozdz et al. 2015, Hussain and Ciulla 2016, Villegas, Aranguren et al. 2017). The combination of the neuroprotective agent GDNF with an antioxidant substance in a drug delivery system may indeed prevent neuronal loss in chronic retinal diseases and could also represent a promising strategy of ocular therapy in neurodegenerative pathologies.

The average success rate for compounds that pass through preclinical screening of drug development and gets approved by the European and/or the US regulatory authorities is approximately 11%, being the major causes of attrition in the clinic the lack of efficacy (30%) and safety (further 30%) (Kola and Landis 2004). In order to increase the predictive power and toxicity screenings of both drug and materials and at the same time to reduce the number of animals used, more accurate *in vitro* systems are mandatory. For the same reason, translational ocular research demands reliable tools to investigate the neuroprotection of active substances and the efficacy of delivered neuroprotective agents from nano/micro-scale controlled drug delivery systems. Intraocular drug delivery systems (IODDS) based on biodegradable polymers are of considerable and growing importance. Among them, microspheres based on poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) result of great interest as they are biocompatible and biodegradable disappearing from the site of injection after delivering the active compound. PLGA degrades to its monomers (lactic acid and glycolic acid) that are readily eliminated from the body (Makadia and Siegel 2011). For intraocular administration, microspheres offer an excellent alternative to multiple intravitreal injections, avoiding the ocular complications associated with the repeated invasive procedure. Moreover, with this therapeutic approach, the neurotrophic agent is delivered near the target site. According to this, microspheres administrated directly to the back of the eye have potential value in treating chronic ocular diseases. This system can provide prolonged and sustained therapeutic concentrations of active substances for ocular targets, extending its vitreous permanence and alleviating the need of frequent injections (Herrero-Vanrell and Refojo 2001, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011).

In ophthalmic research, more reliable models for prediction of neuroprotection to the retina are necessary. The current need to evaluate the neuroprotective effects of different compounds in retinal degeneration diseases is limited by an experimental model gap that exists between animal models and dissociated retinal cell cultures. On one hand, animal models have high fidelity, but they result costly and time consuming. On the other hand, the potential to evaluate efficacy of dissociated retinal cell cultures is mainly limited

by the poor ability for reproduce *in vivo* conditions, probably due to their lack of normal cellular interactions (Bull, Johnson et al. 2011). An *in vitro* approach that allows investigation of the retina under controlled conditions is the organotypic culture. Since the work of Ames et al. in the mid twentieth century (Ames 1956, Ames and Hastings 1956, Ames and Pollen 1969), the organotypic culture of the neural retina has changed the history of neuroscience (Seigel 1999, Zhang, Fu et al. 2002). The organotypic culture is an *in vitro* model which preserves the *in vivo* cellular architecture of a tissue. In contrast to cultures of dissociated retinal cells, this *ex vivo* experimental system have the advantage of preserve three-dimensional interactions among neural cell populations and permit an strict controlled environment (Seigel 1999). Several forms of organotypic retinal cultures have been employed for decades in order to study a wide range of neurobiological processes including retinal development (Caffe, Ahuja et al. 2001, Wang, Mu et al. 2002, Zhang, Fu et al. 2002), cell death and neuroprotection (Manabe, Kashii et al. 2002, McKernan, Caplis et al. 2006), central nervous system regeneration (Bahr, Vanselow et al. 1988, Homma, Koriyama et al. 2007, Kretz, Marticke et al. 2007), electrophysiological activity (Ames and Pollen 1969, Koizumi, Zeck et al. 2007), and genetic modification (Hatakeyama and Kageyama 2002, Donovan and Dyer 2006). In particular, organotypic culture of neonatal retina has become a well-established approach that allows investigation and experimental manipulation of the retina for analysis of candidate therapeutic substances. In this sense, as organotypic culture of retina preserves their 3D structure, it would allow not only the evaluation of direct effect of active compounds on cells but also their indirect effect. For example, photoreceptor cells do not possess receptors to directly bind GDNF. Nevertheless, this neurotrophic factor induces PR rescue in animal models of retinitis pigmentosa. It has been postulated that GDNF exerts its neuroprotective effect on these cells indirectly inducing expression of several neuroprotective proteins by retinal Müller glial cells (Hauck, Kinkl et al. 2006, Del Rio, Irmeler et al. 2011, Kucharska, Del Rio et al. 2014). This fact could be detected in retina organotypic cultures. Furthermore, this opens the therapeutic alternative of applying different molecules together, targeting several pathways simultaneously, which is more likely to provide a beneficial

effect rather than monotherapy alone. Despite its interest, there is poor knowledge about the neuroprotective efficacy of drug delivery systems including more than one active substance.

In this study, we established an *ex vivo* model that allowed the application of substances microencapsulated into PLGA polymer for retinal degeneration therapy. Using slow-release MSs we have overcome limitations due to short half-life of proteins, and applying the IODDS directly on the tissue we have avoided adding or removing MSs from the explant, mimicking the intraocular application. In addition, this study allows discarding possible material toxicity under controllable conditions directly on the neural tissue. Thus, an organotypic culture of neonatal rat retinas has been established to evaluate *ex vivo* tolerance of MSs as well as short- and long-term neuroprotection of microspheres manufactured with PLGA, GDNF and VitE.

2. Materials and methods

2.1. Materials

GDNF and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for GDNF quantification (R&D Systems, Minneapolis, USA), Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) PLGA ratio 50:50 (Resomer® 503) (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, Ingelheim, Germany), Polyvinyl alcohol 72,000 g/mol (PVA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Vitamin E (α -tocopherol acetate) (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany), R16 serum-free medium (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK), proteinase K (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), Tissue Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands), Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

2.2. Microspheres elaboration

The method employed for the elaboration of GDNF/VitE-loaded PLGA microspheres was a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion-solvent evaporation technique previously described (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). In brief, an amount of GDNF (20 µg) was suspended in 20 µL or 40 µL of vitamin E via gentle sonication for 30 sec at low temperature (0°C) (Sonicator XL, Head Systems, Farmingdale, New York, USA). The suspension was then mixed with 1 mL of PLGA solution in methylene chloride (20% w/v). The so-prepared organic phase was emulsified with 5 mL of PVA MilliQ® water solution (2% w/v) in a homogenizer (Polytron® RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at 5,500 rpm for 1 min. The formed emulsion was subsequently poured onto 100 mL of an aqueous PVA solution (0.1%) and maintained under constant agitation for 3 hours to allow organic solvent evaporation. Once formed, microspheres were washed with MilliQ® water to eliminate PVA, filtered and freeze-dried. The microspheres were sterilized by gamma irradiation (dose of 25 kGy) at low temperature (-78°C) previously described (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012) and kept at -20°C under dry conditions until use. Depending on their initial composition formulations were named as follows: (1) 20 µg GDNF/20 µL VitE-loaded PLGA microspheres as GDNF-VitE20 MSs; (2) 20 µg GDNF/40 µL VitE-loaded PLGA microspheres as GDNF-VitE40 MSs; (3) 20 µL VitE-loaded PLGA microspheres as VitE20 MSs; (4) 40 µL VitE-loaded PLGA microspheres as VitE40 MSs and (5) non-loaded PLGA microspheres as blank MSs (Fig. 1). VitE20 MSs, VitE40 MSs and blank MSs were elaborated following the same protocol than the one employed for protein loaded MSs.

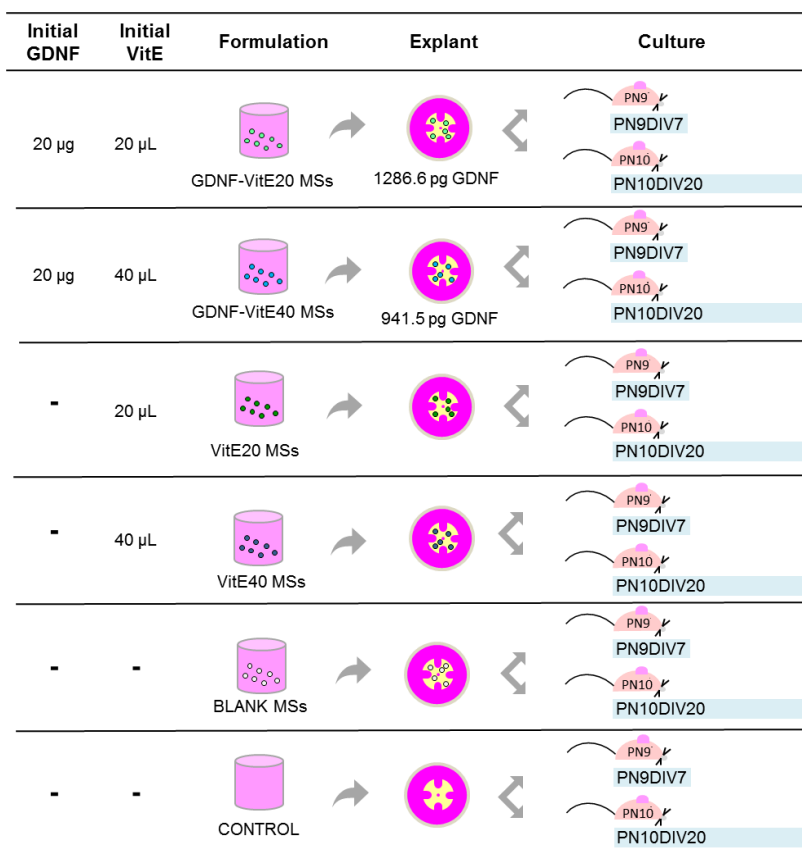


Fig. 1. The figure shows the different treatment regimens, specifying: formulation [(1) 20 µg GDNF/20 µL VitE-loaded PLGA microspheres; GDNF-VitE20 MSs, (2) 20 µg GDNF/40 µL VitE-loaded PLGA microspheres, GDNF-VitE40 MSs, (3) 20 µL VitE-loaded PLGA microspheres, VitE20 MSs, (4) 40 µL VitE-loaded PLGA microspheres, VitE40 MSs, (5) unloaded microspheres, BLANK MSs and (6) untreated control]; initial quantity of GDNF (µg) and VitE (µL) employed for formulations elaboration; initial dose of GDNF (pg) administrated to each retinal explant; organotypic culture employed for each condition: short-time explant culture [explanted post-natal day 9 (PN9) and cultivated 7 days *in vitro* (DIV7)] and long-term explant culture [explanted post-natal day 10 (PN10) and cultivated 20 days *in vitro* (DIV20)].

2.3. Microspheres characterization

2.3.1. Production yield percentage (PY%)

The PY% of each formulation was calculated as the percentage of MSs weight divided by the total amount of polymer, drug, and VitE initially used in the formulation process.

$$\text{PY\%} = \frac{\text{weight of microspheres}}{\text{total amount of polymer, protein and VitE}} \times 100$$

2.3.2. Mean particle size and particle size distribution

The mean particle size and particle size distribution were measured by light scattering in a Microtrac® S3500 Series Particle Size Analyzer (Montgomeryville, PA, USA).

2.3.3. Morphological evaluation

The external morphology of freeze-dried MSs was evaluated by scanning electron microscopy (Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were gold sputter-coated prior to observation.

2.3.4. Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency was calculated as the actual fraction of a theoretical 100% efficiency. For the quantification of protein entrapment, 5 mg of GDNF/VitE-loaded microspheres of each formulation (GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs) were dissolved in methylene chloride (0.7 mL). Then, 0.7 mL of the reactive diluent composed of phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 and BSA 1% provided in the ELISA Kit (DY995 R&D System) was added. After vigorous mixing, the heterogeneous system was centrifuged (12,000 rpm, 15 min, 4°C), and the aqueous phase extracted. The so-performed liquid/liquid extraction was repeated four times to recover all of the encapsulated protein. Assays were performed in triplicate and GDNF content in this medium was quantified by immunoassay.

2.3.5. *In vitro* release studies

To determine the release of GDNF from the MSs, duplicate samples of 5 mg of GDNF/VitE-loaded microspheres of each formulation (GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs) were suspended in a release medium composed of 1.5 mL of PBS (pH 7.4 isotonic with NaCl) containing BSA (1%) and Azide Na (0.02%) as preservative. LoBind Eppendorf® vials were used in all cases. Samples were maintained under a constant agitation speed of 100 rpm (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd, Avon, UK) at 37°C. At pre-set times (1h, 24h and once a week until the end of the assay) the microsphere suspensions were gently centrifuged (5,000 rpm for 5 min) and the supernatants were recovered and replaced by the same volume of fresh medium. If necessary, aliquots from supernatant were diluted with the reactive diluent provided in the ELISA kit (DY995 R&D System) to be quantified by the ELISA technique.

2.4. Animals

All animals were handled according to the protocols compliant with § 4 paragraph 3 of the German law on animal protection, which were reviewed and approved by the "Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde" (Anzeige/Mitteilung nach 1 4 vom 12.06.12). All experiments were carried out in accordance with the European Council Directive 86/609/EEC, and with ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Wild-type (*wt*) rats (CDH IGS Rat; Charles River, Germany) were used for the study. Animals were kept in an air-conditioned room on a 12-h light–dark cycle, food and water *ad-libitum*, and were used irrespectively of gender. The day of birth was defined as post-natal day (PN) 0.

2.5. Animal preparation and retina explant culture

Retinas from wild type (*wt*) rats were isolated from different postnatal age (PN9 and PN10) with the retinal pigment epithelium attached essentially as described previously (Arango-Gonzalez, Szabo et al. 2010). Two types of organotypic retinal cultures were performed: short-time [explanted post-natal day (PN) 9 and cultivated 7 days *in vitro* (DIV7): PN9DIV7] as well as long-term [explanted post-natal day (PN) 10 and cultivated 20 days *in vitro* (DIV20): PN10DIV20] retinal explant cultures. Briefly, animals were euthanized by over-exposure to CO₂ and decapitated. The eyes were freshly enucleated in aseptic environment and thereafter were incubated at 37°C for 15 min in R16 serum-free medium (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) containing 0.12% proteinase K (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Subsequently they were transferred to R16 medium containing 20% of fetal calf serum (FCS) for 5 min to stop proteinase K activity and the eyes were dissected. The anterior segment, lens, vitreous body, sclera, and choroids were carefully removed. The retinas with retinal pigmented epithelium were cut at four edges and explanted onto a 0.4 µm polycarbonate membrane (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) with the vitreal side oriented upwards. The insert was placed into a six-well culture plate with 1 mL of the supplemented medium. The so-prepared explants were exposed to different homogeneous microspheres suspensions in nutrient medium. The different treatments are collected in Fig. 1. For this, a suspension of microspheres was prepared in R16 medium (0.5 % w/v) and briefly vortexed immediately before of each administration to ensure a homogeneous dispersion of microspheres. Immediately, 10 µL of suspension (0.05 mg MSs) was administered on the top of each retina on the vitreal side (Fig. 2). Retinas were incubated at 37°C and every 48 hours, 1 mL of the medium, was replaced by fresh medium. Independent culture experiments were performed on different days, rendering in total n=3–5 explants/group. Culturing was stopped by 1h fixation in 4% paraformaldehyde, washed in phosphate buffered saline (PBS), and then cryoprotected by incubation for 10, 20, and 30 min with 10%, 20%, and 30% sucrose, respectively. Explants were embedded in Tissue Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands) for cryosectioning (12 µm) using a

cryotome (CM 1850, Leica, Wetzlar, Germany) and stored at -20°C until further processing.

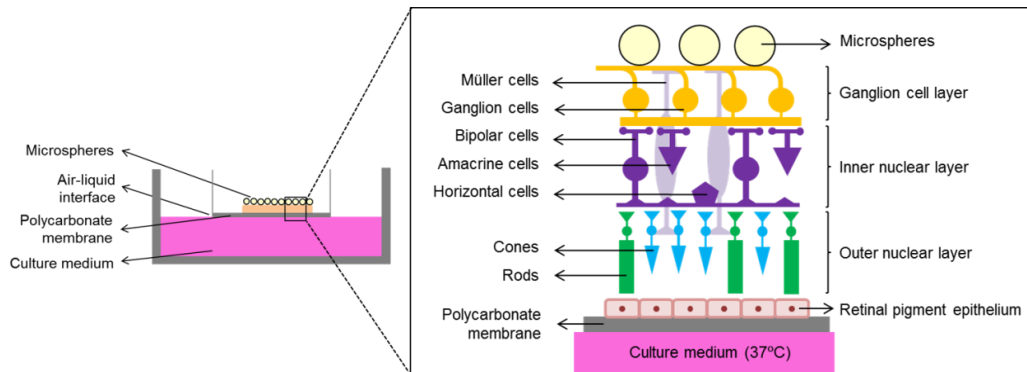


Fig. 2. Schematic representation of an organotypic retinal culture. Air-medium interface system (left) which retains the cell–cell interactions in an intact neural network was treated with PLGA microspheres administered on the top of each retina, on the vitreal side. Magnification on the right side shows in detail the different components of this system.

2.6. TUNEL labeling assay

Cell death in sections from retinal explant cultures were detected using a TUNEL assay kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Each section was stained with a fluorescein-conjugated terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling. For counterstaining of nuclei, the sections were cover-slipped using DAPI-containing Vectashield mounting medium.

2.7. Image Analysis and Statistics

Retinal explant images were acquired at 200-fold magnification (Axio Imager Z1, Zeiss, Munich, Germany). For each section, subsets (regions of interest) were defined and analysed with Definiens Developer XD 2 software

(Definiens AG, Munich, Germany). A specific rule set was developed to analyze the images as described previously (Del Rio, Irmeler et al. 2011). The total number of cells was determined by measuring the area of the outer nuclear layer (ONL) and dividing it through the average cell size. For calculation of percentage of TUNEL positive cells, the number of stained cells was divided by the total number of cells in ONL. Statistical comparisons among different experimental groups were done by unpaired t-test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software (San Diego California USA, www.graphpad.com). Error bars indicate standard deviation (SEM); levels of significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Microsphere elaboration and characterization

The production yield percentage obtained with this microencapsulation procedure rendered values of $76.3 \pm 7.9\%$ for GDNF-VitE20 MSs and $72.5 \pm 8.3\%$ for GDNF-VitE40 MSs. The largest population of microspheres corresponds to a 20-40 μm range. The mean particle size was $25.0 \pm 0.13 \mu\text{m}$ for the GDNF-VitE20 MSs and $21.2 \pm 1.2 \mu\text{m}$ for GDNF-VitE40 MSs (Fig. 3 insets). From a morphological point of view, the particles were spherical and showed small pores on their surface (Fig. 3).

The percentage of encapsulated GDNF in the MSs was significantly higher ($p < 0.01$) when the formulation included 20 μL of α -tocopherol compared with the GDNF-VitE40 MSs formulation, with values of $28.18 \pm 1.14 \%$ ($25.73 \pm 1.04 \text{ ng GDNF/mg MSs}$) and $22.42 \pm 0.59 \%$ ($18.83 \pm 0.49 \text{ ng GDNF/mg MSs}$) respectively.

The cumulative release profiles of GDNF obtained for formulations prepared with 20 μL and 40 μL of vitamin E was established for 3 weeks (Fig 3). The GDNF sustained-release profile was characterized by an initial burst release

after first 24 hours of 67.95 ± 5.15 % (17.48 ± 1.33 ng/mg MSs) and 75.40 ± 10.44 % (14.20 ± 1.97 ng/mg MSs) of the total encapsulated protein for GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs respectively. After the initial burst, the neurotrophic factor was delivered from both formulations in a controlled fashion within 21 days at similar release rates. During the first seven days GDNF was released at 490 pg GDNF/mg MSs/day for GDNF-VitE20 MSs and 440 pg GDNF/mg MSs/day for GDNF-VitE40 MSs respectively. From that time point until the end of the study a slower release was observed resulting in values of 68.2 pg GDNF/mg MSs/day for GDNF-VitE20 MSs and 50.0 pg GDNF/mg MSs/day for GDNF-VitE40 MSs respectively.

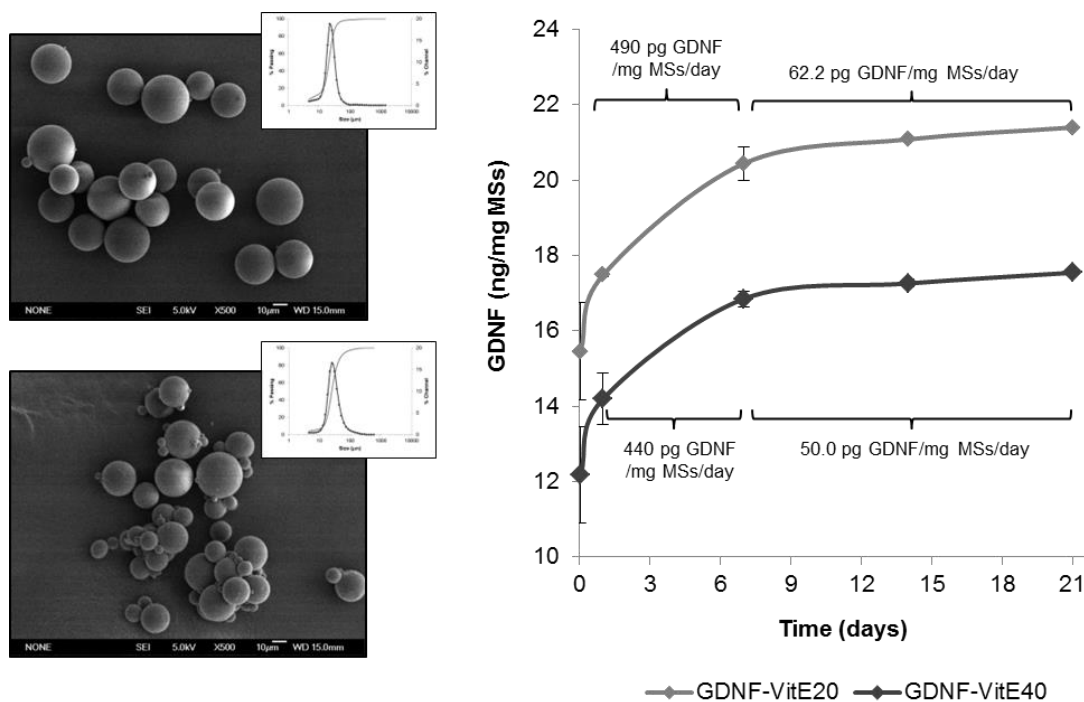


Fig. 3. Scanning electron microscopy images of different GDNF-loaded microspheres: **(A)** GDNF-VitE20 MSs (20 μ g GDNF, 20 μ L VitE), **(B)** GDNF-VitE40 MSs (20 μ g GDNF, 40 μ L VitE); Insets: Particle size distribution. **(C)** Cumulative *in vitro* release of GDNF (ng/mg MSs) over 21 days from GDNF-VitE20 MSs formulation and from GDNF-VitE40 MSs formulation. Release media: PBS (pH 7.4) with 1% BSA and 0.02% Na azide. The release rate (pg GDNF/mg MSs/day) for GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs during the first seven days and from that time point until the end of the study is also represented.

3.2. Tunel assay

In order to study the tolerance and efficacy of each microparticulate formulation on cell survival in retina organotypic cultures, TUNEL staining was performed directly on vertical sections of explants and evaluated a two different time points.

GROUP	N	PN9DIV7	PN10DIV20
GDNF-VitE20 MSs	3	1.06 ± 0.61*	1.16 ± 0.39
GDNF-VitE40 MSs	3	1.06 ± 0.52*	0.33 ± 0.19*
VitE20 MSs	3	1.74 ± 0.66	1.11 ± 0.78
VitE40 MSs	3	2.85 ± 1.07	1.24 ± 0.64
BLANK MSs	3	3.71 ± 1.13	1.31 ± 0.51
CONTROL	3	2.70 ± 0.94	1.73 ± 0.67

Table 1. Apoptotic rate (%) of photoreceptors in the ONL of each group [(1) GDNF-VitE20 MSs, (2) GDNF-VitE40 MSs, (3) VitE20 MSs, (4) VitE40 MSs, (5) BLANK MSs and (6) CONTROL] after a short-time explant culture (PN9 DIV7) and long-term explant culture (PN10 DIV20). All values are mean ± SD (*p<0.05).

The results for TUNEL staining in the ONL after 7 days in culture are shown in Fig. 4 and Table 1. As expected, TUNEL-positive cells were found in the ONL of the non-treated retinas in the short term culture (PN9DIV7), with a cell death rate of 2.70 ± 0.76 % (mean ± SD). Also, in the GDNF free groups, high cell death rate values (2.85 ± 0.44 % in the VitE40 MSs group, 1.74 ± 0.78 % in the VitE20 MSs group and 3.71 ± 2.61 % in blank MSs group) were observed. The number of TUNEL-positive cells in both GDNF/VitE treated groups resulted significantly lower ($p < 0.05$) in the ONL with a rate of 1.06 ± 0.61 % and 1.06 ± 0.52 % for GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs respectively when compared to the control group. However, no differences were found between the GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs groups, or between the control, blank MSs, and VitE MSs groups in the short-term analysis.

Similarly, no differences were found between the control group and blank MSs group in the number of TUNEL-positive cells found in the INL in PN9DIV7 cultures ($0.53 \pm 0.92 \%$ and $0.45 \pm 0.60 \%$ respectively). However, unlike the ONL, cell death in the INL in both GDNF groups ($P < 0.01$ for GDNF-VitE20 MSs with values of $0.09 \pm 0.18 \%$ and $p < 0.05$ for GDNF-VitE40 MSs with values of $0.02 \pm 0.04 \%$) as well as VitE MSs groups ($0.06 \pm 0.14 \%$ for GDNF-VitE20 MSs and $0.06 \pm 0.08 \%$ for GDNF-VitE20 MSs) ($p < 0.05$) resulted significantly lower when compared to control group.

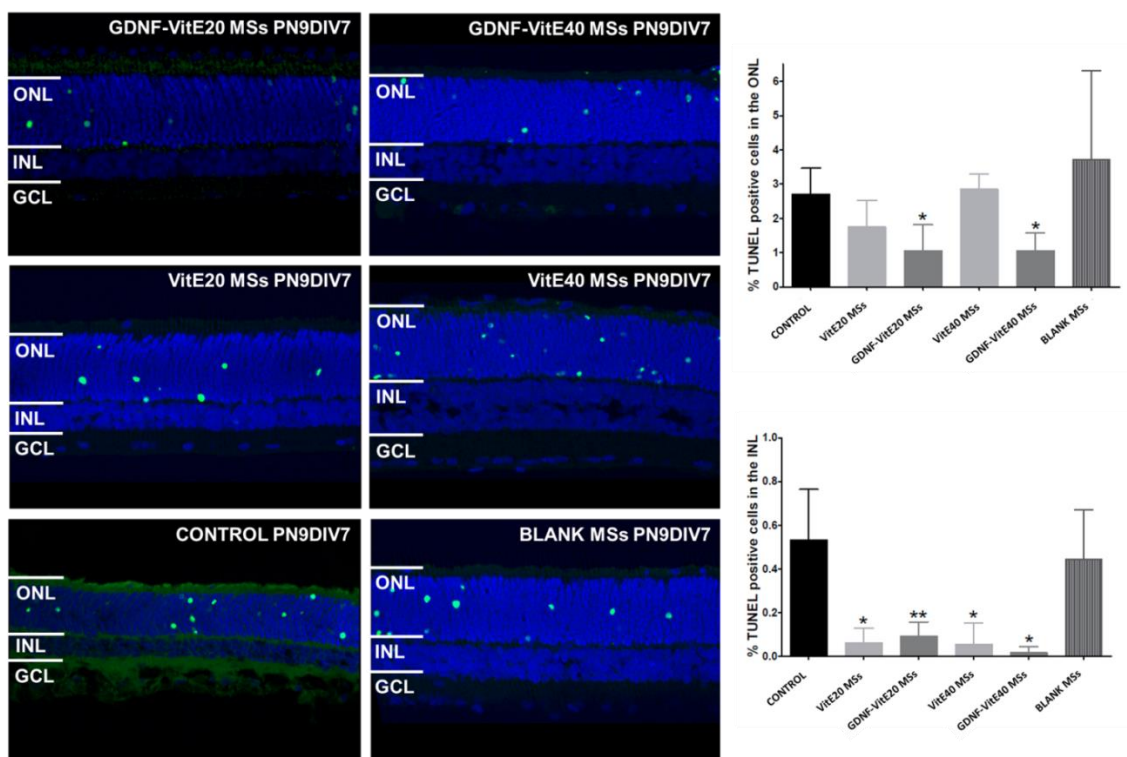


Fig. 4. [1] Apoptotic cells were detected using the biochemical assay TUNEL in the short term culture after seven days and TUNEL-positive cells were detected in the ONL and INL in all group included, i.e. GDNF-treated retinas (**A–B**), retinas exposed to VitE microspheres (**C–D**), control (**E**) and BLANK microspheres (**F**). Images were taken at 200 magnification and are representative for at least three independent experiments. **[2]** Percentage of TUNEL-positive cells in the ONL compared with total number of ONL cell nuclei for each condition (* $p < 0.05$) in the short term culture (**G**) and percentage of TUNEL-positive cells in the INL compared with total number of INL cell nuclei for each condition (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) in the short term culture (**H**).

To evaluate long term neuroprotection, explanted retinas were maintained with the different treatments for 20 days (PN10DIV20). TUNEL staining in the ONL is summarized in Fig. 5 and Table 1. TUNEL-positive cells were observed in the ONL for all groups (ranging between 1.11% and 1.73%) except in the GDNF-VitE40 treated explants with a value of $0.33 \pm 0.11\%$ that resulted significantly lower ($p < 0.05$) when compared to the control group.

The values of cell death in the inner retina in the PN10DIV20 cultures were very low. Similar to the finding observed in the INL of short term study, no effect of PLGA blank microspheres was observed, with values statistically similar to control retinas. Also very low values of % TUNEL positive cells were observed for retinas treated with GDNF/VitE MSs and VitE MSs, without significant differences among the different groups.

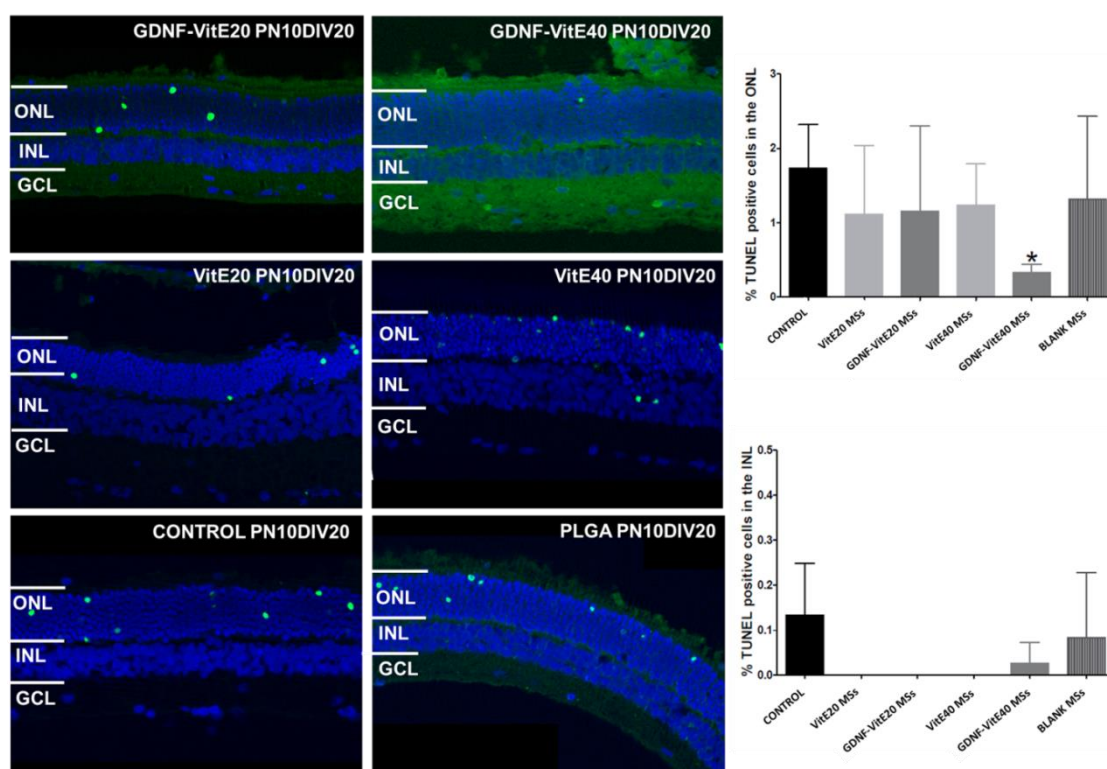


Fig. 5. [1] Apoptotic cells were detected using the biochemical assay TUNEL in the long term culture after twenty days and TUNEL-positive cells were detected in the ONL and INL in all group included, i.e. GDNF-treated retinas (**A–B**), retinas exposed to VitE microspheres (**C–D**), control (**E**) and BLANK microspheres (**F**). Images were taken at 200 magnification and are representative for at least three independent experiments. **[2]** Percentage of TUNEL-positive cells in the ONL compared with total number of ONL

cell nuclei for each condition (* $p < 0.05$) in the long term culture **(G)** and percentage of TUNEL-positive cells in the INL compared with total number of INL cell nuclei for each condition (* $p < 0.05$) in the long term culture **(H)**.

3.3. Cell rows counting in the INL and in the ONL

Results in PN9DIV7 and PN10DIV20 cultures are displayed in Fig. 6. No significant differences were observed among the different treatments after 7 days of incubation in the ONL. In this short-term study (PN9DIV7), only retinas treated with GDNF-VitE40 resulted in a significant survival of cells in the INL, rendered values of 6.9 ± 1.1 rows ($p < 0.05$). In this case the treatment with GDNF-VitE20 led to a survival of 5.5 ± 0.6 rows of cells nuclei.

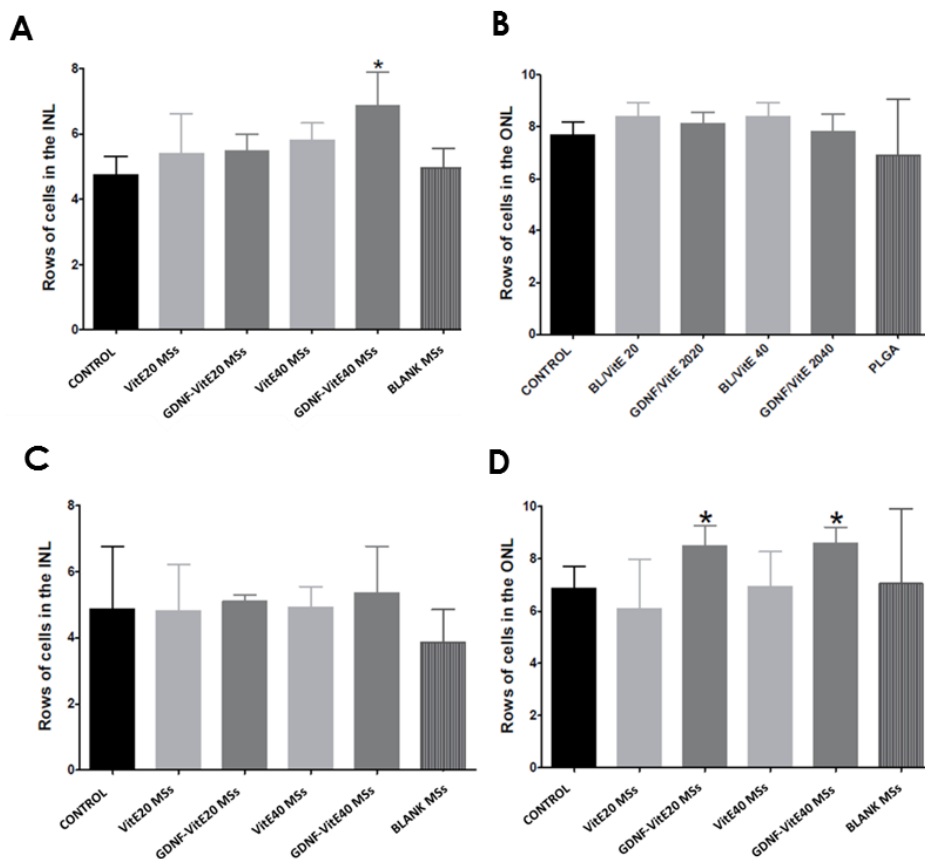


Fig. 6. Counting of cell rows: INL **(A)** and ONL **(B)** of a short-term cultures for each condition (* $p < 0.05$); INL **(C)** and ONL **(D)** of a long-term cultures for each condition (* $p < 0.05$).

Interestingly, after 20 days in culture (PN10DIV20) the neuroprotective effect of GDNF-VitE20 and GDNF-VitE40 MSs was observed as both treatments resulted in a significantly higher number of photoreceptor rows. Thus, addition of GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs led to a significant higher survival with values of 8.5 ± 0.77 and 8.6 ± 0.63 rows respectively ($p < 0.05$) in the comparison with other treatments. On the other hand, no sustained beneficial effect was found by the other treatment paradigms.

In the INL no long-lasting neuroprotection was observed by retinas receiving the different treatments showing similar number of cell rows (5.1 ± 0.7 for GDNF-VitE20 MSs, 5.4 ± 0.9 for GDNF-VitE40 MSs, 4.8 ± 0.7 for VitE20 MSs, 4.9 ± 0.8 for VitE40 MSs, 3.9 ± 0.3 for blank MSs and 4.9 ± 0.6 for control group).

4. Discussion

At the end-stage of most neuronal degeneration diseases such as retinitis pigmentosa, glaucoma and age related macular degeneration, the loss of retinal neural cells is considered to be inevitable. This fact induced irreversible and progressive vision loss in patients (Chinskey, Besirli et al. 2014, Farinelli, Perera et al. 2014, Bo, Ma et al. 2015, Nuschke, Farrell et al. 2015). Administration of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) has demonstrated to delay photoreceptor cells death as well as rescue their function in a mouse animal model of retinitis pigmentosa (Frasson, Picaud et al. 1999). However, GDNF does not exert its neuroprotective activity directly on PR neurons, but transmits it indirectly by inducing expression of neurotrophic factors in retinal Müller glial cells. This is also the case of osteopontin (OPN) and cysteine-rich protein 61 (Cyr61/CCN1), two proteins that protect photoreceptors in retina explants of retinal degeneration mice, and are known to be increased after GDNF-stimulation to Müller glial cells (Del Rio, Irmeler et al. 2011, Kucharska, Del Rio et al. 2014).

Nevertheless, due to its short-half life, exogenous administered GDNF (in bolus) remained only several hours (vitreous humor half-life 37h) (Ejstrup, Kiilgaard et al. 2010). Taking into account the chronicity of most neuronal

degeneration pathologies, frequent administration would be needed to maintain effective concentrations in the target site for long periods of time. In order to overcome this limitation and decrease the number of administrations, the development of controlled delivery systems offers the advantage of slow, locally and sustained release of neurotrophic substances, (Benoit, Faisant et al. 2000, Catrina, Gander et al. 2013).

Interest on nano- and microtechnology in ophthalmology is growing. There is an urgent need to develop novel pharmaceutical formulations to give response to the treatment of chronic neurodegenerative diseases. Also, the integration of new tools and models for early prediction of IODDS efficacy and possible toxicity in the retina prior to transfer these devices to actionable targets *in vivo* are primordial. To address this issue, we adapted a well established organotypic culture system of the rat retina (Arango-Gonzalez, Szabo et al. 2010) to assess the tolerance of the microdevice as well as the efficacy of different formulations of PLGA microspheres entrapping GDNF and VitE. This novel approach allowed a systematic evaluation of (1) the effect of drug delivery systems loading neuroprotective active substances, (2) the benefit of including a combination of potential neuroprotective compounds as well as (3) possible toxicity of the device under controllable conditions.

According to our results, the two assayed formulations containing GDNF and VitE allowed the release of GDNF in a controlled fashion at least for 21 days (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs formulations shown an adequate particle size and morphology (spherical) for being injected as a suspension through the needles used for intravitreal administration (25G-32G) (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). The porous surface of the microspheres has been previously reported and it is attributed to the rapid removal of organic solvent during the elaboration of the formulation (Al Haushey, Bolzinger et al. 2007). The biodegradable polymer employed in this work has been used in FDA approved devices and has been shown to be well tolerated in the eye (Short 2008, Rong, Yuan et al. 2014). The oily additive (vitamin E) with antioxidant properties was included as it could reduce the oxidative stress, which causes a profound damage to the retina through dysregulation of intracellular physiology leading to neurodegenerative and,

potentially, vascular dysfunction. Also, from a technological point of view, the presence of the oil allows the incorporation of GDNF in its solid state assuring the maintenance of the integrity of the neurotrophic factor during handling and sterilization (Martinez-Sancho, Herrero-Vanrell et al. 2003, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). In the present work, we have observed that the incorporation of less amount of vitamin E in the GDNF-VitE20 MSs formulation leads to a higher encapsulation efficiency compared to GDNF-VitE40 MSs formulation. The reason could be related with the oil leakage during solvent-extraction emulsion process, and of the subsequent formation a continuous surface barrier which might reduce the protein entrapment. The *in vitro* burst of GDNF from PLGA microspheres is also influenced by the presence of the oily additive and resulted higher for the formulation GDNF-VitE40. Nevertheless, the inclusion of different amounts of vitamin E did not affect the release rate of GDNF that resulted in similar values for both formulations from day 1 to the end of the assay.

Regarding to *ex-vivo* studies, the neonatal rat retina represents an ideal model to study tolerance and efficacy of active substances as well as biomaterials or devices. Retinal tissue has been successfully cultured from a variety of species being rodents the most common source (Kaempf, Walter et al. 2008, Carrasco, Navascues et al. 2011, Niyadurupola, Sidaway et al. 2011). Major events of retinal development and differentiation occur in the first two weeks of postnatal life (Young 1984, Horsburgh and Sefton 1987). For this reason, we have selected short-term (PN9DIV7) as well as long-term (PN10DIV20) cultures in order to create maximum differences between degenerating and surviving of retinal neural layers. According to this platform, the potential toxicity of the device (non-loaded microspheres) and the comparison on the efficacy of different treatments has been evaluated. Also the potential benefit of the inclusion of different amounts of an antioxidant (VitE) in the drug delivery system has been performed to elucidate the effect of combined therapy with GDNF in the microspheres. In the neonatal rat retina explants, a higher cell death rate was observed at seven days post cultured in the ONL of control, blank MSs and VitE MSs groups when compared to GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs groups. These results confirm the neuroprotective effect of the combination of

GDNF/VitE on photoreceptors survival after one week of treatment (PN9DIV7). Similarly, the quantification of photoreceptor cells (represented by the number of cell rows in the ONL) in PN10DIV20 cultures evidenced that both formulations of microspheres including GDNF and VitE (GDNF-VitE20 MSs and GDNF-VitE40 MSs) increased significantly their survival compared to control, VitE MSs and blank MSs groups. The decrease of the number of dying cells in the short-term organotypic culture treated with GDNF-loaded VitE PLGA MSs is directly correlated with the survival of photoreceptors rows in a long-term organotypic cultures. This fact demonstrates that effective neuroprotection in retinal neural cells will likely require the sustained delivery of the active agent for prolonged periods of time. In addition, the direct administration of PLGA microspheres was well tolerated during the whole culturing period and the organotypic cultures were useful to discard possible material toxicity under controllable conditions.

It is important to underline that TUNEL staining in the ONL in PN10DIV20 cultures was useful to discern between the two GDNF-loaded formulations prepared with different amounts of VitE. Significant lower cell death obtained for GDNF-VitE40 MSs compared to the results observed in all the other groups. Taking into account that both formulations of microspheres released GDNF at similar rates, the beneficial effect observed in the explants treated with GDNF-VitE40 MSs can be attributed to the antioxidant agent. The result obtained in this work suggests that the presence of a higher amount of vitamin E in this formulation could inactivate the free radicals produced by photoreceptor cells in response to the stress due to the culture preparation (Terrasa, Guajardo et al. 2009, Bhatt, Groeger et al. 2010). However, this last hypothesis might be confirmed in future studies.

5. Conclusions

The novel platform using an ex-vivo retina model allow to determine the tolerance and efficacy of intraocular drug delivery systems such as microspheres. This model offers a well preserved and controlled system to assess the effect of different active compounds included in PLGA microspheres.

According to the results reported in our study it can be concluded that: (1) Organotypic cultures of neonatal rat retina offer an excellent tool to evaluate the tolerance of drug delivery systems such as PLGA microspheres; (2) The formulation containing GDNF and a higher amount of VitE in PN9DIV7 as well as in PN10DIV20 organotypic cultures, prolonged the survival of photoreceptor cells postulating the benefit of the addition of antioxidant substances in the GDNF controlled therapy; (3) The protective role of α -tocopherol as an antioxidant in combination with GDNF was evident and it could be helpful in the treatment of ocular diseases in which oxidative stress is involved.

CAPÍTULO III-CHAPTER III

Intravitreal controlled co-delivery of GDNF and melatonin preserves photoreceptors in rhodopsin knockout mouse

ABSTRACT

To evaluate the potential of a PLGA-based slow release formulation of GDNF alone or in combination with melatonin to rescue photoreceptors in a mouse model of retinal degeneration.

GDNF, and GDNF/melatonin-loaded microspheres (MSs) were prepared using a solid-in-oil-in-water emulsion solvent extraction-evaporation technique. A combination of PLGA and Vitamin E was used to create the microcarriers. The morphology, particle size, encapsulation efficiency and *in vitro* release profile of the microspheres were characterized. After a preliminary study of the *in vitro* rescue of human retinal progenitor cells from peroxide-induced death to determine the optimal concentration, the formulations (non loaded, GDNF and GDNF/melatonin MSs) were intravitreally administered to 3-week old rhodopsin knockout mice (7 animals per group). The neuroprotective effect was assessed by electroretinography (function) at 3, 6 and 9 weeks after the injection. The rescue of structure was determined by photoreceptor quantification at 9 weeks after the injection. Immunohistochemistry for photoreceptor, glia and proliferative markers was also performed.

The microspheres were able to deliver GDNF or to co-deliver GDNF and melatonin in a sustained manner. The intravitreal injection of GDNF or GDNF/melatonin-loaded microspheres led to partial functional and structural rescue of photoreceptors compared to blank microspheres and vehicle. No significant intraocular inflammatory reaction was observed after intravitreal injection of the microspheres.

A single intravitreal injection of GDNF or GDNF/melatonin-loaded microspheres promoted a rescue of the photoreceptors in rho (-/-) mice. These intraocular drug delivery systems enable the efficient co-delivery of several therapeutic active substances for the treatment of retinal diseases.

A microspheres formulation containing GDNF or GDNF/melatonin may serve as an effective, clinically translational treatment against retinal degeneration.

KEYWORDS

Neuroprotection, microspheres, poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), melatonin, rhodopsin knockout mice, photoreceptors, vitamin E.

1. Introduction

Many inherited trauma and age-related retinal disorders are characterized by irreversible loss of photoreceptors. These include retinal detachment (RD) (Lo, Woo et al. 2011), age-related macular degeneration (AMD) (Bhutto and Luty 2012), diabetic retinopathy (Barber, Lieth et al. 1998), glaucoma (Panda and Jonas 1992) and retinitis pigmentosa (Portera-Cailliau, Sung et al. 1994). Rod and cone degeneration occurs mainly through programmed cell death such as apoptosis, autophagy and necrosis (Lockshin and Williams 1965). The causes of photoreceptor degeneration include but are not limited to oxidative stress (Kunchithapautham and Rohrer 2007), ischemia (Osborne, Casson et al. 2004), protein misfolding (Wright, Chakarova et al. 2010), physical damage (Noell 1980) and lack of mechanical and trophical support from the neighboring photoreceptors, Muller glia and retinal pigment epithelium cells (Pierce 2001). Two major causes of gradual photoreceptor cell degeneration are considered to be the increase of reactive oxygen species (ROS) due to reduced oxygen utilization (Komeima, Rogers et al. 2006) and a decrease of neurotrophic factors from the rods (Ohnaka, Miki et al. 2012).

Neuroprotection, a mutation-independent approach to protect CNS (central nervous system) cells, has demonstrated its therapeutic potential for retinal degenerations in various animal models. Neuroprotective effects can be achieved by several routes. One of them is preserving neuronal cells from oxidation by harvesting ROS with the antioxidants (Chinsky, Besirli et al. 2014). Another well described strategy is to use neurotrophic factors that can improve retinal cell differentiation, survival, and function (Abed, Corbo et al. 2015). With these objectives, various active substances have been tested for the treatment of retinal degeneration. The usefulness of macromolecules such as glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Del Rio, Imler et al. 2011), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Zhang, Mo et al. 2009), nerve growth factor (NGF) (Rocco, Balzamino et al. 2015), ciliary neurotrophic factor (CNTF) (Kassen, Thummel et al. 2009), cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) (Lindahl, Saarma et al. 2017) and the basic fibroblast growth factor (bFGF) (Ortin-Martinez, Valiente-Soriano et al. 2014) has been previously reported. Also, low

molecular weight molecules as valproic acid (Koriyama, Sugitani et al. 2014), rasagiline (Eigeldinger-Berthou, Meier et al. 2012), melatonin (Liang, Aleman et al. 2001), N-acetyl-L-cysteine (Schimel, Abraham et al. 2011) among others have been also studied.

GDNF has been demonstrated to enhance the survival of dopaminergic (Lin, Doherty et al. 1993) and motor neurons (Chen, He et al. 2000) in the central, peripheral and autonomic nervous system. In the eye, GDNF is primarily expressed in the retina (Lucini, Maruccio et al. 2007). Several studies have shown the activity of GDNF to rescue retinal ganglion cells (RGC) even at low concentrations (Klocker, Braunling et al. 1997, Wu, Lai et al. 2004, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). Furthermore, the protective activity of GDNF has been also observed for photoreceptors, induced by the expression of certain yet unknown neurotrophic factors in retinal Müller glial cells (RMG) (Delyfer, Simonutti et al. 2005, Del Rio, Irmeler et al. 2011).

The neurohormone melatonin is synthesized in the retina and in the pineal gland of mammals through a biosynthetic pathway (Tosini and Menaker 1996). Melatonin plays an important role in retinal physiology and pathophysiology and acts as a local neuromodulator within the eye (Wiechmann and Summers 2008, Tosini, Baba et al. 2012). In human retina two subtypes of melatonin receptors (MT1 and MT2) are present, with the MT1/MT2 heteromer complex responsible of specific pharmacological target to improve photoreceptor function (Baba, Benleulmi-Chaachoua et al. 2013). In addition, melatonin has antioxidant properties with free radical scavenger activity (Marshall, Reiter et al. 1996, Hardeland 2005) shown *in vitro* (Marshall, Reiter et al. 1996, Liang, Green et al. 2004) and *in vivo* (Reiter, Tan et al. 2003). This substance has also demonstrated a neuroprotective effect on RGCs *in vitro* (Siu, Reiter et al. 1999) and a pro-survival effect on retinal pigment epithelial cells and photoreceptors (Liang, Aleman et al. 2001, Liang, Green et al. 2004, Fu, Tang et al. 2012) *in vitro* and *in vivo*. In addition, this molecule is implicated in the modulation of intraocular pressure (IOP) (Samples, Krause et al. 1988, Pintor, Martin et al. 2001) with potential usefulness in the treatment of high IOP related glaucoma (Belforte, Moreno et al. 2010).

The therapeutic approaches using growth factors vary: they may be administered as recombinant proteins (Jiang, Moore et al. 2007, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011, Del Rio, Irmiler et al. 2011), overexpressed in host cell by genetic vectors (Lipinski, Barnard et al. 2015), induced in host cells by small molecules (Kolomeyer and Zarbin 2014) or overexpressed in transplanted cells (Junyi, Na et al. 2015). We explore the sustained release of the recombinant protein GDNF, since it provides better control of ocular levels of the substance and also allows combination with other active molecules, such as antioxidants. Furthermore, taking into account the multifactorial character of the retinal diseases, the combination of neuroprotective substances with different pathways might offer an additional benefit. The main challenge in such combined neuroprotective therapy is to achieve therapeutic concentration of both compounds in the retina for an extended period of time. From the last decades the use of intraocular drug delivery systems (IODDS) based on biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) are emerging tools to provide long term delivery of active substances. Among the IODDS, microparticulate systems are gaining more attention as different amounts can be injected depending on the disease and patient needs (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014).

Our goal is to develop a microparticulate delivery system able to provide simultaneous sustained release of both neuroprotective agents (GDNF and melatonin) for a long term and evaluate the efficacy to rescue photoreceptors in a mouse model of retinal degeneration. Microspheres loaded with GDNF-PLGA/VitE and GDNF/melatonin-PLGA/VitE have been formulated and characterized. VitE has been included in the polymeric PLGA matrix in order to improve the protein encapsulation and to modulate its release from the particles (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). The GDNF-loaded PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs were tested in a well-characterized model of inherited photoreceptor degeneration - rhodopsin knockout null mouse ($\rho^{-/-}$) (Humphries, Kiang et al. 2001, Ma, Kabiell et al. 2011). Initially, this animal model shows normal retinal development followed by a failure of the outer segment (OS) to form in rod photoreceptors. From postnatal week 4 to 6, $\rho^{-/-}$ mice appear to have normal cone and no

detectable rod-derived electroretinogram (ERG). By the age of 3 months, over 90% of rod nuclei are lost. This leaves only a single, fragmented row of nuclei composed exclusively of cones. This animal model is thought to model autosomal recessive rhodopsin null mutations in humans and has been proposed for rapid testing of therapies for retinal degenerations (Rosenfeld, Cowley et al. 1992).

2. Materials and methods

2.1. Microspheres elaboration

PLGA microspheres (MSs) were prepared according to a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion-solvent evaporation technique previously described (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). Briefly, 20 µg of GDNF (R&D, Systems, Minneapolis, MN, USA) were suspended in 20 µL of VitE (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) via gentle sonication for 30 sec at low temperature (0°C) (Sonicator XL, Heat System, Inc., Farmingdale, NY, USA). Once formed, this suspension was added to (a) 1 mL of PLGA (Resomer®503, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, Ingelheim, Germany) solution in methylene chloride (20% w/v) to elaborate the GDNF-loaded PLGA/VitE MSs or (b) a solution of 20 mg of melatonin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) and 200 mg of PLGA in 1 mL of methylene chloride to prepare the GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs. The organic phase was emulsified in both cases with 5 mL of polyvinyl alcohol (PVA) 72,000 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) MilliQ® water solution (2% w/v) in a homogenizer (Polytron® RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at (a) 5,000 rpm for 1 min and (b) 6,000 rpm for 1 min. This emulsion was subsequently poured onto 100 mL of an aqueous PVA solution (0.1%) and kept under constant stirring for 3 hours, to allow organic solvent evaporation. Once formed, microspheres were washed to eliminate PVA, filtered, freeze-dried and kept at -20 °C under dry conditions until use.

2.2. Microspheres characterization

2.2.1. Production yield percentage (PY%)

The production yield percentage (PY%) of each formulation was calculated from the weight of dried microspheres (W_1) recovered and the sum of the initial dry weight of starting materials (W_2). The formula for calculation of % yield is as follows (Fu, Shyu et al. 2002):

$$PY \% = \frac{\text{Weight of MSs } (W_1)}{\text{Total weight of active substances and polymer } (W_2)} \times 100$$

2.2.2. Mean particle size and particle size distribution

The mean particle size and particle size distribution were measured by light scattering in a Microtrac® S3500 Series Particle Size Analyzer (Montgomeryville, PA, USA).

2.2.3. Morphological evaluation

The external morphology of freeze-dried microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (SEM; Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were gold sputter-coated prior to observation.

2.2.4. Encapsulation efficiency (EE%)

To determine the encapsulation efficiency of GDNF the liquid/liquid extraction method was used. Briefly, 5 mg of microspheres (GDNF-loaded PLGA/VitE as well as GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs) were dissolved in 0.7 mL of methylene chloride. Then, the same volume of the reactive diluent composed of phosphate buffered saline, pH 7.4, and 1% BSA provided in the ELISA Kit (R&D, Systems, Minneapolis, MN, USA) was added. After vigorous mixing, the heterogeneous system was settled during 10 min. Finally the

aqueous phase was extracted after phase separation (centrifugation for 11290 x g, 15 min, 4°C). The described extraction was repeated four times, in order to recover all of encapsulated protein. GDNF content in this medium was quantified by ELISA kit in triplicate. The amount of encapsulated melatonin in the microspheres was determined as follows: 10 mg of melatonin-loaded were placed in 5 mL of methylene chloride to dissolve the polymer. Then, 12 mL of ethanol were added in order to promote polymer precipitation. After vortex mixing, the samples were centrifuged at 1960 x g for 5 min and the methylene chloride:ethanolic supernatant was recovered and filtered (0.45 µm). The melatonin content in the methylene chloride:ethanol mixture was quantified by UV-Vis spectrophotometry at 278 nm.

For each active substance (GDNF and melatonin) encapsulation efficiency was calculated as follows (Fu, Shyu et al. 2002):

$$EE\% = \frac{\text{Actual active compound content}}{\text{Theoretical active compound content}} \times 100$$

2.2.5. *In vitro* release studies

To evaluate the rate of GDNF release from the microspheres, replicates of 5 mg of GDNF-loaded PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs were suspended in a release medium composed of 1.5 mL of phosphate buffered saline (pH 7.4 isotonicized with NaCl) containing 1% BSA as protein carrier and 0.02% sodium azide. LoBind eppendorf® vials were used in all cases. Samples were placed in a water shaker bath and were maintained under constant agitation 100 rpm at 37°C (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd, Avon, UK). At pre-set times (1h, 24h and once a week until the end of the assay) the microsphere suspensions were gently centrifuged (1960 x g for 5 min) and the supernatants were recovered and replaced by the same volume of fresh medium. If necessary, aliquots from supernatants were diluted with the diluent reactive provided in the ELISA kit for GDNF to be quantified by the ELISA technique.

Melatonin release was determined from 10 mg of GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs dispersed in (pH 7.4 isotonic with NaCl) in a water shaker bath and were maintained under constant agitation 100 rpm at 37°C (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd, Avon, UK). At pre-set times, 1h, 24h, 3 days and once a week until the end of the assay the supernatants were filtrated (0.45 µm) and the concentration of the released melatonin from the microspheres was measured by UV-Vis spectrophotometry at 278 nm.

2.3. *In vitro* rescue of hRPC from peroxide-induced death

To compare the ability of different formulations to rescue cells from death *in vitro* we used human retinal progenitor cells (hRPC) (Aftab, Jiang et al. 2009, Baranov, Tucker et al. 2014). hRPC were cultured as previously described (Baranov, Tucker et al. 2014) and cryopreserved at passage 14 to make a single cell work bank. For the experiment cells are thawed and plated in 96 well plates (10,000 of viable cells per well on fibronectin (Akron Biotechnology LLC, Boca Raton, FL, USA)) - coated plates (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in 200 µL of serum-free stimulation medium (Ultraculture medium, supplemented with 5 ng/mL bFGF, 5 ng/mL EGF). The flasks were incubated at standard conditions: 37°C, 5% CO₂, 3% O₂, 100% humidity. 24 hours after the plating cells were exposed to an oxidative stress by adding hydrogen peroxide to the final concentration of 25 µmolar. 1 hour after the peroxide treatment cell medium was replaced and different concentration of microspheres were added to the wells (total well volume of 100 µL). The cells were exposed to GDNF-loaded PLGA/VitE MSs, GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs, melatonin-loaded PLGA/VitE MSs, melatonin-loaded PLGA MSs and non-loaded PLGA/VitE MSs. The MSs concentrations tested were 0.09 mg MSs/mL; 0.17 mg MSs/mL; 0.34 mg MSs/mL; 0.69 mg MSs/mL; 1.38 mg MSs/mL; 2.75 mg MSs/mL; 5.5 mg MSs/mL; 11 mg MSs/mL. Basic fibroblast growth factor (highest concentration 20 ng/mL with 2 fold dilution) as a strong pro-survival factor was used as a positive control. Cell number and viability was assessed 48 hours after the treatment by Live/Dead kit (CyQuant NF, Life technologies, Carlsbad, CA, USA).

2.4. Animal procedures

For all experimental procedures, animals were treated in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, under a protocol approved by the Schepens Eye Research Institute Animal Care and Use Committee. Rhodopsin-null mice (Rho^{-/-}, Peter Humphries, Trinity College, Dublin) were used as retinal degenerative experimental recipient animals. Intravitreal injections and electroretinography recordings were performed under general anesthesia induced by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (100mg/kg and 20 mg/kg, respectively) and topical anesthesia with proparacaine drops (Alcon; Fort Worth, TX, USA). Tropicamide (Alcon; Fort Worth, TX, USA) was applied for pupil dilation. After the intravitreal injection, the eye was treated with an antibiotic gel. The same procedures were applied to control eyes. At the end of the experiment animals (12 weeks old) were euthanized by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation. To study photoreceptor rescue, 3-week old animals were randomized into five groups (n=7), that received intravitreal injection of: (1) GDNF-loaded PLGA/VitE microspheres; (2) GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE microspheres and (3) non-loaded PLGA/VitE microspheres. Left eyes were used as untreated controls in all animals. For microspheres injection procedure, 2.5 % (w/v) suspensions of microspheres were prepared in HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) and briefly vortexed immediately before each injection to ensure a homogeneous dispersion of microspheres in the injected fluid. A volume of 2 μ L of microspheres suspension were administered intravitreally to 3-week old rhodopsin knockout mice using a beveled glass needle (50 μ m internal diameter), connected to a Hamilton syringe through polyethylene tubing. In order to reduce intraocular pressure, corneal paracentesis was performed simultaneously during the injection. The function of the retina was assessed by photopic electroretinography recordings (Espion Electroretinography System; Diagnosys LLC, Lowell, MA, USA). We have recorded the ERG response from both eyes simultaneously using gold wire loop active electrodes on the cornea, a reference electrode on the forehead and the ground electrode close to the tail. The photopic ERG responses to a series

of xenon-light flashes ($25\text{cd}^*\text{c}/\text{m}^2$) presented in a Ganzfeld bowl (Diagnosys LLC, Lowell, MA, USA). The amplitude of the b-wave was defined as the absolute value from the trough of the a-wave to the peak of the first positive wave. If the a-wave was absent, the baseline to the peak of the first positive wave was measured.

2.5. Histopathological examination

Nine weeks after the injection (12 weeks of age), animals were euthanized and eyes were enucleated and fixed in Davidson solution, followed by processing and paraffin embedding. Six micron thick sections were cut in the area close to optic nerve head (ONH) and processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemical analysis (IHC). We stained the tissue for photoreceptor (recoverin, S-opsin), glial (GFAP, Glutamin sythetase, CRAL-BP) and proliferative markers (PCNA, Ki67). The photoreceptor rescue was quantified by counting the total number of cells in the outer nuclear layer at each 100 μm region, starting from the optic nerve head. Three total sections per animal, 7 eyes per group were analyzed to build a spider-plot.

2.6. Statistical analysis

In vitro experiments were repeated 3 times. *In vivo* experimental groups contained a minimum of 7 retinas per condition. The data is expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM), unless noted otherwise. Statistical significance was defined at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by using one-way ANOVA with Bonferroni testing for post-hoc comparisons or standard students T-test.

3. Results

3.1. Microspheres elaboration and characterization

The yield obtained using the above described microencapsulation method was $75.6 \pm 6.8\%$ for GDNF-loaded PLGA/VitE MSs and $71.4 \pm 2.1\%$ for GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs. In both cases the largest population of microspheres was found to be in the 20-40 μm range. The mean particle size was $21.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ for GDNF-loaded PLGA/VitE MSs formulation and slightly higher ($24.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$) for the GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs (Fig. 1 insets). SEM studies showed spherical particles with several pores located on the surface (Fig. 1).

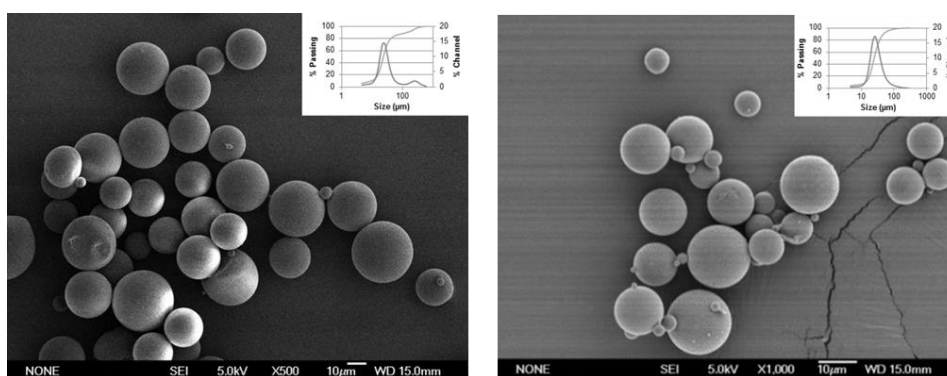


Fig. 1. Morphological and size analysis. Scanning electron microscopy images of **(a)** GDNF/VitE-loaded microspheres and **(b)** GDNF/VitE/melatonin-loaded microspheres. Inset: Particle size distribution.

The encapsulation efficiency of GDNF was $39.5 \pm 3.6 \%$ ($34.7 \pm 5.3 \text{ ng GDNF/mg MSs}$) and $26.4 \pm 0.9 \%$ ($22.1 \pm 0.8 \text{ ng GDNF/mg MSs}$) for GDNF-loaded PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs respectively. On the other hand, melatonin entrapment for the formulation GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs was $39.2 \pm 0.3 \%$ ($32.8 \pm 0.2 \mu\text{g melatonin/mg MSs}$).

The GDNF release observed within 24 hours (burst) represented 75% ($26.12 \pm 1.2 \text{ ng GDNF/mg MSs}$) of the encapsulated protein for GDNF-loaded PLGA/VitE MSs. Subsequently, a slow and continuous release occurred from day

7 to day 42 at 65 pg GDNF/mg MSs/day for GDNF-loaded PLGA/VitE MSs. After that, a moderate release step occurred from day 42 to day 56, in which the protein was released at 48 pg GDNF/mg MSs/day followed by a rapid release step at 140 pg GDNF/mg MSs/day in the next week (from day 56 to the end of the assay).

In the case of GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs also an initial burst was observed for GDNF, releasing the 44% of the loaded protein (9.7 ± 0.2 ng GDNF/mg MSs) in the first 24 h of *in vitro* test. Next, also a slow sustained release occurred from day 7 to day 35 at 36 pg GDNF/mg MSs/day. Contrary to MSs prepared without Melatonin, GDNF did not experiment any increased release at that point but was continuously released at 19 pg GDNF/mg MSs/day from day 35 to the end of the assay (day 63) (Fig 2).

Melatonin released from GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs also showed a different sequence of fast and slow release rates. After a rapid delivery during the first 7 days (burst effect at 24h of 1.23 μ g melatonin/mg MSs), a sustained release was observed from day 7 to day 14 (97 ng melatonin/mg MSs/day). After that a very slow melatonin release was observed until day 56 at a rate of 14 ng melatonin/mg MSs/day. Finally, an increase in melatonin release rate (1 μ g melatonin/mg MSs/day) was observed in the last week of the release study (Fig. 2).

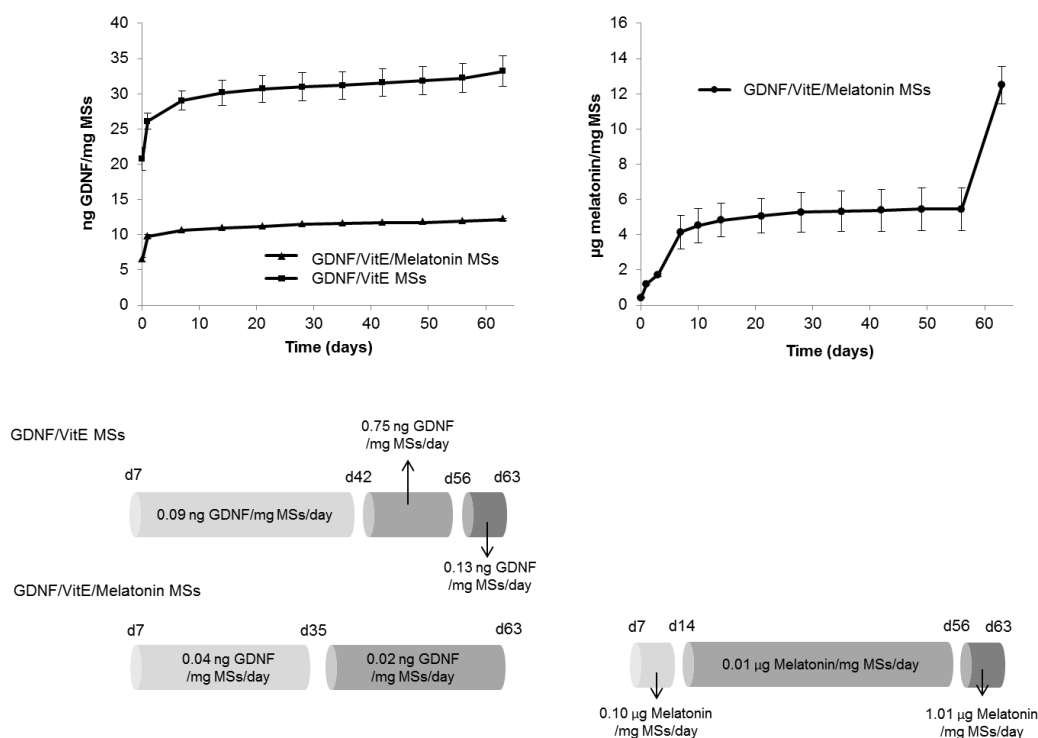


Fig. 2. *In vitro* release studies. **(a)** Cumulative release of GDNF (ng/mg MSs) over 63 days from the GDNF/VitE-loaded formulation (■) and from the GDNF/VitE/melatonin-loaded formulation (▲). Release media: PBS (pH 7.4) with 1% BSA and 0.02 % Na Azide. **(b)** Cumulative release of melatonin (µg/mg MSs) over 63 days from the GDNF/VitE/melatonin-loaded formulation (●). Release media: PBS (pH 7.4). **(c)** Schematic representation of the GDNF release rate (ng GDNF/mg MSs/day) from GDNF/VitE-loaded MSs formulation and GDNF/VitE/melatonin-loaded MSs formulation during the 63 days. **(d)** Schematic representation of the melatonin release rate (µg melatonin/mg MSs/day) from GDNF/VitE/melatonin-loaded MSs formulation during the 63 days.

3.2. Rescue of hRPC from peroxide-induced death

In order to select the optimal concentration to be tested *in vivo*, a preliminary study was performed using different concentrations of the two GDNF formulations (GDNF-PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs). In this study a solution of bFGF was used as positive control. In addition, different amounts of melatonin-loaded PLGA/VitE MSs, melatonin-loaded PLGA MSs and

non-loaded PLGA/VitE MSs were used as further controls. The percentage of surviving cells obtained for the different formulations are shown in fig. 3.

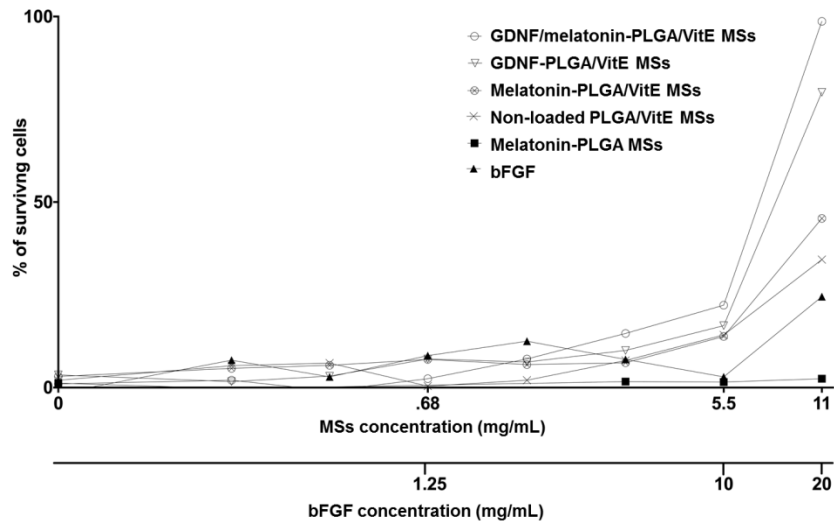


Fig. 3. *In vitro* peroxide survival assay. The dose-dependent effect of different microspheres formulations (GDNF/VitE-loaded MSs, GDNF/VitE/melatonin-loaded MSs, melatonin/VitE-loaded MSs, melatonin-loaded MSs and VitE-loaded MSs) on hRPC survival in peroxide assay. For the positive control recombinant bFGF and GDNF were used (highest concentration: 20 ng/mL). The cell survival is quantified as percentage of surviving cells compare to the control (non-exposed to peroxide) 48 hours after the treatment. All of the formulations, containing VitE, showed the profound effect on hRPC survival, with GDNF and Melatonin providing additive effect.

Formulations with GDNF led to a high percentage of cell survival: above 80% for GDNF-PLGA/VitE MSs and almost 100% for GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs. The association of GDNF with melatonin rendered higher rescue of hRPC even with estimated lower amounts of the released neurotrophic factor. The release values from the *in vitro* release studies at 48 hours were 22.38 ng GDNF/mg MSs for GDNF-PLGA/VitE MSs versus two folds lower (9.89 ng) for the GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs and 1.475 μ g melatonin/mg MSs for GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs.

3.3. Rescue of retinal structure and function in rhodopsin knockout mice

Photoreceptor quantification showed a significant rescue by both GDNF-PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs: 1.7 and 1.6 fold increase in cell number compared to the vehicle or non-treated. The architecture of retina was not affected by the treatment (Fig. 4).

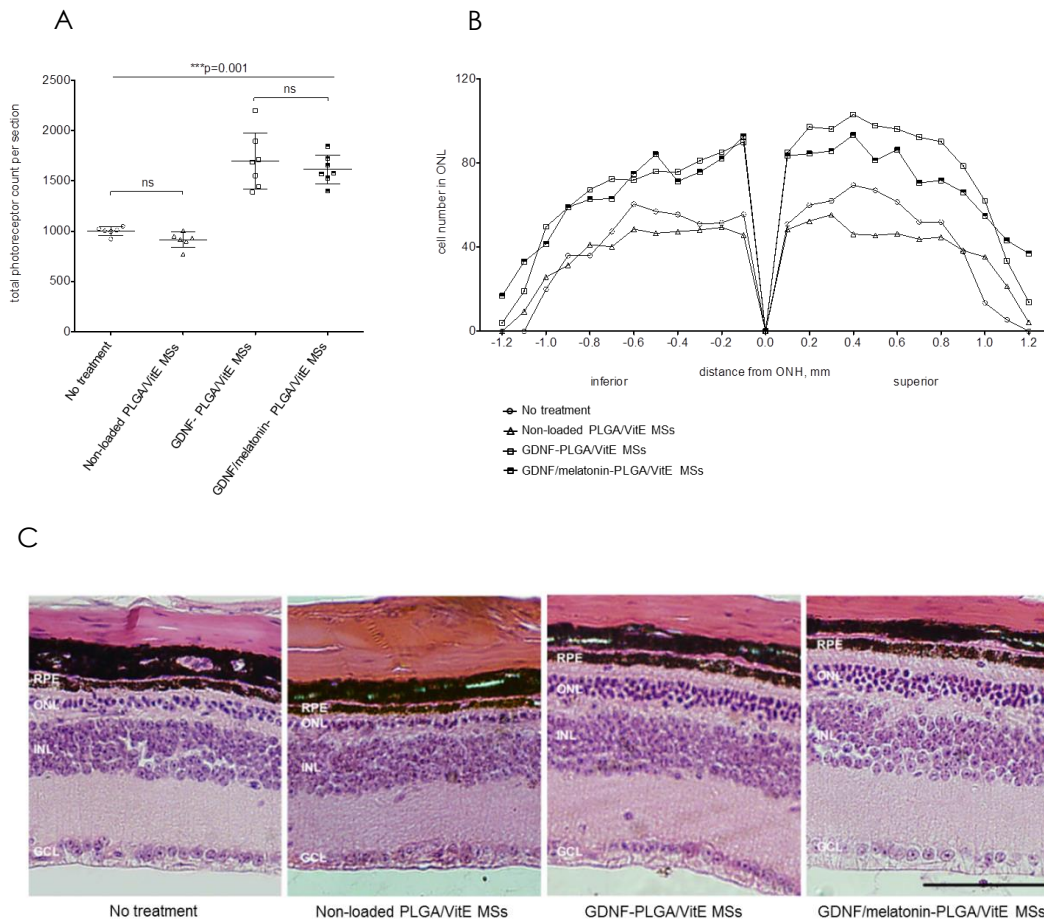


Fig. 4. The rescue of photoreceptors with microspheres. **(A)** Total photoreceptor count per section of GDNF/VitE-loaded MSs; GDNF/VitE/melatonin-loaded MSs; VitE-loaded MSs and untreated rho-/- mice. We have observed more than 1.5 fold increase in photoreceptor number in both treatment groups compared to the control groups. No difference between control groups was observed. Error bars indicate standard deviation (SEM); levels of significance: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. **(B)** The spider plot demonstrates the pan-retinal rescue of photoreceptors in both treatment groups 12 weeks after the intravitreal injection of microspheres. **(C)** H&E staining of paraffin sections of retina for GDNF/VitE-loaded MSs; GDNF/VitE/melatonin-loaded MSs; VitE-loaded MSs and untreated rho (-/-) mice. We have not observed any signs of inflammation in treated eyes at the 12 week timepoint.

We observed similar expression of photoreceptor and glial markers throughout the retina in all treatment groups. At 12 weeks of age (9 weeks of treatment), we did not observe any significant inflammation or infiltration in any of the treatment groups (Fig. 5a and Fig. 5b). The glia remained slightly reactive in all groups as detected by GFAP, Lhx2 and GS staining, an expected result for the retinal degeneration model.

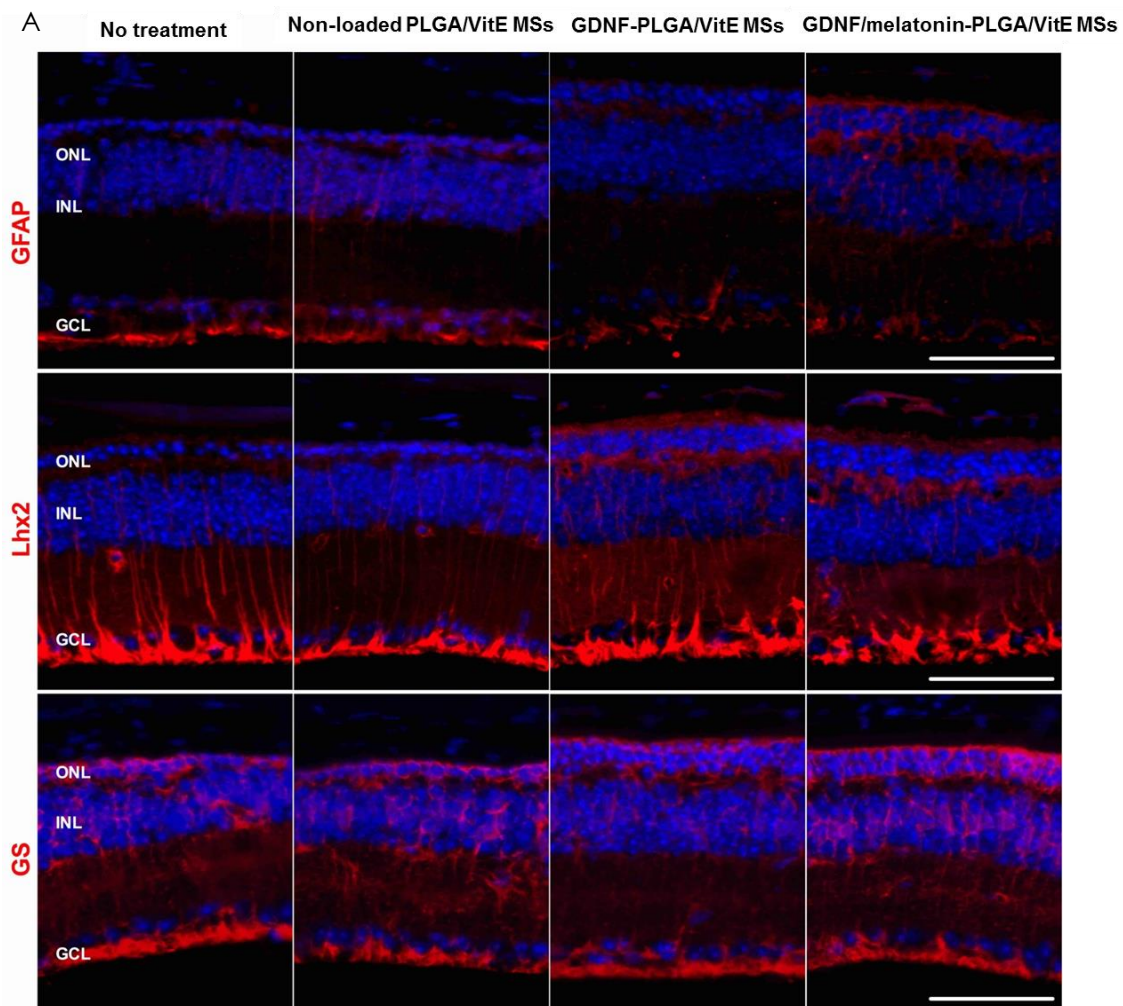


Fig. 5. Immunohistochemical analysis. **(A)** Glial marker expression. The expression of glial markers GFAP, Lhx2 and GS was similar across the control and treatment groups. The Muller glia processes are visible spanning through the entire retinal thickness, which is related to retinal degeneration. Scale bar 50 μ m, DAPI (blue) is used for nuclei counterstaining.

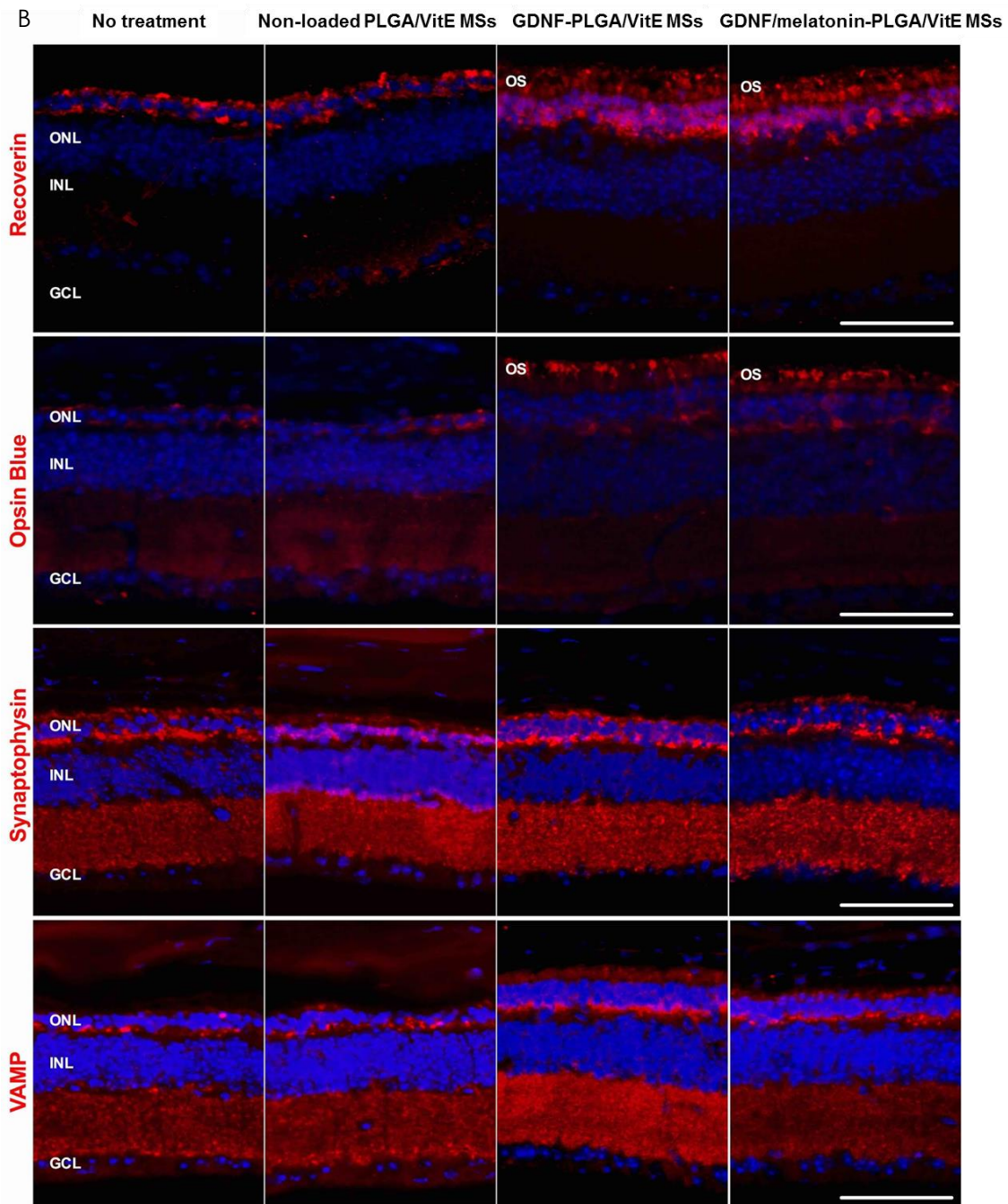
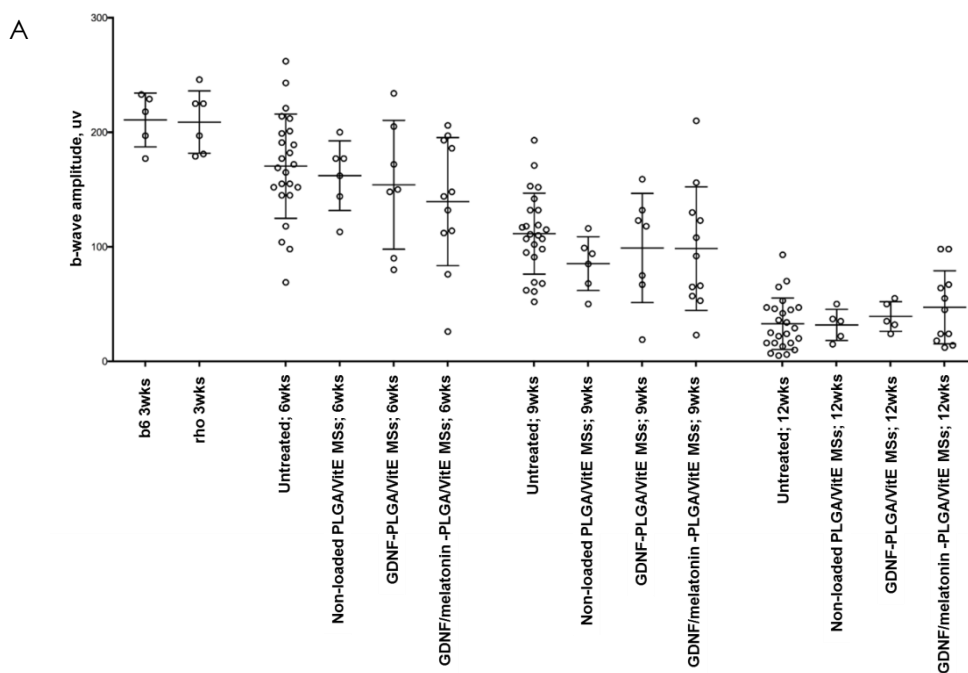


Fig. 5. Immunohistochemical analysis. **(B)** Photoreceptor and synaptic markers expression. The immunohistochemical analysis of treated and control eyes at 12 weeks following microsphere injection has demonstrated partial preservation of photoreceptors. We have observed increased expression of pan-photoreceptor marker recoverin in both treatment group, which correlates with the increase cell count and ONL thickness. We also confirmed the preservation of outer segments in short-wavelength cones as detected by S-Opsin. The increased expression of synaptic markers VAMP and Synaptophysin correlated with the partial photoreceptor rescue in the treatment groups. Scale bar 50 μ m, DAPI (blue) is used for nuclei counterstaining.

In order to evaluate functional rescue of retinal neurons, ERGs were performed 3, 6 and 9 weeks after intravitreal injection of the microspheres into a retinal degeneration mouse model (Fig. 6). The amplitude of b-waves was measured and compared between (a) GDNF-loaded PLGA/VitE MSs, (b) GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs (c) non-loaded PLGA/VitE MSs and (d) untreated mice. An averaged ERG from a wild type (wt) mouse is also included for comparison. There was no significant difference between GDNF-loaded PLGA/VitE MSs, GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs and non-loaded PLGA/VitE MSs in the amplitude of b-wave ($p > 0.05$) at 3 and 6 weeks after injection. We also observed a trend towards slight depression of ERG in all treatment groups, which is probably related to the intravitreal injection procedure. However, at 9 weeks ERG b-wave amplitudes were statistically significantly higher in the GDNF-loaded MSs treated eyes ($39 \mu\text{V}$) and GDNF/melatonin-loaded MSs ($47 \mu\text{V}$) compared to the non-loaded microsphere treated eyes ($31 \mu\text{V}$; $p=0.03$) or the untreated eyes ($32 \mu\text{V}$). No significant difference in the b-wave amplitude was observed between the blank-microsphere treated eyes and the untreated control eyes. These results suggest that the GDNF-loaded PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs provided a functional rescue of photoreceptors after 9 weeks of treatment.



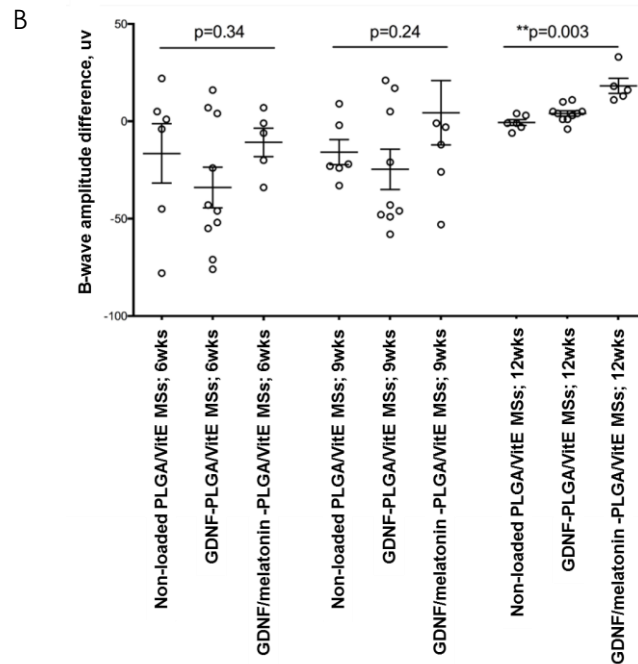


Fig. 6 The rescue of retinal function in the rhodopsin knockout mice with microspheres **(A)** Photopic electroretinography recordings from rho (-/-) mice at 6 weeks, 9 weeks, and 12 weeks after intravitreal injection of microspheres. The amplitude of b-waves was measured in GDNF/VitE-loaded MSs; GDNF/VitE/melatonin-loaded MSs; VitE-loaded MSs and untreated rho (-/-) mice. An averaged ERG from a 3 weeks wild type (wt) mouse and 3 weeks rho (-/-) mouse is also included. Error bars indicate standard deviation (SEM). **(B)** Comparison of photopic electroretinography recordings from rho (-/-) mice at 6 weeks, 9 weeks, and 12 weeks after intravitreal injection of microspheres. The amplitude of b-waves was compared between GDNF/VitE-loaded MSs; GDNF/VitE/melatonin-loaded MSs; VitE-loaded MSs and untreated rho (-/-) mice. Error bars indicate standard deviation (SEM); levels of significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Direct delivery of GDNF into the eye enhances the survival of a variety of neurons in the retina, including retinal ganglion cells and photoreceptors (Jiang, Moore et al. 2007, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011, Del Rio, Irmeler et al. 2011). This neurotrophic factor, which belongs to the transforming growth factor β superfamily, was first described as a stimulant of survival of dopaminergic neurons *in vitro* with an EC_{50} of 40 pg/mL (Lin, Doherty et al. 1993) and has been found to stimulate the survival of rods in PN5 mouse retinal

cultures with a maximal effect at 200 pg/mL (ED₅₀ of about 30 pg/mL) after 6 days in culture (Jing, Wen et al. 1996, Carwile, Culbert et al. 1998). *In vivo*, direct subretinal injection of 330 ng/μL of rhGDNF in the rd1/rd1 mouse at post-natal (PN) 13 and PN17 has been shown to exert both histologic and functional neuroprotective effects on rod photoreceptors, reducing the degeneration at PN23 (Frasson, Picaud et al. 1999). However, the real usefulness of neurotrophic factors is linked to the development of effective formulations able to deliver the active substance to the specific tissue as adverse reactions and complications could be caused by repetitive intravitreal administrations (Del Amo and Urtti 2008). In order to reduce the frequency of successive injections and lengthen the active substance release time, neurotrophic factors have been encapsulated in biodegradable microspheres (MSs) (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011) or nanoparticles (NPs) (Zarbin, Arlow et al. 2013).

Several studies have shown that the use of microsystems for drug delivery in the eye results in effective targeting, high availability in targeted tissues, and few adverse effects (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014) Drug delivery systems based on PLGA microspheres loaded with neurotrophic factors such as GDNF offer considerable promise for long-term survival of retinal cells in some neurodegenerative pathologies (Jiang, Moore et al. 2007, Ward, Khoobehi et al. 2007, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011).

Since several years ago, especial attention has been paid to the simultaneous use of active substances targeting different pathophysiological pathways for the treatment of multifactorial diseases. In fact, the combinatory therapeutic strategy is being currently evaluated by other authors for the treatment of ocular diseases. For example, Wyględowska-Promieńska et al. have successfully tested the combination of an anti-VEGF agent (aflibercept) in solution intravitreally injected in patients suffering exudative age related macular degeneration with topical administration of bromfenac (Wyględowska-Promienska, Piotrowska-Gwozdz et al. 2015). In addition, ongoing studies are exploring the efficacy of combining anti-VEGF treatment with sustained-release corticosteroids to treat diabetic macular edema (Hussain and Ciulla 2016).

In this work we have developed GDNF-loaded PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs according to a previous elaboration protocol that allows the release of the neurotrophic factor in its bioactive form, due to its encapsulation in a solid state and to the presence of Vit E (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). The two formulations compared in the present work shown a particle size and morphology (spherical) suitable for injection as a suspension through needles typically used for intravitreal administration (25G-32G) (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). The presence of pores on the MSs surface was previously explained as consequence of the rapid removal of organic solvent during elaboration process and also to the presence of the oily additive (vitamin E) in the formulation (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). Microspheres were prepared with a biodegradable polymer (PLGA). This family of copolymers has been already approved in the clinical practice with a biodegradable intraocular implant for sustained release of dexamethasone (Ozurdex®, Allergan, Inc., Irvine, CA) indicated in the treatment of macula edema following branch retinal vein occlusion or central retinal vein occlusion, posterior segment uveitis and diabetic macular edema (Kapoor, Wagner et al. 2015, Whitcup and Robinson 2015).

In a recent work of our research group we have compared the protective behavior of GDNF-loaded MSs composed by PLGA and different amounts of VitE in organotypic cultures (submitted) and we have pointed out the potential therapeutic effect of vit E in rescuing ONL in that *ex vivo* model after long-term exposure (20 days), probably due to its antioxidant activity.

The biodegradation of PLGA microspheres occurs through a homogeneous hydrolytic chain cleavage mechanism where the rates of polymer degradation are similar for both the surface and the bulk of the microspheres (Shive and Anderson 1997). This phenomenon produces typical *in vitro* release profiles characterized by a combination of slow and fast release rates (Mao, Xu et al. 2007, Ahmed, Elkharraz et al. 2012). It has been already demonstrated that the inclusion of hydrophobic substances in the formulation such as Vit E promotes a decrease in the protein release rate (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). As can be observed in the present work, the encapsulation of another hydrophobic compound (melatonin), solid in this

case, also promotes changes in the GDNF release profile, not only reducing the initial burst but also increasing the duration and lowering the delivery rate values of the neurotrophic factor observed in the slow release steps. The typical release profile from PLGA MSs was manifested in the melatonin release profile, also combining fast and slow release rates.

The formulation of more than one active compound in the same microparticulate system stills remains a challenge from a technological point of view. Several strategies have been evaluated in the last years. For example Feng et al. included an hydrophilic drug (doxorubicin) in the inner aqueous phase (W1) and an hydrophobic drug (paclitaxel) join with the polymer in the organic phase (O) of a double W1/O/W2 emulsion to obtain porous PLGA microspheres useful for inhalatory therapy of lung cancer (Feng, Tian et al. 2014). Zhang et al. included two growth factors (bone morphogenetic protein and vascular endothelial growth factor) dissolved in the inner aqueous phase of a double W/O/W emulsion to prepare PLGA microspheres able to controlled release the two proteins. Subsequently, they were included in inorganic scaffolds and successfully *in vitro* and *in vivo* evaluated for treatment of bone necrosis (Zhang, Zhang et al. 2016). To our knowledge this is the first time that the S/O/W emulsion method is employed to microencapsulate more than an active compound in the same MS.

Approximately an amount of 0.05 mg of microspheres was intravitreally injected in each treated eye. We calculate that the administered GDNF dose in each formulation was 1.735 ng and 1.105 ng for GDNF-PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs respectively as was initially encapsulated. Intravitreal injections of both GDNF-PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs show a prosurvival effect on photoreceptors in the rho-/- mouse. These beneficial effects have been demonstrated through immunohistochemical and morphometric analyses and through measurement of light-evoked responses.

The usefulness of GDNF delivered from a microparticulate system in rescuing photoreceptors in retinal degeneration animal models has been previously demonstrated by other authors. For example, Andrieu-Soler et al. showed the efficacy of released rhGDNF after single intravitreal injections of

polymeric microspheres in the photoreceptors rescue of the rd1/rd1 mouse. In this previous study, a significant delay of rod degeneration was observed at PN28 in mice receiving the rhGDNF-loaded MSs compared to either untreated mice or to mice receiving blank MSs with a protective effect during 17 days with a total dose of 380 ng of GDNF. In the present work, lower initial doses of the neurotrophic factor delivered from PLGA microspheres led to photoreceptor rescue, and was observed after 63 days of intravitreal injection of GDNF MSs in the *rho* (-/-) mice. Furthermore, considering that the GDNF-loaded MSs prepared in this work were able to release the neurotrophic factor for at least 6 months, according to recently published pharmacokinetic studies in rabbits (Garcia-Caballero, Prieto-Calvo et al. 2017), it can be assumed that the neuroprotective effect of the systems presented maybe more extended.

Interestingly, a similar neuroprotective effect was observed when GDNF was co-delivered with melatonin, even with less than two-fold amount of GDNF theoretically released from GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs according to *in vitro* studies. This positive effect of the GDNF/Melatonin combination therapy was also initially observed in the *in vitro* rescue of hRPC against oxidative stress, with cell survival values of almost 100% for the combination GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs when a concentration of 11 mg MSs/mL were tested. These findings suggest that melatonin may potentially have additional therapeutic effect and that neuroprotective therapy for retinal degeneration is not limited to the use of a single active molecule. Further studies are necessary to confirm this hypothesis.

A remarkable result observed in the present study is that photoreceptors rescue appeared uniform across the entire retina when both formulations, GDNF-loaded PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs, were injected, which might be indicative of the continuous delivery of the active compounds on the retina, an additional benefit of the prolonged sustained release of the two active compounds in the vitreous.

Morphology studies were corroborated with ERG experiments, confirming that visual function was extended in *rho*-/- retinas treated with GDNF-PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-PLGA/VitE MSs.

Some attempts have been already made to explore the use of drug delivery systems for co-delivery at ocular level. Recently, Nagai et al offered an interesting approach. These authors prepared a micro-reservoir system intended for transcleral implantation composed by an apparently non-biodegradable polymer combination, able to co-release small active molecules for 4 weeks (Nagai, Kaji et al. 2014a). The system was successfully employed for co-administration of a prostaglandin analogue and a free radical scavenger for neuroprotection purpose against light-induced retinal damage in rats (Nagai, Kaji et al. 2014b). However, to our knowledge this is the first study evaluating the long-term co-delivery of two active substances (of large and small molecular weights) included in the same biodegradable drug delivery system for intravitreal administration.

5. Conclusions

A single intravitreal injection of GDNF-loaded PLGA/VitE MSs and GDNF/melatonin-loaded PLGA/VitE MSs promoted the rescue of the photoreceptors in rho (-/-) mice. The use of these novel intraocular drug delivery systems enables the efficient co-delivery of therapeutic active substances for the treatment of retinal diseases and may be very useful to protect against photoreceptor degeneration in retinal disease. We suggest that the combinatorial approach presented here should be further tested in other retinal degenerative models.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo son en su mayoría crónicas y pueden cursar con un daño progresivo del nervio óptico y la pérdida de células ganglionares de la retina (CGR), fotorreceptores y otras células de la retina ocasionando la pérdida de visión.

Una de las estrategias terapéuticas encaminadas al tratamiento de estas patologías es la neuroprotección. La neuroprotección es la preservación relativa de la estructura y/o función neuronal (Casson, Chidlow et al. 2012). Se trata de la terapia basada en prevenir, limitar y, en algunos casos, revertir la degeneración o muerte de las células neuronales mediante el bloqueo de los mecanismos que la desencadenan, independientemente de cuál haya sido el daño primario (Cheung, Guo et al. 2008, Baltmr, Duggan et al. 2010, Nucci, Strouthidis et al. 2013). En el caso de la neuroprotección ocular, una aproximación terapéutica consiste en la administración de factores neurotróficos exógenos encargados de modular el crecimiento, la diferenciación, la reparación y la supervivencia de las neuronas gracias a su unión a receptores específicos. Entre los agentes neuroprotectores, el Factor Neurotrófico Derivado de la línea celular Glial (GDNF) ha demostrado su capacidad para promover la supervivencia de CGR y fotorreceptores dañados (Klocker, Braunling et al. 1997, Andrieu-Soler, Aubert-Pouessel et al. 2005, Allen, Watson et al. 2013).

No obstante, para la aplicación de este tipo de tratamientos neuroprotectores, se requieren formas de administración que permitan que la sustancia activa alcance las zonas afectadas de la retina. Por esta razón, se hace necesario el empleo de vías de administración directas como la intravítrea. Este tipo de vías, posibilitan el depósito de la sustancia activa, además de eliminar, en gran medida, la mayoría de los efectos sistémicos (Bansal, Garg et al. 2016). Sin embargo, tal y como se ha señalado

anteriormente, esta vía no está exenta de problemas debido a los riesgos inherentes del empleo de inyecciones intravítreas repetidas ya que se deben mantener concentraciones eficaces de la sustancia activa en el lugar de acción (Jager, Aiello et al. 2004).

Los sistemas de cesión prolongada suponen una alternativa al uso de inyecciones intravítreas de fármacos en solución, permitiendo distanciar las administraciones. En este sentido, los sistemas microparticulares biodegradables de liberación controlada son capaces de proporcionar concentraciones terapéuticas del agente activo en su lugar de acción durante largos periodos de tiempo. Además, pueden administrarse en forma de suspensión a través de una inyección convencional y desaparecen del lugar de acción una vez ejercido el efecto (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014).

En trabajos anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se ha demostrado que, la administración de microesferas de PLGA que liberan pequeñas cantidades de GDNF (del orden de picogramos), aumentó la supervivencia de células ganglionares de la retina en un modelo experimental de glaucoma (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). Este trabajo consistió en el diseño y caracterización de una formulación de microesferas biodegradables de PLGA cargadas con el factor neurotrófico GDNF y con vitamina E. Para ello se empleó el método de microencapsulación basado en la extracción- evaporación del disolvente (Freitas, Merkle et al. 2005) a partir de una emulsión S/O/A. El método desarrollado permite el mantenimiento de la integridad estructural del GDNF así como, su actividad biológica durante el proceso de elaboración y su posterior liberación durante un largo periodo de tiempo. La administración de estas microesferas de PLGA cargadas con GDNF y vitamina E en un modelo experimental de glaucoma (modelo de elevación crónico de la presión intraocular en ratas), incrementó la supervivencia axonal y de CGR 77 días después de su inyección, comparado con la administración de una dosis equivalente de GDNF, vitamina E o microesferas blanco.

El desarrollo de esta tesis doctoral se ha centrado en el diseño y caracterización de varias formulaciones de microesferas biodegradables cargadas con agentes neuroprotectores y/o coadyuvantes destinadas a su administración intraocular para el tratamiento de patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo. Para ello, se ha empleado el método de la extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A que combina distintos recursos tecnológicos como son la utilización de la proteína al estado sólido y la inclusión de antioxidantes en la formulación de microesferas biodegradables de PLGA.

El primer trabajo que se recoge en la presente tesis doctoral ha consistido en la evaluación de los niveles en vítreo del factor neurotrófico GDNF tras la administración intravítrea de microesferas de GDNF (2 mg) en animales de experimentación (conejos) durante 6 meses mediante un estudio farmacocinético. La determinación de las concentraciones del factor neuroprotector en el vítreo se llevó a cabo a distintos tiempos (24 h, 1, 4, 6, 8, 12, 18, y 24 semanas) después de la administración del preparado.

Para ello, el primer objetivo del trabajo consistió en la preparación de una formulación de microesferas de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) cargada con el agente neuroprotector GDNF. En esta formulación se incluyó la vitamina E con el fin de incorporar el factor neurotrófico al estado sólido. Dicha tecnología ha sido previamente desarrollada por nuestro grupo de investigación para asegurar la estabilidad del GDNF (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). El método de microencapsulación empleado ha sido el de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A. Las microesferas biodegradables elaboradas mediante esta técnica se caracterizaron *in vitro* mediante el estudio de su morfología, tamaño medio de partícula y distribución del tamaño de partícula así como de los componentes en el interior de la matriz polimérica, eficacia de encapsulación y perfil de liberación *in vitro* del agente neuroprotector.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido mostraron microesferas esféricas, bien definidas y con algunos poros en la superficie de las mismas. Este hecho ha sido observado previamente en distintos trabajos realizados por el grupo de investigación y se atribuye a la rápida eliminación del disolvente orgánico durante la elaboración de la formulación (Al Haushey, Bolzinger et al. 2007) y a la presencia del aditivo oleoso (VitE) en la misma (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). El tamaño de partícula de las microesferas fue de aproximadamente 19 μm , tamaño adecuado para su inyección en forma de suspensión a través de agujas de pequeño calibre generalmente empleadas para la administración intravítrea (25G-32G) (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). Dado que las microesferas son inyectadas en forma de suspensión, existen varios factores que pueden afectar a la administración de las mismas por vía intraocular además del tamaño de partícula. En primer lugar es importante asegurar una dispersión homogénea de las microesferas y controlar el tiempo desde su preparación hasta su administración, ya que estas podrían agregarse. Rojas et al. analizaron la influencia entre el tiempo de preparación de una suspensión de micropartículas de poliésteramida para su inyección intraocular y su agregación. De acuerdo con este estudio, la agregación de micropartículas estaba claramente relacionada con el tiempo, siendo este fenómeno más acusado transcurridos 30 minutos desde la preparación de la suspensión (Rojas and Guerrero 2013). También es importante señalar que para una adecuada inyectabilidad de las microesferas hay que tener en cuenta parámetros como el diámetro y longitud de aguja empleados en el proceso. En este sentido, Martínez-Sancho et al. realizaron un estudio para la evaluación de la inyección de micropartículas de PLGA cargadas con aciclovir a través de agujas de diferente calibre (27G, 25G y 21G) empleadas en la práctica clínica habitual. En ninguno de los casos se reportaron problemas asociados al flujo de paso de la suspensión a través de las agujas, resultando la aguja de calibre 27G la más adecuada para la inyección intraocular, aunque en este caso el tamaño de las partículas fue superior ($42,36 \pm 15,56 \mu\text{m}$) que el obtenido en las formulaciones de nuestro estudio (Martínez-Sancho, Herrero-Vanrell et al. 2004). Por su parte, los vehículos empleados para resuspender las microesferas

pueden influir a su vez en el tiempo de precipitación de partículas. Las soluciones comúnmente empleadas como vehículos son la solución salina balanceada (BSS) o las soluciones isotónicas de tampón fosfato de pH 7,4. No obstante, también se pueden emplear soluciones compuestas de potenciadores de la viscosidad para retrasar el agrupamiento de partículas entre otros (Herrero-Vanrell, Bravo-Osuna et al. 2014). Atendiendo a estos factores, en nuestro trabajo se empleó como vehículo BSS, agujas con un diámetro de 25G que debido a su diámetro permite el flujo adecuado de la suspensión de MSs de acuerdo con su tamaño y se aseguró una dispersión óptima de las mismas previa administración.

Como se ha señalado anteriormente, uno de los aspectos tecnológicos más destacados en la formulación de microesferas de PLGA, es la presencia de un aditivo oleoso (VitE) que se incluye en la fase interna de la emulsión y que permite la incorporación del GDNF en las MSs al estado sólido. Tal y como se ha descrito en trabajos anteriores, este hecho ayuda a mantener la integridad del factor neurotrófico durante el proceso de fabricación y permite también prolongar la liberación de la sustancia activa en comparación con las microesferas que no contienen dicho aditivo (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). Además, desde un punto de vista farmacológico, las propiedades antioxidantes de la vitamina E podrían resultar de interés para reducir el estrés oxidativo asociado con las neuropatías oculares (Mozaffarieh, Grieshaber et al. 2008, Li, Fu et al. 2012, Blasiak, Petrovski et al. 2014, Chinskey, Besirli et al. 2014).

Con el fin de determinar la distribución de los componentes de las microesferas en la matriz polimérica, se utilizó la microscopía confocal. Debido a la dificultad para encontrar en el mercado los componentes de la formulación marcados con fluoróforos, se recurrió al empleo de albúmina sérica humana (HSA) marcada con isotiocianato de fluoresceína (HSA-FITC) como proteína modelo, y un fosfolípido fluorescente (DHPE-TRITC, dihexasadecanoil-glicero fosfoetanolamina marcado con tetrametilrodamina) disuelto en el aditivo oleoso. A pesar de las diferencias en el peso molecular del GDNF y la HSA, se podría asumir una distribución similar en la matriz

polimérica al permanecen ambas al estado sólido durante el proceso de formación de partículas (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). De hecho, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la distribución de proteínas de distinto peso molecular no se veía alterada cuando se encapsulaban en microesferas de PLGA utilizando el método anteriormente descrito (datos no mostrados). Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal mostraron una distribución no homogénea de los componentes (proteína y aditivo oleoso) en el interior de las microesferas, con una mayor presencia de fluorescencia en la superficie de las partículas. De acuerdo a los resultados observados, cabe esperar que la distribución de la proteína en la matriz polimérica condicione el perfil de liberación de la misma ya que se observa una cesión inicial elevada (durante las primeras 24 horas) que se corresponde a un porcentaje importante del factor neurotrófico encapsulado en las microesferas.

La eficacia de encapsulación y el perfil de liberación del GDNF a partir de las microesferas fueron determinados mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) previa validación de la misma de acuerdo a los parámetros preestablecidos de linealidad, exactitud y precisión. Aunque en el kit comercial de ELISA el fabricante recomienda emplear una curva de concentración entre 31,5 y 2000 pg/mL, se utilizaron varios puntos de anclaje por debajo de 31,5 pg/mL (15,0; 7,5; 3,75; 1,875 pg/mL) para la cuantificación de GDNF en vítreo (Smolec, DeSilva et al. 2005). Para la aceptación de estos puntos de anclaje se exigieron los mismos criterios que para el límite de detección fijado, el límite inferior de cuantificación y el límite superior de cuantificación, cuya concentración fue calculada dentro del 25 % del valor nominal, de acuerdo a los criterios establecidos por la EMA para la validación de métodos analíticos (EMA guideline on bioanalytical method validation, 2011). La eficacia de encapsulación obtenida para la formulación elaborada con contenidos iniciales de 20 µg de GDNF y 20 µL de vitamina E fue del $42,74 \pm 1,66$ % que se corresponden a $37,43 \pm 0,74$ ng GDNF/mg MSs. En el ensayo de liberación *in vitro* se cedió el 49,3% del GDNF incorporado en las microesferas durante las primeras 24h. Después de este “burst” inicial, la

liberación de GDNF se prolongó hasta las 24 semanas de acuerdo a un perfil con distintas fases, propio de los sistemas de liberación controlada elaborados con PLGA (Morita, Sakamura et al. 2000). Durante los primeros 7 días se produjo una rápida liberación del factor neurotrófico. A continuación (del día 7 al 42), se observó una fase más lenta, con una velocidad de liberación de 48 pg de GDNF/mg MSs/día. Después, tras una rápida cesión de GDNF durante las semanas 7 y 8 (773 pg de GDNF/mg MSs/día), la formulación de GDNF liberó el factor neurotrófico de una manera sostenida durante 42 días (89 pg GDNF/mg MSs/día desde el día 56 hasta el día 98). A partir del día 98 y hasta el día 140 se observó una velocidad de liberación de 30 pg de GDNF/mg MSs/día, seguida finalmente de una fase más lenta de 12 pg de GDNF/mg MSs/día hasta el día 168, final del ensayo. Al final del estudio de liberación *in vitro*, el contenido de GDNF restante era del 4% del total inicialmente encapsulado.

Las microesferas elaboradas y caracterizadas *in vitro*, fueron posteriormente administradas mediante inyección intravítrea en conejos. Aunque las principales características anatómicas y fisiológicas de los ojos de humanos y conejos muestren algunas diferencias, los parámetros farmacocinéticos principales (aclaramiento, volumen de distribución y vida media) presentan una buena correlación y permiten su comparación (Bösze and Houdebine 2006, Los 2008, Zahn, Volk et al. 2010, Del Amo and Urtti 2015). Estos estudios fueron realizados en colaboración con el instituto de investigación sanitaria de Aragón (España) y el departamento de oftalmología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza (España).

Se inyectaron 50 μ L de una suspensión homogénea de microesferas al 4% p/v en el vítreo de cada ojo (2 mg MSs/ojo). Con el fin de reducir el número de animales utilizados para el estudio y debido a factores éticos del protocolo, se realizaron inyecciones bilaterales. Los animales recibieron microesferas cargadas con GDNF en el ojo derecho y sin cargar (microesferas blanco) en el ojo izquierdo. La concentración de microesferas en el vítreo del conejo fue de 1,6 mg/mL, asumiendo un volumen teórico para el vítreo del conejo de 1,27 mL (Del Amo, Vellonen et al. 2015). Esta concentración de partículas resulta menor

que otras empleadas por otros autores y que han presentado una tolerancia óptima. Por ejemplo, Giordano et al. inyectaron 2,5 mg de microesferas en vítreos de conejos (concentración intravítrea de MSs de 1,97 mg/mL) para estudiar su posible toxicidad. Dicha concentración de microesferas no resultó tóxica para los tejidos oculares (Giordano, Chevez-Barrios et al. 1995). De la misma forma, Rong et al. exploraron la biocompatibilidad y la seguridad de microesferas de PLGA/PLA administradas mediante inyección intravítrea en conejos. Para ello, inyectaron distintas cantidades de MSs y que establecieron como baja, media y alta: baja (2,5 mg, concentración intravítrea de MSs de 1,97 mg/mL), media (5 mg, concentración intravítrea de MSs de 3,94 mg/mL) y alta (10 mg, concentración intravítrea de MSs de 7,81 mg/mL). En dicho estudio, los exámenes histológicos y funcionales de las retinas mostraron la biocompatibilidad y seguridad del sistema de liberación basado en MSs de PLGA/PLA hasta 12 semanas después de su administración (Rong, Yuan et al. 2014). En nuestro trabajo la cantidad de microesferas empleada fue de 2 mg, con el objetivo de combinar buena tolerancia a largo plazo con la necesidad de concentraciones detectables de GDNF en el vítreo durante 24 semanas. No obstante, teniendo en cuenta el volumen del vítreo en los humanos (4 mL) (Balazs 1984) la cantidad de MSs a inyectar podría ser superior.

La concentración intravítrea de GDNF 24 h después de la administración de MSs de GDNF y vitamina E (2 mg), así como de las MSs blanco (2 mg) alcanzó valores de $717,1 \pm 145,1$ pg/mL y $10,2 \pm 4,0$ pg/mL respectivamente en comparación con las concentraciones analizadas en el vítreo de animales no tratados ($2,9 \pm 0,8$ pg/mL). Durante las siguientes cuatro semanas, los niveles de GDNF se mantuvieron en $745,3 \pm 25,5$ pg/mL (Css1) en los ojos que recibieron MSs de GDNF, valor que resultó casi cien veces mayor que los valores determinados en los ojos que recibieron MSs blanco ($7,8 \pm 2,5$ pg / mL). A las seis semanas tras la inyección se observó un importante descenso de la concentración de GDNF intravítrea, con valores del $5,9 \pm 0,6$ pg/mL. Después de esta bajada, la concentración de GDNF se mantuvo en $17,4 \pm 3,7$ pg/mL (Css2) desde la semana 8 hasta el final del ensayo (semana 24).

Los valores obtenidos de los ojos tratados con microesferas no cargadas fueron bajos, pero por encima del límite de cuantificación ($>3,9$ pg/mL) durante las primeras cuatro semanas del ensayo. Como las microesferas cargadas con GDNF se administran localmente en el vítreo lo más probable es que el GDNF liberado a partir de las mismas quede confinado dentro del ojo, sin embargo desde un punto de vista teórico no habría que descartar el paso al ojo contralateral, ya que una sustancia activa puede atravesar la barrera hemato-retiniana alcanzando el torrente sanguíneo y de ahí llegar al ojo adyacente. Este fenómeno depende principalmente del peso molecular del compuesto y también de su concentración (Mitra, Anand et al. 2005). En nuestro caso, la lenta liberación de GDNF a partir de las MSs así como su alto peso molecular (23,000 g/mol) limitaría enormemente el acceso del agente activo al ojo contralateral, pudiendo utilizarlo para la inyección de partículas no cargadas. De hecho, otros autores como Ward et al. (Ward, Khoobehi et al. 2007) o Ejstrup et al. (Ejstrup, Kiilgaard et al. 2010), han utilizado el ojo contralateral como control negativo para estudios de inyecciones intravítreas de microesferas cargadas con GDNF. Así, el hecho de que en nuestro estudio se observaran concentraciones de GDNF en los ojos tratados con microesferas no cargadas podría estar más relacionado con estímulos de distintas entidades de la retina. De hecho, se ha postulado que la inyección intravítrea en sí misma es suficiente para causar cambios reactivos en las células de Müller y en la microglía al menos durante las primeras 24 horas tras la inyección (Seitz and Tamm 2014). También, Igarashi et al. demostraron que tanto las células de Müller como los astrocitos expresan GDNF (Igarashi, Chiba et al. 2000). En este sentido, es razonable plantearse la hipótesis de que si la actividad de las células de Müller y astrocitos aumenta en respuesta al proceso de inyección, la expresión de GDNF también podría aumentar.

La determinación de los parámetros farmacocinéticos se realizó mediante un análisis no compartimental. Se emplearon para ello las concentraciones intravítreas ($C_{\text{intravítrea}}$) medias alcanzadas después de la administración de MSs cargadas con GDNF y vitamina E. Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron: (1) aclaramiento aparente del vítreo

(CI(vítreo)/Fr); (2) área bajo la curva de 0 a 168 días (AUC); (3) constante de liberación de orden cero de 24h a 4 semanas (K_{01app}) y de 8 a 24 semanas (K_{02app}) y (5) tiempo de inicio de la etapa 2 (T_{02}). De esta forma, la liberación *in vivo* del factor neurotrófico se observa como un proceso cinético de orden cero seguido de una etapa predominante de eliminación que tiene lugar entre las semanas 4 y 6. Tras esta etapa de eliminación, comienza la segunda etapa de liberación regida también por una cinética de orden cero, caracterizada por una velocidad de liberación de 50,2 pg/día (desde el día 56 hasta el final del experimento) y en la que se aprecia una baja concentración de GDNF pero sostenida en el tiempo (18 pg/mL).

Tras el tratamiento de los datos farmacocinéticos no se pudo establecer una correlación entre la liberación de GDNF *in vitro* y su comportamiento *in vivo*. Una de las razones podría ser la tendencia a la agregación que sufren las microesferas en el vítreo tras ser inyectadas (Barcia, Herrero-Vanrell et al. 2009). Este hecho probablemente tenga cierta influencia sobre el perfil de liberación de la proteína en el vítreo. Aunque después de varias semanas de incubación en medios de liberación *in vitro* también se aprecia cierta tendencia a la agregación (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011), estos dos fenómenos no se pueden comparar fácilmente. Además, mientras que en el estudio *in vitro* la proteína liberada se mantiene en el medio de cesión hasta el momento de la cuantificación, *in vivo* ocurre lo contrario, y la proteína una vez liberada desde las microesferas puede difundir a los tejidos (retina en este caso) y/o degradarse en el vítreo.

Debido a la potencia y el mecanismo de acción, la concentración necesaria de un factor neurotrófico para proporcionar neuroprotección es baja (Brodski, Vogt Weisenhorn et al. 2002). *In vitro* se ha demostrado que una EC50 de 40 pg/mL de GDNF incrementa la supervivencia de células dopaminérgicas (Lin, Doherty et al. 1993). Esta concentración mínima estimada de GDNF también ha sido considerada por otros autores como la concentración terapéutica capaz de promover el rescate de las CGR en un modelo de glaucoma porcino de PIO elevada. Este estudio demostró el

mantenimiento de la concentración mínima estimada durante 15 días tras la administración mediante inyección intravítrea en el ojo porcino (volumen de vítreo de 2,2 mL) una solución de 100 ng de GDNF (bolus) (Ejstrup, Kiilgaard et al. 2010). Sin embargo, otros autores han reportado efectos neuroprotectores para concentraciones de GDNF inferiores al valor mínimo estimado cuando el factor neurotrófico es liberado de forma sostenida a partir de microesferas. Por ejemplo Ward et al. mostraron un incremento en la supervivencia de CGR en ratones DBA/2J (volumen de vítreo de 0,005 mL) después de dos meses tras la administración de microesferas cargadas con GDNF (cesión teórica total de 0,707 ng) (Ward, Khoobehi et al. 2007). Esta misma formulación de microesferas de GDNF también resultó eficaz en un modelo de glaucoma en rata (volumen de vítreo de 0,05 mL) con PIO crónica elevada. Estas microesferas (0,05 mg) fueron inyectadas en el vítreo y tras 9 semanas los resultados confirmaron que una liberación total teórica de GDNF de 1,77 ng proporcionó neuroprotección sobre las CGR (Jiang, Moore et al. 2007). Kyhn et al. demostraron el efecto neuroprotector sobre las CGR durante 6 semanas en un modelo porcino de isquemia retiniana aguda al que se le administraron 2 mg de MSs con una liberación total teórica de GDNF de 70,8 ng (Kyhn, Klassen et al. 2009). En esta línea, tal y como se ha comentado anteriormente, nuestro grupo de investigación demostró que cantidades tan bajas incluso como 0,64 ng de GDNF son eficaces. Para ello se administraron microesferas de PLGA cargadas con GDNF/VitE en un modelo de experimental de glaucoma (modelo de elevación crónica de la presión intraocular en ratas). Los resultados confirmaron que estas bajas cantidades de GDNF proporcionaron efectos neuroprotectores sobre las CGR durante al menos 11 semanas (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). De hecho, en este mismo trabajo se postuló que tasas de liberación *in vitro* tan bajas como 0,8 pg/mL de GDNF podrían resultar neuroprotectoras.

Los hallazgos obtenidos en este primer trabajo consolidan el interés de esta formulación para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oftálmicas del segmento posterior del ojo, siendo capaz de liberar el factor neuroprotector durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, la

evaluación de la eficacia y toxicidad de estos sistemas de liberación controlada requiere del impulso de herramientas alternativas que permitan una valoración precoz de estos parámetros antes de la puesta en marcha de los ensayos *in vivo* con animales de experimentación. A esto hay que añadir el interés de la combinación de diferentes sustancias activas en un único sistema de liberación controlada. Para esto es necesario establecer plataformas que permitan la evaluación del efecto de distintas sustancias solas o combinadas en el tratamiento enfermedades crónicas y de etiología multifactorial como son algunas patologías del nervio óptico y de la retina.

En el segundo trabajo presentado en esta tesis doctoral se propuso como objetivo la utilización de cultivos organotípicos de retina de rata como herramienta para determinar la eficacia *ex vivo* de microesferas de PLGA cargadas con GDNF y vitamina E. Para ello, se adaptó un sistema basado en explantes de retina de rata (Arango-Gonzalez, Szabo et al. 2010) con el fin de evaluar la tolerancia del microdispositivo así como la eficacia de diferentes formulaciones de PLGA elaboradas con GDNF y distintas cantidades de vitamina E (20 μ L y 40 μ L). Esta nueva aproximación permitió la evaluación de: (1) la eficacia de los sistemas de liberación controlada basados en microesferas de PLGA cargadas con sustancias activas neuroprotectoras; (2) el beneficio de incluir una combinación de distintas sustancias activas neuroprotectoras así como (3) la posible toxicidad del dispositivo bajo condiciones controladas.

Para el desarrollo de este trabajo se prepararon dos formulaciones de microesferas de PLGA empleando dos cantidades distintas de vitamina E. El aditivo oleoso (vitamina E) incluido en ambas formulaciones presenta, como se ha mencionado previamente, propiedades antioxidantes, por lo que su incorporación en este tipo de sistemas biodegradables podría reducir el estrés oxidativo producido en las patologías neurodegenerativas de la retina. Desde un punto de vista tecnológico, como se comentó también con anterioridad, la presencia del agente oleoso permite la incorporación de GDNF en su estado sólido, promoviendo el mantenimiento de la integridad del factor neurotrófico

durante la elaboración y la esterilización de las formulaciones (Martínez-Sancho, Herrero-Vanrell et al. 2003, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011, Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). A pesar de los buenos resultados obtenidos en estudios desarrollados anteriormente por el grupo de investigación, no se había podido establecer el beneficio farmacológico de la inclusión de distintas cantidades del agente antioxidante en las formulaciones de microesferas cargadas con GDNF.

Las partículas se elaboraron empleando la técnica de la extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A ya mencionada (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2011). La primera formulación se elaboró a partir de una suspensión de GDNF (20 µg) y 20 µL de vitamina E (GDNF-VitE20), mientras que para la segunda formulación se empleó una cantidad inicial de vitamina E de 40 µL (GDNF-VitE40) y la misma cantidad de GDNF. También se elaboraron microesferas conteniendo exclusivamente PLGA (MSs blanco) y microesferas de PLGA con VitE (cantidades iniciales de 20 µL o 40 µL).

Al igual que en el primer trabajo, la caracterización *in vitro* de las microesferas esterilizadas se llevó a cabo mediante el estudio de su morfología, tamaño medio de partícula y distribución de tamaño de partícula, eficacia de encapsulación y perfil de liberación de GDNF. Ambas formulaciones de GDNF y vitamina E dieron lugar a la liberación del GDNF de manera controlada al menos durante 21 días (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). Dado que los estudios en cultivos organotípicos no iban a prolongarse más tiempo, tampoco se prolongó el estudio de cesión *in vitro*. Las microesferas presentaron una forma esférica y un tamaño de partícula adecuado para ser administradas empleando las agujas utilizadas para la inyección intravítrea (25G-32G), como se ha explicado previamente (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). Como en los casos anteriores, la superficie de las microesferas fue porosa, hecho que se atribuye a la rápida eliminación del disolvente orgánico durante la elaboración de la formulación, tal y como se ha señalado anteriormente (Al Haushey, Bolzinger et al. 2007). En este estudio se observa el efecto de la vitamina E en la encapsulación del factor neurotrófico ya que la incorporación

de menor cantidad de vitamina E en la formulación de GDNF-VitE20 es capaz de incorporar una cantidad de GDNF ($25,73 \pm 1,04$ ng/mg MSs) significativamente mayor ($p < 0,01$) que la obtenida para la formulación de GDNF-VitE40 ($18,83 \pm 0,49$ ng/mg MSs). Este hecho se podría atribuir a la salida a la superficie del microglóbulo de la suspensión de la proteína en el aditivo oleoso durante el proceso de emulsificación y posterior maduración, situación que favorecería la disminución de la encapsulación de la proteína. La liberación inicial (durante las primeras 24 horas) de GDNF observada en los ensayos de liberación *in vitro* a partir de microesferas de PLGA también se vio influenciado por la presencia del aditivo oleoso y resultó más elevado para la formulación que contenía mayor cantidad de vitamina E ($75,40 \pm 10,44$ %, referido al total de GDNF encapsulado) que para la formulación de GDNF-VitE20 ($67,95 \pm 5,15$ %). Por el contrario, la inclusión de diferentes cantidades de vitamina E no afectó a la velocidad de liberación de GDNF que dio como resultado valores similares para ambas formulaciones desde el día 1 hasta el final del ensayo. Durante los primeros siete días, el GDNF se liberó a una velocidad de 490 pg de GDNF/mg MSs/día para las MSs de GDNF-VitE20 y a una velocidad de 440 pg de GDNF/mg MSs/día para las MSs de GDNF-VitE40 respectivamente. Desde ese punto hasta el final del estudio (a los 21 días) se observó una liberación más lenta que dio como resultado valores de 68,2 pg de GDNF/mg MSs/día para la formulación de GDNF-VitE20 y 50,0 pg de GDNF/mg MSs/día para la formulación de GDNF-VitE40, respectivamente. Al final del estudio de liberación *in vitro*, el contenido de GDNF remanente en las formulaciones fue del 17% para las MSs de GDNF-VitE20 y del 7% para las MSs de GDNF-VitE40 del total inicialmente encapsulado.

Para la evaluación de la tolerancia y la eficacia *ex vivo* a corto y largo plazo de las microesferas de PLGA cargadas con GDNF y vitamina E, se emplearon cultivos organotípicos de retina de rata. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Instituto de Oftalmología de la Universidad de Tübingen en Alemania. Este tipo de cultivos de retina son modelos tisulares *in vitro* capaces de reproducir la funcionalidad de las distintas estructuras de la retina, basadas fundamentalmente en la interacción entre las diferentes

células que constituyen este complejo tejido. Por esta razón, los cultivos organotípicos de retina resultan una herramienta superior a los cultivos de células disociadas, ya que en estas últimas, la funcionalidad intercelular se encuentra ausente (Caffe, Ahuja et al. 2001). Gracias a su disposición y propiedades, estos modelos permiten la evaluación de la eficacia y toxicidad de diferentes sustancias activas, así como el estudio de la tolerancia de biomateriales o dispositivos de una forma más cercana a los procesos que tienen lugar *in vivo*. Aunque la retina ha sido cultivada con éxito a partir de una gran variedad de especies, la fuente más común para los cultivos de tejido retiniano son los roedores (Kaempf, Walter et al. 2008, Carrasco, Navascues et al. 2011, Niyadurupola, Sidaway et al. 2011). Los cambios y la diferenciación celular en el desarrollo de la retina tienen lugar en las dos primeras semanas de vida postnatal (Young 1984, Horsburgh and Sefton 1987). Por esta razón, en este estudio se decidió realizar dos tipos de ensayo: cultivo a corto plazo (durante 7 días) y a largo plazo (durante 20 días). Las ratas seleccionadas para ello fueron de edad posnatal (PN) 9 y PN 10 respectivamente. De esta manera se consigue crear las máximas diferencias entre la degeneración y la supervivencia de las capas neuronales de la retina. Así, se evaluó la tolerancia del sistema polimérico empleado para la liberación del GDNF (microesferas no cargadas) y se determinó y comparó la eficacia de las distintas formulaciones de microesferas cargadas con GDNF y vitamina E. Simultáneamente, se llevó a cabo el estudio del potencial beneficio de incluir diferentes cantidades de la sustancia antioxidante (VitE) en el sistema de liberación controlada.

Para el posterior análisis de los explantes de retina se recurrió al ensayo TUNEL (TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling), que permite evaluar el índice de apoptosis (o muerte celular programada) en células individuales así como el índice de células viables. En los cultivos organotípicos de retina de rata a corto plazo (PN9DIV7) analizados, se observó un porcentaje de muerte celular que resultó significativamente superior ($P < 0,05$) en la capa nuclear externa (*outer nuclear layer* – ONL) de los grupos control ($2,70 \pm 0,76\%$), los grupos de MSs blanco ($3,71 \pm 2,61\%$) y los grupos de MSs con vitamina E ($1,74 \pm 0,78\%$ para

las MSs con 20 μ L de VitE y $2,85 \pm 0,44\%$ para las MSs con 40 μ L de VitE) en comparación con los tratamientos incluyendo GDNF ($1,06 \pm 0,61\%$ para las MSs de GDNF-VitE20 y $1,06 \pm 0,52\%$ para las MSs de GDNF-VitE40). Estos resultados confirmaron el efecto neuroprotector de la combinación de GDNF y vitamina E sobre la supervivencia de los fotorreceptores después de una semana de tratamiento. De forma similar, la cuantificación de células fotorreceptoras (representadas por el número de filas celulares en la ONL) en cultivos a largo plazo (20 días) evidenció que ambas formulaciones de microesferas cargadas con GDNF y vitamina E (MSs de GDNF-VitE20 y MSs de GDNF-VitE40) aumentaron significativamente la supervivencia de fotorreceptores en comparación con el grupo control, los grupos de MSs con vitamina E y el grupo de MSs blanco.

Estos resultados indican que la disminución del número de núcleos apoptóticos en los cultivos organotípicos a corto plazo tratados con microesferas de PLGA cargadas con GDNF y vitamina E está directamente relacionado con la supervivencia de fotorreceptores observada en los cultivos organotípicos a largo plazo para ambas formulaciones. Este hecho resulta de gran interés ya que demuestra que, para una neuroprotección eficaz en las células neuronales de la retina probablemente sea necesaria la administración sostenida del agente activo durante períodos prolongados de tiempo. Además, es importante destacar que la administración directa de microesferas de PLGA resultó bien tolerada durante todo el período de cultivo permitiendo descartar la posible toxicidad relacionada con el dispositivo bajo condiciones controladas.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo TUNEL en la ONL de cultivos PN10DIV20 fue útil para hacer una comparación entre las dos formulaciones cargadas con GDNF preparadas con diferente cantidad de VitE. En el caso de las formulaciones de GDNF-VitE40 se observó una disminución de la apoptosis en comparación con el resto de grupos (tanto de GDNF como de microesferas de VitE y microesferas blanco). Teniendo en cuenta que ambas formulaciones de microesferas liberan GDNF a una velocidad muy similar, el efecto

beneficioso observado en los explantes tratados con las microesferas de GDNF-VitE40 puede atribuirse al agente antioxidante. El resultado obtenido en este trabajo sugiere que la presencia de una mayor cantidad de vitamina E en esta formulación podría inactivar los radicales libres producidos por las células fotorreceptoras en respuesta al estrés oxidativo asociado a la preparación del cultivo (Terrasa, Guajardo et al. 2009, Bhatt, Groeger et al. 2010). Sin embargo, la confirmación de esta última hipótesis requeriría la puesta en marcha de más estudios.

Desde hace varios años, se ha prestado especial atención al uso simultáneo de distintas sustancias activas para el tratamiento de enfermedades de origen multifactorial en cuya patogénesis están implicados diversos mecanismos. De hecho, son varios los autores que en la actualidad centran sus estudios en este tipo de estrategias terapéuticas combinatorias para el tratamiento de enfermedades oculares. Por ejemplo, Wyględowska-Promieńska et al. han probado exitosamente la combinación de un agente anti-VEGF (aflibercept) administrado mediante inyección intravítrea con la administración tópica de bromfenaco en pacientes que padecen DMAE exudativa (Wyględowska-Promienska, Piotrowska-Gwozdz et al. 2015). También hay estudios en curso en los que se está evaluando la eficacia de la combinación de un tratamiento anti-VEGF con la liberación sostenida de corticosteroides para el tratamiento de edema macular diabético (Hussain and Ciulla 2016).

En el tercer trabajo se llevó a cabo la evaluación del potencial terapéutico de GDNF en combinación con vitamina E y de la combinación de GDNF, vitamina E y melatonina encapsulados en microesferas de PLGA sobre la supervivencia de células fotorreceptoras en un modelo animal de degeneración genética de fotorreceptores (rho-/-). Este trabajo fue realizado en colaboración con el Schepens Eye Research Institute de la Universidad de Harvard en Boston, Estados Unidos.

Para la consecución de este trabajo se prepararon dos formulaciones microparticulares de PLGA empleando para ello el protocolo de elaboración antes citado, que permite la liberación del factor neurotrófico en su forma bioactiva debido a su encapsulación en estado sólido (técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A) (Checa-Casalengua, Jiang et al. 2012). La primera formulación se elaboró con GDNF y vitamina E y la segunda formulación incorporó además de GDNF y vitamina E, otra sustancia activa: melatonina. De forma adicional y con el fin de poder establecer comparaciones preliminares, también se prepararon microesferas de PLGA con vitamina E, microesferas de PLGA con melatonina y vitamina E y microesferas de PLGA con melatonina únicamente.

La caracterización *in vitro* de las formulaciones se llevó a cabo mediante el estudio de su morfología, tamaño (tamaño de partícula medio y distribución de tamaño de partícula), eficacia de encapsulación y perfil de liberación *in vitro* de GDNF y melatonina.

Para ambas formulaciones las partículas obtenidas fueron esféricas, con poros en su superficie y con un tamaño de partícula comprendido entre 20 y 40 μm ($21,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ para la formulación de GDNF y $24,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ para la formulación de GDNF/melatonina), adecuado para su administración intravítrea al igual que en los trabajos anteriores (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). La cantidad de GDNF incorporada a las MSs resultó más elevada en la formulación de GDNF y vitamina E ($34,7 \pm 5,3 \text{ ng GDNF/mg MSs}$) que en la formulación elaborada con la combinación de GDNF, melatonina y vitamina E ($22,1 \pm 0,8 \text{ ng GDNF/mg MSs}$). Por su parte, la encapsulación de melatonina en esta formulación alcanzó valores de $32,8 \pm 0,2 \mu\text{g melatonina/mg MSs}$.

Para la elaboración de estas microesferas también se seleccionó como polímero el PLGA. Este tipo de polímero ya se emplea en la práctica clínica en un implante biodegradable que contiene dexametasona (Ozurdex®, Allergan, Inc., Irvine, CA). Ozurdex® ha sido aprobado para el tratamiento del edema macular después de la oclusión de la ramas venosas de la retina (ORVR) o la

oclusión de la vena central de la retina (OVCR), uveítis y edema macular diabético (Kapoor, Wagner et al. 2015, Whitcup and Robinson 2015). Tal y como se ha mencionado anteriormente, debido al mecanismo de degradación que experimentan las microesferas de PLGA, se producen perfiles de liberación caracterizados por etapas que combinan velocidades de liberación lentas y rápidas observados también en las formulaciones elaboradas para este trabajo (Mao, Xu et al. 2007, Ahmed, Elkharraz et al. 2012). La liberación de GDNF observada a las 24 horas representó el 75% ($26,12 \pm 1,2$ ng GDNF/mg MSs) de la proteína encapsulada para la formulación de GDNF. Posteriormente, se produjo una liberación baja pero continua del factor neurotrófico desde el día 7 al día 42 (65 pg de GDNF/mg MSs/día), seguida de una etapa de liberación moderada desde el día 42 al día 56 (48 pg de GDNF/mg MSs/día). Por último, desde el día 56 hasta el final del ensayo, tuvo lugar una etapa de liberación rápida (140 pg de GDNF/mg MSs/día). En el caso de la formulación de GDNF y melatonina, la liberación de GDNF observada a las 24 horas representó el 44% ($9,7 \pm 0,2$ ng GDNF/mg MSs) de la proteína encapsulada. A continuación, se liberaron pequeñas cantidades de GDNF desde el día 7 al día 35 a una velocidad de 36 pg de GDNF/mg MSs/día. En el caso de las MSs cargadas con GDNF y melatonina no se observó ese incremento posterior en la velocidad de liberación de GDNF y éste fue liberado lentamente (19 pg de GDNF/mg MSs/día) desde el día 35 hasta el final del ensayo (día 63)), sin ninguna etapa de liberación rápida. El perfil de liberación *in vitro* de melatonina a partir de las MSs cargadas con GDNF/melatonina resultó similar a los perfiles de GDNF. Después de una liberación rápida durante los primeros 7 días, se observó una liberación sostenida desde el día 7 hasta el día 14 (97 ng de melatonina/mg MSs/día) seguida de una liberación muy lenta hasta el día 56 (14 ng de melatonina/mg MSs/día). Desde ese punto hasta el final del ensayo, la melatonina experimentó un aumento notable en su velocidad de liberación (1 μ g de melatonina/mg MSs/día). Como se muestra en los resultados, la incorporación de un tercer componente hidrófobo en estado sólido (melatonina) a la formulación promueve ciertos cambios en el perfil de liberación de GDNF, no sólo reduciendo la liberación inicial a las 24h, sino también incrementando la

duración de la etapa de liberación lenta y disminuyendo los valores de velocidad de liberación del factor neurotrófico. En el caso de la melatonina, el perfil de liberación fue el típico de las microesferas de PLGA, combinando velocidades de liberación lentas y rápidas.

Desde el punto de vista tecnológico, la encapsulación de más de un compuesto activo en el mismo sistema microparticulaar sigue siendo un desafío. En los últimos años se han estudiado varias estrategias para acometer este objetivo. Por ejemplo, Feng et al. desarrollaron microesferas de PLGA cargadas con doxorrubicina y paclitaxel para el tratamiento *in situ* del cáncer de pulmón metastásico. Para la elaboración de las microesferas emplearon la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión $A_1/O/A_2$, incorporando el fámaco hidrofílico (doxorrubicina) en la fase acuosa interna (A_1) y el fámaco hidrofóbico (paclitaxel) en la fase orgánica (O) de la doble emulsión, obteniendo de este modo partículas de PLGA porosas para inhalación (Feng, Tian et al. 2014). Zhang et al. por su parte elaboraron microesferas de PLGA incluyendo dos factores de crecimiento (proteína morfogénica ósea y factor de crecimiento endotelial vascular) que posteriormente fueron incluidos en matrices inorgánicas para el tratamiento de la necrosis ósea. Estos autores también recurrieron a la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión $A_1/O/A_2$, e incluyeron ambas sustancias activas en la fase interna de la emulsión. Los estudios que realizaron *in vitro* demostraron la capacidad de estos sistemas para la liberación de forma controlada ambas proteínas y los ensayos *in vivo* resultaron satisfactorios igualmente (Zhang, Zhang et al. 2016). Desde nuestro entendimiento, esta es la primera vez que se emplea la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión $S/O/A$ para microencapsular más de un compuesto activo en la misma formulación de microesferas.

Con el fin de determinar la capacidad de las diferentes formulaciones para evitar la muerte celular y seleccionar una concentración adecuada de microesferas para el posterior ensayo *in vivo*, se realizó un estudio preliminar *in*

in vitro de supervivencia celular. Para ello se emplearon células progenitoras de la retina humana (hCPR) sometidas a estrés oxidativo mediante la adición de peróxido de hidrógeno. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de microesferas (desde 0,09 mg/mL hasta 11 mg/mL de MSs) incluyendo en el ensayo tanto aquellas que llevaban GDNF y GDNF/melatonina, como aquellas que se prepararon para fines comparativos (sin factor neurotrófico). Trascurridas 48 h, se determinó el número y la viabilidad celular mediante fluorescencia, empleando para ello un kit de proliferación celular (CyQUANT NF). Las formulaciones cargadas con el factor neurotrófico GDNF condujeron a un alto porcentaje de supervivencia celular: por encima del 80% para las microesferas cargadas con GDNF y casi el 100% para las microesferas cargadas con GDNF y melatonina, incluso con menores cantidades de factor neurotrófico respecto a la formulación de GDNF y vitamina E. Este hecho es importante si nos referimos a los valores de liberación *in vitro* calculados tras 48h de cesión que fueron aproximadamente dos veces superiores para la formulación de GDNF (22,39 ng GDNF/mg MSs) que para la formulación de GDNF y melatonina (9,89 ng GDNF/mg MSs). Por su parte, la liberación de melatonina calculada a las 48 h fue de 1,475 µg melatonina/mg MSs.

Una vez evaluado el potencial de las microesferas en un cultivo celular, las MSs fueron suspendidas en HBSS (solución salina balanceada de Hanks) e inyectadas directamente en el vítreo de un modelo animal de degeneración retiniana (ratones rho-/-) para el posterior estudio *in vivo* de supervivencia de células fotorreceptoras. Se inyectaron aproximadamente 0,05 mg de microesferas en cada ojo tratado. La dosis administrada de cada formulación fue de 1735 pg y de 1105 pg para la formulación de GDNF y vitamina E y para la formulación de GDNF, vitamina E y melatonina respectivamente, de acuerdo a su eficacia de encapsulación.

Para determinar el efecto de las formulaciones sobre los fotorreceptores se realizaron análisis estructurales (inmunohistoquímica y morfología) y funcionales (electroretinografía). La inyección intravítrea tanto de las

microesferas de GDNF y vitamina E como de las microesferas de GDNF, vitamina E y melatonina, ejercieron un efecto positivo sobre la supervivencia de los fotorreceptores. La cuantificación del número de fotorreceptores indicó que ambas formulaciones proporcionaron un rescate significativo de los fotorreceptores en comparación con los grupos de microesferas blanco y los no tratados. Además, un resultado interesante de este estudio es que el rescate de los fotorreceptores fue uniforme en toda la retina, hecho que podría atribuirse a la liberación continua y prolongada de los agentes activos sobre la retina a partir de la formulación de MSs. La arquitectura de la retina no se vio afectada por el tratamiento. Los análisis inmunohistoquímicos mostraron que tanto los marcadores de fotorreceptores como los marcadores gliales presentaron una expresión muy similar en ambos grupos de tratamiento. No obstante, la glía se mantuvo ligeramente reactiva, resultado esperado en este modelo de degeneración de retina. En cuanto a los estudios de ERG los resultados funcionales mostraron que 9 semanas después de la administración de las microesferas, las amplitudes de las ondas b fueron estadísticamente más elevadas en los grupos tratados con GDNF que en los grupos a los que se les administró microesferas blanco o los grupos no tratados. Estos resultados sugieren que ambas formulaciones proporcionan un rescate funcional de los fotorreceptores tras 9 semanas de tratamiento.

La utilidad del GDNF administrado desde un sistema de liberación controlado, como son las microesferas de PLGA, en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina en las que los fotorreceptores se ven afectados, ya ha sido demostrada previamente por otros autores. Por ejemplo, Andrieu-Soler et al. mostraron la eficacia de este factor neurotrófico sobre el rescate de fotorreceptores en un modelo animal de ratón rd1/rd1 al que se le administraron microesferas de PLGA cargadas con rhGDNF mediante una inyección intravítrea. Estos autores observaron un retraso significativo en la degeneración de los bastones en ratones de edad posnatal 28 que recibieron las MSs cargadas con rhGDNF (dosis total 0.38 µg de GDNF) con un efecto protector durante 17 días en comparación con ratones que no recibieron tratamiento o con ratones que recibieron microesferas blanco (Andrieu-Soler,

Aubert-Pouessel et al. 2005). En el estudio desarrollado en la presente tesis doctoral, las dosis iniciales de GDNF administradas fueron más bajas, sin embargo, la administración de nuestras formulaciones en un modelo animal de degeneración retiniana (ratón rho (-/-)) resultó ser eficaz en el rescate de fotorreceptores, observándose este efecto 63 días después de la inyección de las microesferas tanto en el caso de GDNF y vitamina E como en el caso de la triple combinación de GDNF, vitamina E y melatonina.

Curiosamente, se observó un efecto neuroprotector similar para ambas formulaciones, incluso con cantidades de GDNF del orden de dos veces inferiores en el caso de las MSs de GDNF y melatonina de acuerdo a los estudios *in vitro* realizados. Tal y como se ha mencionado anteriormente, este efecto positivo de la terapia combinada de GDNF y melatonina también fue observado inicialmente en el estudio *in vitro* de supervivencia de hCPR. Los hallazgos obtenidos en este estudio sugieren que la melatonina podría tener un potencial efecto terapéutico adicional y que la terapia neuroprotectora para la degeneración retiniana no se limita al uso de una única molécula activa. No obstante se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis.

Sin embargo, aunque son pocos los estudios publicados, ya se han hecho algunos ensayos para explorar la utilidad de sistemas de "co-administración" de sustancias activas a nivel ocular. Recientemente, Nagai et al. desarrollaron un sistema micro-reservorio no biodegradable destinado a la implantación transescleral con capacidad para "co-liberar" pequeñas moléculas activas durante 4 semanas (Nagai, Kaji et al. 2014). Posteriormente este mismo dispositivo fue empleado para la "co-administración" de edaravona (eliminador de radicales libres) y un análogo de prostaglandina (neuroprotector) en el tratamiento del daño de retina inducido por luz en ratas (Nagai, Kaji et al. 2014). Sin embargo, hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa la "co-administración" a largo plazo de dos sustancias activas (de altos y bajos pesos moleculares) incluidas en el mismo sistema biodegradable para la administración intravítrea.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. La formulación de microesferas desarrollada en este trabajo permite alcanzar concentraciones de GDNF “*in vivo*” durante seis meses que podrían resultar de interés terapéutico en el tratamiento de patologías crónicas del nervio óptico y de la retina.

2. La plataforma basada en cultivos organotípicos de retina de rata sirve como herramienta para la evaluación de la eficacia y tolerancia de sustancias activas, biomateriales y sistemas de cesión controlada.

3. Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado el beneficio de la inclusión de vitamina E como aditivo con actividad terapéutica en la formulación de microesferas.

4. El método de microencapsulación desarrollado por el grupo de investigación y empleado en esta tesis doctoral ha permitido la encapsulación de un producto biotecnológico (GDNF) y un fármaco de bajo peso molecular (melatonina) en el mismo sistema farmacéutico. Las microesferas desarrolladas son capaces de liberar simultáneamente ambas sustancias activas, de forma sostenida, durante al menos 63 días.

5. La inyección intravítrea de las microesferas de PLGA/VitE elaboradas con GDNF en un modelo animal de degeneración retiniana (ratones rho (-/-)) da lugar a la protección parcial de los fotorreceptores tanto desde un punto de vista morfológico como funcional hasta las 9 semanas después de la administración, demostrando la utilidad de los sistemas desarrollados en este tipo de patologías.

6. La estrategia terapéutica basada en la liberación simultánea de GDNF y melatonina a partir de microesferas de PLGA/VitE ha permitido aumentar la supervivencia de los fotorreceptores en el modelo animal de degeneración retiniana. Estos resultados ponen de manifiesto el potencial de la “co-liberación” de más de un agente neuroprotector a partir de las micropartículas desarrolladas en el tratamiento de patologías degenerativas de la retina.

CONCLUSIONS

1. The formulation of microspheres developed in this study enabled “*in vivo*” GDNF concentrations to be reached for six months. This could be of therapeutic interest in the treatment of chronic diseases of the optic nerve and retina.

2. The platform based on organotypic cultures of rat retina served as a tool to evaluate the efficacy and tolerance of active substances, biomaterials and systems for controlled release.

3. The results obtained in this study demonstrated the benefit of including vitamin E as an additive with therapeutic activity in the formulation of microspheres.

4. The microencapsulation method developed by the research group and used in this doctoral thesis enabled the encapsulation of a biotechnological product (GDNF) and a low-molecular-weight drug (melatonin) in the same pharmaceutical system. The microspheres developed were capable of simultaneously releasing both active substances in a sustained manner for at least 63 days.

5. Intravitreal injection of PLGA/VitE microspheres prepared with GDNF in an animal model of retinal degeneration (Rho^{-/-} mice) led to partial protection of photoreceptors from both a morphological and a functional point of view up to 9 weeks after administration. This demonstrated the usefulness of the systems developed in this type of disease.

6. The therapeutic strategy based on the simultaneous release of GDNF and melatonin from microspheres of PLGA/VitE increased the survival of the photoreceptors in the animal model of retinal degeneration. These results revealed the potential for "co-release" of more than one neuroprotective agent from the microparticles developed in the treatment of degenerative diseases of the retina.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abed, E., G. Corbo and B. Falsini (2015). "Neurotrophin family members as neuroprotectants in retinal degenerations." BioDrugs 29(1): 1-13.
- Abrego, G., H. Alvarado, E. B. Souto, B. Guevara, L. H. Bellowa, A. Parra, A. Calpena and M. L. Garcia (2015). "Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration." Eur J Pharm Biopharm 95(Pt B): 261-270.
- Achouri, D., K. Alhanout, P. Piccerelle and V. Andrieu (2013). "Recent advances in ocular drug delivery." Drug Dev Ind Pharm 39(11): 1599-1617.
- Aftab, U., C. Jiang, B. Tucker, J. Y. Kim, H. Klassen, E. Miljan, J. Sinden and M. Young (2009). "Growth kinetics and transplantation of human retinal progenitor cells." Exp Eye Res 89(3): 301-310.
- Agorastos, A. and C. G. Huber (2011). "The role of melatonin in glaucoma: implications concerning pathophysiological relevance and therapeutic potential." J Pineal Res 50(1): 1-7.
- Ahlemeyer, B. and J. Krieglstein (2003). "Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract." Cell Mol Life Sci 60(9): 1779-1792.
- Ahmed, A. R., K. Elkharraz, M. Irfan and R. Bodmeier (2012). "Reduction in burst release after coating poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microparticles with a drug-free PLGA layer." Pharm Dev Technol 17(1): 66-72.
- Ahram, D. F., W. L. Alward and M. H. Kuehn (2015). "The genetic mechanisms of primary angle closure glaucoma." Eye (Lond) 29(10):1251-1259.
- Airaksinen, M. S. and M. Saarma (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." Nat Rev Neurosci 3(5): 383-394.

- Al Haushey, L., M. A. Bolzinger, C. Bordes, J. Y. Gauvrit and S. Briancon (2007). "Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design." Int J Pharm 344(1-2): 16-25.
- Alhassan, M. B., F. Kyari and H. O. Ejere (2015). "Peribulbar versus retrobulbar anaesthesia for cataract surgery." Cochrane Database Syst Rev 7: CD004083.
- Alkozi, H., J. Sanchez-Naves, M. J. de Lara, G. Carracedo, B. Fonseca, A. Martinez-Aguila and J. Pintor (2017). "Elevated intraocular pressure increases melatonin levels in the aqueous humour." Acta Ophthalmol 95(3):e185-e189.
- Alkozi, H. A. and J. Pintor (2015). "TRPV4 activation triggers the release of melatonin from human non-pigmented ciliary epithelial cells." Exp Eye Res 136: 34-37.
- Almasieh, M., A. M. Wilson, B. Morquette, J. L. Cueva Vargas and A. Di Polo (2012). "The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma." Prog Retin Eye Res 31(2): 152-181.
- Alonso, M. J., R. K. Gupta, C. Min, G. R. Siber and R. Langer (1994). "Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems." Vaccine 12(4): 299-306.
- Allen, S. J., J. J. Watson, D. K. Shoemark, N. U. Barua and N. K. Patel (2013). "GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration." Pharmacol Therapeut 138(2): 155-175.
- Ames, A., 3rd and A. B. Hastings (1956). "Studies on water and electrolytes in nervous tissue. I. Rabbit retina: methods and interpretation of data." J Neurophysiol 19(3): 201-212.
- Ames, A., 3rd (1956). "Studies on water and electrolytes in nervous tissue. II. Effect of glutamate and glutamine." J Neurophysiol 19(3): 213-223.
- Ames, A., 3rd and D. A. Pollen (1969). "Neurotransmission in central nervous tissue: a study of isolated rabbit retina." J Neurophysiol 32(3): 424-442.

- Anasagasti, A., C. Irigoyen, O. Barandika, A. Lopez de Munain and J. Ruiz-Ederra (2012). "Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa." Vision Res 75: 117-129.
- Andreas, K., R. Zehbe, M. Kazubek, K. Grzeschik, N. Sternberg, H. Baumler, H. Schubert, M. Sittinger and J. Ringe (2011). "Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: investigation for cartilage tissue engineering." Acta Biomater 7(4): 1485-1495.
- Andres-Guerrero, V., M. Zong, E. Ramsay, B. Rojas, S. Sarkhel, B. Gallego, R. de Hoz, A. I. Ramirez, J. J. Salazar, A. Trivino, J. M. Ramirez, N. Cameron, B. de-Las-Heras, A. Urtti, G. Mihov, A. Dias and R. Herrero-Vanrell (2015). "Novel biodegradable polyesteramide microspheres for controlled drug delivery in Ophthalmology." J Control Release 211: 105-117.
- Andrieu-Soler, C., A. Aubert-Pouessel, M. Doat, S. Picaud, M. Halhal, M. Simonutti, M. C. Venier-Julienne, J. P. Benoit and F. Behar-Cohen (2005). "Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse." Mol Vis 11: 1002-1011.
- Araie, M. and C. Mayama (2011). "Use of calcium channel blockers for glaucoma." Prog Retin Eye Res 30(1): 54-71.
- Arango-Gonzalez, B., A. Szabo, G. Pinzon-Duarte, A. Lukats, E. Guenther and K. Kohler (2010). "In vivo and in vitro development of S- and M-cones in rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci 51(10): 5320-5327.
- Aref, A. A. (2012). "Management of immediate and sustained intraocular pressure rise associated with intravitreal antivascular endothelial growth factor injection therapy." Curr Opin Ophthalmol 23(2): 105-110.
- Aubert-Pouessel, A., M. C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C. N. Montero-Menei, E. Garcion, D. C. Bibby, P. Menei and J. P. Benoit (2004). "In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres." J Control Release 95(3): 463-475.

- Azadi, S., L. E. Johnson, F. Paquet-Durand, M. T. Perez, Y. Zhang, P. A. Ekstrom and T. van Veen (2007). "CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina." Brain Res 1129(1): 116-129.
- Baba, K., A. Benleulmi-Chaachoua, A. S. Journe, M. Kamal, J. L. Guillaume, S. Dussaud, F. Gbahou, K. Yettou, C. Liu, S. Contreras-Alcantara, R. Jockers and G. Tosini (2013). "Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function." Sci Signal 6(296): ra89.
- Bahr, M., J. Vanselow and S. Thanos (1988). "In vitro regeneration of adult rat ganglion cell axons from retinal explants." Exp Brain Res 73(2): 393-401.
- Bai, N., T. Aida, M. Yanagisawa, S. Katou, K. Sakimura, M. Mishina and K. Tanaka (2013). "NMDA receptor subunits have different roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina." Mol Brain 6: 34.
- Bai, Y., J. Xu, F. Brahim, Y. Zhuo, M. V. Sarunic and H. U. Saragovi (2010). "An agonistic TrkB mAb causes sustained TrkB activation, delays RGC death, and protects the retinal structure in optic nerve axotomy and in glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 51(9): 4722-4731.
- Bakalash, S., A. Kessler, T. Mizrahi, R. Nussenblatt and M. Schwartz (2003). "Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(8): 3374-3381.
- Balazs, E. (1984). Functional anatomy of the vitreous. en: Duane TD, Jaeger EA (eds) Biomedical foundations of ophthalmology, vol 1. Lippincott, Philadelphia.
- Baltmr, A., J. Duggan, S. Nizari, T. E. Salt and M. F. Cordeiro (2010). "Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role?" Exp Eye Res 91(5): 554-566.
- Bangham, A. D., M. M. Standish and J. C. Watkins (1965). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." J Mol Biol 13(1): 238-252.

- Bansal, P., S. Garg, Y. Sharma and P. Venkatesh (2016). "Posterior Segment Drug Delivery Devices: Current and Novel Therapies in Development." J Ocul Pharmacol Ther 32(3): 135-144.
- Bansal, P., V. Gupta, A. Gupta, M. R. Dogra and J. Ram (2016). "Efficacy of Ozurdex implant in recalcitrant diabetic macular edema-a single-center experience." Int Ophthalmol 36(2):207-216.
- Baranov, P. Y., B. A. Tucker and M. J. Young (2014). "Low-oxygen culture conditions extend the multipotent properties of human retinal progenitor cells." Tissue Eng Part A 20(9-10): 1465-1475.
- Baras, B., M. A. Benoit and J. Gillard (2000). "Parameters influencing the antigen release from spray-dried poly(DL-lactide) microparticles." Int J Pharm 200(1): 133-145.
- Barbacid, M. (1995). "Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors." Ann N Y Acad Sci 766: 442-458.
- Barber, A. J., E. Lieth, S. A. Khin, D. A. Antonetti, A. G. Buchanan and T. W. Gardner (1998). "Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin." J Clin Invest 102(4): 783-791.
- Barcia, E., R. Herrero-Vanrell, A. Diez, C. Alvarez-Santiago, I. Lopez and M. Calonge (2009). "Downregulation of endotoxin-induced uveitis by intravitreal injection of polylactic-glycolic acid (PLGA) microspheres loaded with dexamethasone." Exp Eye Res 89(2): 238-245.
- Bartlett, S. E., G. B. Banks, A. J. Reynolds, M. J. Waters, I. A. Hendry and P. G. Noakes (2001). "Alterations in ciliary neurotrophic factor signaling in rapsyn deficient mice." J Neurosci Res 64(6): 575-581.
- Bastianetto, S., W. H. Zheng and R. Quirion (2000). "The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C." J Neurochem 74(6): 2268-2277.

- Batschauer, A. (2003). Photoreceptors and light signalling, en: *Comprehensive Series in Photochemistry & Photobiology*, vol 3. RS-C.
- Behar-Cohen, F. F., A. El Aouni, S. Gautier, G. David, J. Davis, P. Chapon and J. M. Parel (2002). "Transscleral Coulomb-controlled iontophoresis of methylprednisolone into the rabbit eye: influence of duration of treatment, current intensity and drug concentration on ocular tissue and fluid levels." *Exp Eye Res* 74(1): 51-59.
- Behl, T. and A. Kotwani (2015). "Exploring the various aspects of the pathological role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy." *Pharmacol Res* 99: 137-148.
- Belforte, N. A., M. C. Moreno, N. de Zavalía, P. H. Sande, M. S. Chianelli, M. I. Keller Sarmiento and R. E. Rosenstein (2010). "Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma." *J Pineal Res* 48(4): 353-364.
- Benoit, J. P., N. Faisant, M. C. Venier-Julienne and P. Menei (2000). "Development of microspheres for neurological disorders: from basics to clinical applications." *J Control Release* 65(1-2): 285-296.
- Bhatt, L., G. Groeger, K. McDermott and T. G. Cotter (2010). "Rod and cone photoreceptor cells produce ROS in response to stress in a live retinal explant system." *Mol Vis* 16: 283-293.
- Bhutto, I. and G. Luttý (2012). "Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex." *Mol Aspects Med* 33(4): 295-317.
- Bilati, U., E. Allemann and E. Doelker (2005). "Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles." *Eur J Pharm Biopharm* 59(3): 375-388.
- Bilgin, G. (2014). "Normal-tension glaucoma and obstructive sleep apnea syndrome: a prospective study." *BMC Ophthalmol* 14: 27.

- Birch, D. G., R. G. Weleber, J. L. Duncan, G. J. Jaffe and W. Tao (2013). "Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa." Am J Ophthalmol 156(2): 283-292 e281.
- Bitz, C. and E. Doelker (1996). "Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres." Int J Pharm 131(2): 171-181.
- Blake, C. C., L. C. Serpell, M. Sunde, O. Sandgren and E. Lundgren (1996). "A molecular model of the amyloid fibril." Ciba Found Symp 199: 6-15; discussion 15-21, 40-16.
- Blanco-Prieto, M. J., K. Besseghir, P. Orsolini, F. Heimgartner, C. Deuschel, H. P. Merkle, H. Nam-Tran and B. Gander (1999). "Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres." Int J Pharm 184(2): 243-250.
- Blasiak, J., G. Petrovski, Z. Vereb, A. Facsko and K. Kaarniranta (2014). "Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration." Biomed Res Int 2014: 768026.
- Bo, Q., S. Ma, Q. Han, F. E. Wang, X. Li and Y. Zhang (2015). "Role of autophagy in photoreceptor cell survival and death." Crit Rev Eukaryot Gene Expr 25(1): 23-32.
- Bochoř, A. and E. Fattal (2012). "Liposomes for intravitreal drug delivery: a state of the art." J Control Release 161(2): 628-634.
- Bok, D. (1993). "The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision." J Cell Sci 17 Suppl: 189-195.
- Bösze, Z. and L. M. Houdebine (2006). "Application of rabbits in biomedical research: a review." World Rabbit Sci 14(1): 01-14.
- Bourges, J. L., E. Touchard, L. Kowalczyk, M. Berdugo, A. Thomas-Doyle, A. Bochoř, A. Gomez, F. Azan, R. Gurny and F. Behar-Cohen (2007). "[Drug delivery systems for intraocular applications]." J Fr Ophthalmol 30(10): 1070-1088.

- Boye, S. E., S. L. Boye, A. S. Lewin and W. W. Hauswirth (2013). "A comprehensive review of retinal gene therapy." Mol Ther 21(3): 509-519.
- Boyer, D. S. (2013). "Drug Delivery to the Posterior Segment: An Update." Retina Today: 52-56.
- Bravo-Osuna, I., V. Andres-Guerrero, P. Pastoriza Abal, I. T. Molina-Martinez and R. Herrero-Vanrell (2016). "Pharmaceutical microscale and nanoscale approaches for efficient treatment of ocular diseases." Drug Deliv Transl Res 6(6): 686-707.
- Brodski, C., D. M. Vogt Weisenhorn and G. Dechant (2002). "Therapy of neurodegenerative diseases using neurotrophic factors: cell biological perspective." Expert Rev Neurother 2(3): 417-426.
- Bull, N. D., K. A. Irvine, R. J. Franklin and K. R. Martin (2009). "Transplanted oligodendrocyte precursor cells reduce neurodegeneration in a model of glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 50(9): 4244-4253.
- Bull, N. D., T. V. Johnson, G. Welsapar, N. W. DeKorver, S. I. Tomarev and K. R. Martin (2011). "Use of an adult rat retinal explant model for screening of potential retinal ganglion cell neuroprotective therapies." Invest Ophthalmol Vis Sci 52(6): 3309-3320.
- Bungenburg de Jong, H. and A. Kaas (1931). "Zur Kenntnis komplexkooperation, V. Mitteilung: relative verschiebung im elektrischen gleichstromfeld von flüssigkeitseinschlüssen in komplexkooperationstropfen." Biochem. Z 232: 338-345.
- Bursell, S. E., A. C. Clermont, L. P. Aiello, L. M. Aiello, D. K. Schlossman, E. P. Feener, L. Laffel and G. L. King (1999). "High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes." Diabetes Care 22(8): 1245-1251.
- Burton, G. and K. U. Ingold (1986). "Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function." Acc Chem Res 19(7): 194-201.

- Buschini, E., A. M. Fea, C. A. Lavia, M. Nassisi, G. Pignata, M. Zola and F. M. Grignolo (2015). "Recent developments in the management of dry age-related macular degeneration." Clin Ophthalmol 9: 563-574.
- Caffe, A. R., P. Ahuja, B. Holmqvist, S. Azadi, J. Forsell, I. Holmqvist, A. K. Soderpalm and T. van Veen (2001). "Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium." J Chem Neuroanat 22(4): 263-273.
- Caffe, A. R., A. K. Soderpalm, I. Holmqvist and T. van Veen (2001). "A combination of CNTF and BDNF rescues rd photoreceptors but changes rod differentiation in the presence of RPE in retinal explants." Invest Ophthalmol Vis Sci 42(1): 275-282.
- Caprioli, J. and A. L. Coleman (2010). "Blood pressure, perfusion pressure, and glaucoma." Am J Ophthalmol 149(5): 704-712.
- Cardenas-Bailon, F., G. Osorio-Revilla and T. Gallardo-Velazquez (2015). "Microencapsulation of insulin using a W/O/W double emulsion followed by complex coacervation to provide protection in the gastrointestinal tract." J Microencapsul 32(3): 308-316.
- Cardillo, J. A., A. A. Souza-Filho and A. G. Oliveira (2006). "Intravitreal Bioerudivel sustained-release triamcinolone microspheres system (RETAAC). Preliminary report of its potential usefulness for the treatment of diabetic macular edema." Arch Soc Esp Oftalmol 81(12): 675-677, 679-681.
- Carrasco, M. C., J. Navascues, M. A. Cuadros, R. Calvente, D. Martin-Oliva, A. M. Santos, A. Sierra, R. M. Ferrer-Martin and J. L. Marin-Teva (2011). "Migration and ramification of microglia in quail embryo retina organotypic cultures." Dev Neurobiol 71(4): 296-315.
- Carrasquillo, K. G., J. C. Carro, A. Alejandro, D. D. Toro and K. Griebenow (2001). "Reduction of structural perturbations in bovine serum albumin by non-aqueous microencapsulation." J Pharm Pharmacol 53(1): 115-120.

- Carwile, M. E., R. B. Culbert, R. L. Sturdivant and T. W. Kraft (1998). "Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF." Exp Eye Res 66(6): 791-805.
- Casson, R. J., G. Chidlow, A. Ebnetter, J. P. Wood, J. Crowston and I. Goldberg (2012). "Translational neuroprotection research in glaucoma: a review of definitions and principles." Clin Exp Ophthalmol 40(4): 350-357.
- Catrina, S., B. Gander and S. Madduri (2013). "Nerve conduit scaffolds for discrete delivery of two neurotrophic factors." Eur J Pharm Biopharm 85(1): 139-142.
- Cohen, J. J. (1993). "Apoptosis." Immunol Today 14(3): 126-130.
- Cole, D. (1977). "Secretion of the aqueous humour." Exp Eye Res 25: 161-176.
- Colthurst, M. J., R. L. Williams, P. S. Hiscott and I. Grierson (2000). "Biomaterials used in the posterior segment of the eye." Biomaterials 21 (7): 649-665.
- Conti, B., C. Bucolo, C. Giannavola, G. Puglisi, P. Giunchedi and U. Conte (1997). "Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: in vitro/in vivo evaluation." Eur J Pharm Sci 5(5): 287-293.
- Cosman, K. M., L. L. Boyle and A. P. Porsteinsson (2006). "Memantine in the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease." Am J Geriatr Psychiatry 14(8): 704-715.
- Crane, F. L. (2001). "Biochemical functions of coenzyme Q10." J Am Coll Nutr 20(6): 591-598.
- Cuenca, N., L. Fernández-Sánchez, L. Campello, V. Maneu, P. De la Villa, P. Lax and I. Pinilla (2014). "Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases." Prog Retin Eye Res 43(0): 17-75.
- Cybulska-Heinrich, A. K., M. Mozaffarieh and J. Flammer (2012). "Ginkgo biloba: an adjuvant therapy for progressive normal and high tension glaucoma." Mol Vis 18: 390-402.

- Chaudhary, P., F. Ahmed and S. C. Sharma (1998). "MK801-a neuroprotectant in rat hypertensive eyes." Brain Res 792(1): 154-158.
- Checa-Casalengua, P., C. Jiang, I. Bravo-Osuna, B. A. Tucker, I. T. Molina-Martínez, M. J. Young and R. Herrero-Vanrell (2011). "Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure." J Control Release 156(1): 92-100.
- Checa-Casalengua, P., C. Jiang, I. Bravo-Osuna, B. A. Tucker, I. T. Molina-Martínez, M. J. Young and R. Herrero-Vanrell (2012). "Preservation of biological activity of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) after microencapsulation and sterilization by gamma irradiation." Int J Pharm 436(1-2): 545-554.
- Chen, J., S. A. Runyan and M. R. Robinson (2011). "Novel ocular antihypertensive compounds in clinical trials." Clin Ophthalmol 5: 667-677.
- Chen, T. C., P. P. Chen, B. A. Francis, A. K. Junk, S. D. Smith, K. Singh and S. C. Lin (2014). "Pediatric glaucoma surgery: a report by the American Academy Of Ophthalmology." Ophthalmology 121(11): 2107-2115.
- Chen, Z.-Y., Z.-Y. He, C. He, C.-L. Lu and X.-F. Wu (2000). "Human Glial Cell-Line-Derived Neurotrophic Factor: A Structure-Function Analysis." Biochem Bioph Res Co 268(3): 692-696.
- Cheng, Y. H., L. Illum and S. S. Davis (1998). "A poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol." J Control Release 55(2-3): 203-212.
- Cheung, W., L. Guo and M. F. Cordeiro (2008). "Neuroprotection in glaucoma: drug-based approaches." Optom Vis Sci 85(6): 406-416.
- Chidlow, G., J. P. Wood and R. J. Casson (2007). "Pharmacological neuroprotection for glaucoma." Drugs 67(5): 725-759.

- Chidlow, G., J. P. Wood and R. J. Casson (2014). "Expression of inducible heat shock proteins Hsp27 and Hsp70 in the visual pathway of rats subjected to various models of retinal ganglion cell injury." PLoS One 9(12): e114838.
- Chinskey, N. D., C. G. Besirli and D. N. Zacks (2014). "Retinal cell death and current strategies in retinal neuroprotection." Curr Opin Ophthalmol 25(3): 228-233.
- Choi, S. Y., D. W. Kim, S. H. Lee, J. Park and W. S. Eum (2015). Eye drop composition for prevention and treatment of ophthalmic diseases containing fusion protein of FK506 binding protein, US patent #8962567B2.
- Choonara, Y. E., V. Pillay, M. P. Danckwerts, T. R. Carmichael and L. C. du Toit (2010). "A review of implantable intravitreal drug delivery technologies for the treatment of posterior segment eye diseases." J Pharm Sci 99(5): 2219-2239.
- Chowdhury, D. K. and A. K. Mitra (2000). "Kinetics of a model nucleoside (guanosine) release from biodegradable poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres: a delivery system for long-term intraocular delivery." Pharm Dev Technol 5(2): 279-285.
- D'Cruz, P. M., D. Yasumura, J. Weir, M. T. Matthes, H. Abderrahim, M. M. LaVail and D. Vollrath (2000). "Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat." Hum Mol Genet 9(4): 645-651.
- Dahlmann-Noor, A. H., S. Vijay, G. A. Limb and P. T. Khaw (2010). "Strategies for optic nerve rescue and regeneration in glaucoma and other optic neuropathies." Drug Discov Today 15(7-8): 287-299.
- Danesh-Meyer, H. V. (2011). "Neuroprotection in glaucoma: recent and future directions." Curr Opin Ophthalmol 22(2): 78-86.
- Davson, H. (2012). *The Physiology of the Eye*, Elsevier.

- de Kozak, Y., K. Andrieux, H. Villarroya, C. Klein, B. Thillaye-Goldenberg, M. C. Naud, E. Garcia and P. Couvreur (2004). "Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis." Eur J Immunol 34(12): 3702-3712.
- Del Amo, E. M. and A. Urtti (2008). "Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment." Drug Discov Today 13(3-4): 135-143.
- Del Amo, E. M. and A. Urtti (2015). "Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: Clinical predictability and quality of the published data." Exp Eye Res 137: 111-124.
- Del Amo, E. M., K. S. Vellonen, H. Kidron and A. Urtti (2015). "Intravitreal clearance and volume of distribution of compounds in rabbits: In silico prediction and pharmacokinetic simulations for drug development." Eur J Pharm Biopharm.
- Del Rio, P., M. Irmeler, B. Arango-Gonzalez, J. Favor, C. Bobe, U. Bartsch, E. Vecino, J. Beckers, S. M. Hauck and M. Ueffing (2011). "GDNF-Induced Osteopontin from Muller Glial Cells Promotes Photoreceptor Survival in the Pde6b(rd1) Mouse Model of Retinal Degeneration." Glia 59(5): 821-832.
- Delyfer, M. N., M. Simonutti, N. Neveux, T. Leveillard and J. A. Sahel (2005). "Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST?" Mol Vis 11: 677-687.
- Demetriades, A. M. (2011). "Gene therapy for glaucoma." Curr Opin Ophthalmol 22(2): 73-77.
- Dinarvand, R., S. H. Moghadam, L. Mohammadyari-Fard and F. Atyabi (2003). "Preparation of biodegradable microspheres and matrix devices containing naltrexone." AAPS PharmSciTech 4(3): E34.

- Domenici, L., N. Origlia, B. Falsini, E. Cerri, D. Barloscio, C. Fabiani, M. Sanso and L. Giovannini (2014). "Rescue of retinal function by BDNF in a mouse model of glaucoma." PLoS One 9(12): e115579.
- Donovan, S. L. and M. A. Dyer (2006). "Preparation and square wave electroporation of retinal explant cultures." Nat Protoc 1(6): 2710-2718.
- Doucette, L. P., A. Rasnitsyn, M. Seifi and M. A. Walter (2015). "The interactions of genes, age, and environment in glaucoma pathogenesis." Surv Ophthalmol 60(4): 310-326.
- Duvvuri, S., K. G. Janoria, D. Pal and A. K. Mitra (2007). "Controlled delivery of ganciclovir to the retina with drug-loaded Poly(d,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres dispersed in PLGA-PEG-PLGA Gel: a novel intravitreal delivery system for the treatment of cytomegalovirus retinitis." J Ocul Pharmacol Ther 23(3): 264-274.
- Edelhauser, H. F. and J. L. Ubels (2003). The cornea and the sclera. En: Adler's Physiology of the Eye, X, Mosby, St. Louis: 47-114.
- Eigeldinger-Berthou, S., C. Meier, R. Zulliger, S. Lecaude, V. Enzmann and G. M. Sarra (2012). "Rasagiline interferes with neurodegeneration in the Prph2/rds mouse." Retina 32(3): 617-628.
- Ejstrup, R., J. F. Kiilgaard, B. A. Tucker, H. J. Klassen, M. J. Young and M. La Cour (2010). "Pharmacokinetics of intravitreal glial cell line-derived neurotrophic factor: Experimental studies in pigs." Exp Eye Res 91(6): 890-895.
- Eketjall, S., M. Fainzilber, J. Murray-Rust and C. F. Ibanez (1999). "Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFRalpha1 and activation of the GFRalpha1-c-Ret receptor complex." EMBO J 18(21): 5901-5910.
- Eljarrat-Binstock, E., J. Pe'er and A. J. Domb (2010). "New techniques for drug delivery to the posterior eye segment." Pharm Res 27(4): 530-543.

- Elorza, B., M. A. Elorza, M. C. Sainz and J. R. Chantres (1993). "Comparison of particle size and encapsulation parameters of three liposomal preparations." *J Microencapsul* 10(2): 237-248.
- EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on bioanalytical method validation 2011. [Consultado en febrero 2017]. Disponible en:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
- Engin, K. N. (2009). "Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant." *Mol Vis* 15: 855-860.
- Engin, K. N., G. Engin, H. Kucuksahin, M. Oncu, G. Engin and B. Guvener (2007). "Clinical evaluation of the neuroprotective effect of alpha-tocopherol against glaucomatous damage." *Eur J Ophthalmol* 17(4): 528-533.
- Engin, K. N., B. Yemisci, U. Yigit, A. Agachan and C. Coskun (2010). "Variability of serum oxidative stress biomarkers relative to biochemical data and clinical parameters of glaucoma patients." *Mol Vis* 16: 1260-1271.
- Erichev, V. P. and E. A. Egorov (2014). "On pathogenesis of primary open-angle glaucoma." *Vestn Oftalmol* 130(6): 98-104.
- Fagan, X. J. and S. Al-Qureshi (2013). "Intravitreal injections: a review of the evidence for best practice." *Clin Experiment Ophthalmol* 41(5): 500-507.
- Falavarjani, K. G. and Q. D. Nguyen (2013). "Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature." *Eye (Lond)* 27(7): 787-794.
- Fan, B. J. and J. L. Wiggs (2010). "Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy." *J Clin Invest* 120(9): 3064-3072.
- Fang, J., F. Jiang, J. Li and Y. Zhu (2012). "Rationale for the use of multifunctional drugs as neuroprotective agents for glaucoma." *Neural Regen Res* 7(4): 313-318.

- Farinelli, P., A. Perera, B. Arango-Gonzalez, D. Trifunovic, M. Wagner, T. Carell, M. Biel, E. Zrenner, S. Michalakis, F. Paquet-Durand and P. A. Ekstrom (2014). "DNA methylation and differential gene regulation in photoreceptor cell death." Cell Death Dis 5: e1558.
- Feng, L., S. K. Li, H. Liu, C. Y. Liu, K. LaSance, F. Haque, D. Shu and P. Guo (2014). "Ocular delivery of pRNA nanoparticles: distribution and clearance after subconjunctival injection." Pharm Res 31(4): 1046-1058.
- Feng, T., H. Tian, C. Xu, L. Lin, Z. Xie, M. H. Lam, H. Liang and X. Chen (2014). "Synergistic co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by porous PLGA microspheres for pulmonary inhalation treatment." Eur J Pharm Biopharm 88(3): 1086-1093.
- Fernandes-Cunha, G. M., J. B. Saliba, R. C. Siqueira, R. Jorge and A. Silva-Cunha (2014). "Determination of triamcinolone acetonide in silicone oil and aqueous humor of vitrectomized rabbits' eyes: Application for a pharmacokinetic study with intravitreal triamcinolone acetonide injections (Kenalog(R) 40)." J Pharm Biomed Anal 89: 24-27.
- Fischer, T. (2015). "The age-related macular degeneration as a vascular disease/part of systemic vasculopathy: contributions to its pathogenesis." Orv Hetil 156(9): 358-365.
- Flachsbarth, K., K. Kruszewski, G. Jung, W. Jankowiak, K. Riecken, L. Wagenfeld, G. Richard, B. Fehse and U. Bartsch (2014). "Neural stem cell-based intraocular administration of ciliary neurotrophic factor attenuates the loss of axotomized ganglion cells in adult mice." Invest Ophthalmol Vis Sci 55(11): 7029-7039.
- Frasson, M., S. Picaud, T. Leveillard, M. Simonutti, S. Mohand-Said, H. Dreyfus, D. Hicks and J. Sabel (1999). "Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse." Invest Ophthalmol Vis Sci 40(11): 2724-2734.
- Freiberg, S. and X. X. Zhu (2004). "Polymer microspheres for controlled drug release." Int J Pharm 282(1-2): 1-18.

- Freitas, S., H. P. Merkle and B. Gander (2005). "Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology." J Control Release 102(2): 313-332.
- Fu, Y.-J., S.-S. Shyu, F.-H. Su and P.-C. Yu (2002). "Development of biodegradable co-poly(d,l-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method." Colloids Surf B Biointerfaces 25(4): 269-279.
- Fu, Y., M. Tang, Y. Fan, H. Zou, X. Sun and X. Xu (2012). "Anti-apoptotic effects of melatonin in retinal pigment epithelial cells." Front Biosci (Landmark Ed) 17: 1461-1468.
- Gabizon, A., A. T. Horowitz, D. Goren, D. Tzemach, H. Shmeeda and S. Zalipsky (2003). "In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice." Clin Cancer Res 9(17): 6551-6559.
- Gallego, B. I., J. J. Salazar, R. de Hoz, B. Rojas, A. I. Ramirez, M. Salinas-Navarro, A. Ortin-Martinez, F. J. Valiente-Soriano, M. Aviles-Trigueros, M. P. Villegas-Perez, M. Vidal-Sanz, A. Trivino and J. M. Ramirez (2012). "IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma." J Neuroinflammation 9: 92.
- Garcia-Caballero, C., E. Prieto-Calvo, P. Checa-Casalengua, E. Garcia-Martin, V. Polo-Llorens, J. Garcia-Feijoo, I. T. Molina-Martinez, I. Bravo-Osuna and R. Herrero-Vanrell (2017). "Six month delivery of GDNF from PLGA/vitamin E biodegradable microspheres after intravitreal injection in rabbits." Eur J Pharm Sci.
- Gaudana, R., J. Jwala, S. H. Boddu and A. K. Mitra (2009). "Recent perspectives in ocular drug delivery." Pharm Res 26(5): 1197-1216.
- Geroski, D. H. and H. F. Edelhauser (2000). "Drug delivery for posterior segment eye disease." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(5): 961-964.
- Geroski, D. H. and H. F. Edelhauser (2001). "Transscleral drug delivery for posterior segment disease." Adv Drug Deliv Rev 52(1): 37-48.

- Ghalanbor, Z., M. Korber and R. Bodmeier (2010). "Improved lysozyme stability and release properties of poly(lactide-co-glycolide) implants prepared by hot-melt extrusion." Pharm Res 27(2): 371-379.
- Ghate, D., W. Brooks, B. E. McCarey and H. F. Edelhauser (2007). "Pharmacokinetics of intraocular drug delivery by periocular injections using ocular fluorophotometry." Invest Ophthalmol Vis Sci 48(5): 2230-2237.
- Ghiso, J. A., I. Doudevski, R. Ritch and A. A. Rostagno (2013). "Alzheimer's disease and glaucoma: mechanistic similarities and differences." J Glaucoma 22 Suppl 5: S36-38.
- Giordano, G. G., M. F. Refojo and M. H. Arroyo (1993). "Sustained delivery of retinoic acid from microspheres of biodegradable polymer in PVR." Invest Ophthalmol Vis Sci 34(9): 2743-2751.
- Giordano, G. G., P. Chevez-Barrios, M. F. Refojo and C. A. Garcia (1995). "Biodegradation and tissue reaction to intravitreal biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microspheres." Curr Eye Res 14(9): 761-768.
- Giri, T. K., C. Choudhary, Ajazuddin, A. Alexander, H. Badwaik and D. K. Tripathi (2013). "Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery." Saudi Pharm J 21(2): 125-141.
- Giteau, A., M. C. Venier-Julienne, A. Aubert-Pouessel and J. P. Benoit (2008). "How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?" Int J Pharm 350(1-2): 14-26.
- Gopferich, A. (1996). "Mechanisms of polymer degradation and erosion." Biomaterials 17(2): 103-114.
- Goyal, G., T. Garg, G. Rath and A. K. Goyal (2014). "Current nanotechnological strategies for treating glaucoma." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 31(5): 365-405.

- Grondin, R. and D. M. Gash (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease." J Neurol 245(11 Suppl 3): 35-42.
- Grzybowski, A. (2015). "Endophthalmitis After Intravitreal Injections: Incidence, Presentation, Management, and Visual Outcome." Am J Ophthalmol 160(1):17-25.e1.
- Gueven, N. and D. Faldu (2013). "Therapeutic strategies for Leber's hereditary optic neuropathy: A current update." Intractable Rare Dis Res 2(4): 130-135.
- Guo, L., T. E. Salt, V. Luong, N. Wood, W. Cheung, A. Maass, G. Ferrari, F. Russo-Marie, A. M. Sillito, M. E. Cheetham, S. E. Moss, F. W. Fitzke and M. F. Cordeiro (2007). "Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment." Proc Natl Acad Sci U S A 104(33): 13444-13449.
- Ha, S. K., E. Moon, M. S. Ju, D. H. Kim, J. H. Ryu, M. S. Oh and S. Y. Kim (2012). "6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: a new approach to neuroprotection." Neuropharmacology 63(2): 211-223.
- Hamel, C. (2006). "Retinitis pigmentosa." Orphanet J Rare Dis 1: 40.
- Haniu, M., J. Hui, Y. Young, J. Le, V. Katta, R. Lee, G. Shimamoto and M. F. Rohde (1996). "Glial cell line-derived neurotrophic factor: selective reduction of the intermolecular disulfide linkage and characterization of its disulfide structure." Biochemistry 35(51): 16799-16805.
- Hardeland, R. (2005). "Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance." Endocrine 27(2): 119-130.
- Hashizoe, M., Y. Ogura, T. Takanashi, N. Kunou, Y. Honda and Y. Ikada (1997). "Biodegradable polymeric device for sustained intravitreal release of ganciclovir in rabbits." Curr Eye Res 16(7): 633-639.
- Hatakeyama, J. and R. Kageyama (2002). "Retrovirus-mediated gene transfer to retinal explants." Methods 28(4): 387-395.

- Hauck, S. M., N. Kinkl, C. A. Deeg, M. Swiatek-de Lange, S. Schoffmann and M. Ueffing (2006). "GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells." Mol Cell Biol 26(7): 2746-2757.
- Haznedar, S. and B. Dortunc (2004). "Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide." Int J Pharm 269(1): 131-140.
- He, J., Z. Zhou, Y. Fan, X. Zhou and H. Du (2011). "Sustained release of low molecular weight heparin from PLGA microspheres prepared by a solid-in-oil-in-water emulsion method." J Microencapsul 28(8): 763-770.
- He, Y., Y. Liu, Y. Liu, J. Wang, X. Zhang, W. Lu, Z. Ma, X. Zhu and Q. Zhang (2006). "Cyclosporine-loaded microspheres for treatment of uveitis: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetic study." Invest Ophthalmol Vis Sci 47(9): 3983-3988.
- He, Z., A. J. Vingrys, J. A. Armitage and B. V. Bui (2011). "The role of blood pressure in glaucoma." Clin Exp Optom 94(2): 133-149.
- Herrero-Vanrell, R. and M. F. Refojo (2001). "Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery." Adv Drug Deliv Rev 52(1): 5-16.
- Herrero-Vanrell, R. and M. F. Refojo (2001). "Biodegradable microspheres for intraocular drug administration." Arch Soc Esp Oftalmol 76(4): 203-204.
- Herrero-Vanrell, R. (2007). "New trends in controlled drug delivery to posterior segment." Arch Soc Esp Oftalmol 82(1): 3-5.
- Herrero-Vanrell, R., L. Fernández-Sánchez, M. M. Puebla-González, P. Lax, I. Bravo-Osuna and N. Cuenca (2011). "Encapsulated Tudca Plga Microspheres For The Treatment Of Retinitis Pigmentosa." Invest Ophthalmol Vis Sci 52(14): 3251-3251.
- Herrero-Vanrell, R., M. Vicario de la Torre, V. Andrés-Guerrero, D. Barbosa-Alfaro, I. T. Molina-Martínez and I. Bravo-Osuna (2013). "Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview." J Drug Deliv Sci Technol 23(2): 75-102.

- Herrero-Vanrell, R., I. Bravo-Osuna, V. Andres-Guerrero, M. Vicario-de-la-Torre and I. T. Molina-Martinez (2014). "The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies." Prog Retin Eye Res 42: 27-43.
- Hirooka, K., M. Tokuda, O. Miyamoto, T. Itano, T. Baba and F. Shiraga (2004). "The Ginkgo biloba extract (EGb 761) provides a neuroprotective effect on retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma." Curr Eye Res 28(3): 153-157.
- Homma, K., Y. Koriyama, K. Mawatari, Y. Higuchi, J. Kosaka and S. Kato (2007). "Early downregulation of IGF-I decides the fate of rat retinal ganglion cells after optic nerve injury." Neurochem Int 50(5): 741-748.
- Horsburgh, G. M. and A. J. Sefton (1987). "Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat." J Comp Neurol 263(4): 553-566.
- Howell, G. R., I. Soto, R. T. Libby and S. W. John (2013). "Intrinsic axonal degeneration pathways are critical for glaucomatous damage." Exp Neurol 246: 54-61.
- Hsu, J. (2007). "Drug delivery methods for posterior segment disease." Curr Opin Ophthalmol 18(3): 235-239.
- Huang, X., N. Li, D. Wang, Y. Luo, Z. Wu, Z. Guo, Q. Jin, Z. Liu, Y. Huang, Y. Zhang and C. Wu (2015). "Quantitative three-dimensional analysis of poly (lactic-co-glycolic acid) microsphere using hard X-ray nano-tomography revealed correlation between structural parameters and drug burst release." J Pharm Biomed Anal 112: 43-49.
- Hughes, P. M., O. Olejnik, J. E. Chang-Lin and C. G. Wilson (2005). "Topical and systemic drug delivery to the posterior segments." Adv Drug Deliv Rev 57(14): 2010-2032.

- Hui, J. O., D. T. Chow, D. Markell, J. H. Robinson, V. Katta, L. Nixon, B. S. Chang, M. F. Rohde and M. Haniu (1998). "Identification of Asp95 as the site of succinimide formation in recombinant human glial cell line-derived neurotrophic factor." Arch Biochem Biophys 358(2): 377-384.
- Humphries, M. M., S. Kiang, N. McNally, M. A. Donovan, P. A. Sieving, R. A. Bush, S. Machida, T. Cotter, A. Hobson, J. Farrar, P. Humphries and P. Kenna (2001). "Comparative structural and functional analysis of photoreceptor neurons of Rho^{-/-} mice reveal increased survival on C57BL/6J in comparison to 129Sv genetic background." Vis Neurosci 18(3): 437-443.
- Hussain, R. M. and T. A. Ciulla (2016). "Treatment strategies for refractory diabetic macular edema: switching anti-VEGF treatments, adopting corticosteroid-based treatments, and combination therapy." Expert Opin Biol Ther 16(3): 365-374.
- Igarashi, Y., H. Chiba, H. Utsumi, H. Miyajima, T. Ishizaki, T. Gotoh, K. Kuwahara, H. Tobioka, M. Satoh, M. Mori and N. Sawada (2000). "Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats." Cell Struct Funct 25(4): 237-241.
- Ishikawa, M., D. Jin, Y. Sawada, S. Abe and T. Yoshitomi (2015). "Future therapies of wet age-related macular degeneration." J Ophthalmol 2015 (6): 138070.
- Ishikawa, M., T. Yoshitomi and Y. Izumi (2014). "Excitotoxicity and Glaucoma." receptor 7: 9.
- Iuvone, P. M., J. H. Boatright, G. Tosini and K. Ye (2014). "N-acetylserotonin: circadian activation of the BDNF receptor and neuroprotection in the retina and brain." Adv Exp Med Biol 801: 765-771.
- Jager, R. D., L. P. Aiello, S. C. Patel and E. T. Cunningham, Jr. (2004). "Risks of intravitreal injection: a comprehensive review." Retina 24(5): 676-698.

- Jain, S., P. Malyala, M. Pallaoro, M. Giuliani, H. Petersen, D. T. O'Hagan and M. Singh (2011). "A two-stage strategy for sterilization of poly(lactide-co-glycolide) particles by gamma-irradiation does not impair their potency for vaccine delivery." J Pharm Sci 100(2): 646-654.
- Jaissle, G. B., A. Ulmer, S. Henke-Fahle, G. Fierlbeck, K. U. Bartz-Schmidt and P. Szurman (2008). "Suppression of melanoma-associated neoangiogenesis by bevacizumab." Arch Dermatol 144(4): 525-527.
- Janoria, K. G., S. Gunda, S. H. Boddu and A. K. Mitra (2007). "Novel approaches to retinal drug delivery." Expert Opin Drug Deliv 4(4): 371-388.
- Ji, J. Z., W. Elyaman, H. K. Yip, V. W. Lee, L. W. Yick, J. Hugon and K. F. So (2004). "CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway." Eur J Neurosci 19(2): 265-272.
- Jiang, C., M. J. Moore, X. Zhang, H. Klassen, R. Langer and M. Young (2007). "Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma." Mol Vis 13: 1783-1792.
- Jiang, X., H. Lv, W. Qiu, Z. Liu, X. Li and W. Wang (2015). "Efficiency and safety of subconjunctival injection of anti-VEGF agent - bevacizumab - in treating dry eye." Drug Des Devel Ther 9: 3043-3050.
- Jimenez-Gomez, B., M. Gonzalez-Montpetit, A. Fonollosa Calduch, A. Orive Banuelos and S. Valsero Franco (2015). "Effects of ozurdex on intraocular pressure. A real life clinical practice study." Arch Soc Esp Ophthalmol 90(9): 421-425.
- Jing, S., D. Wen, Y. Yu, P. L. Holst, Y. Luo, M. Fang, R. Tamir, L. Antonio, Z. Hu, R. Cupples, J. C. Louis, S. Hu, B. W. Altmann and G. M. Fox (1996). "GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF." Cell 85(7): 1113-1124.

- Jiskoot, W., T. W. Randolph, D. B. Volkin, C. R. Middaugh, C. Schoneich, G. Winter, W. Friess, D. J. Crommelin and J. F. Carpenter (2012). "Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release." J Pharm Sci 101(3): 946-954.
- Johnson, E. C., Y. Guo, W. O. Cepurna and J. C. Morrison (2009). "Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models." Exp Eye Res 88(4): 808-815.
- Ju, W. K., K. Y. Kim, Y. H. Noh, M. Hoshijima, T. J. Lukas, M. H. Ellisman, R. N. Weinreb and G. A. Perkins (2015). "Increased mitochondrial fission and volume density by blocking glutamate excitotoxicity protect glaucomatous optic nerve head astrocytes." Glia 63(5): 736-753.
- Junyi, L., L. Na and J. Yan (2015). "Mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor and promote retinal ganglion cell survival after traumatic optic neuropathy." J Craniofac Surg 26(2): 548-552.
- Kaempf, S., P. Walter, A. K. Salz and G. Thumann (2008). "Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium." J Neurosci Methods 173(1): 47-58.
- Kang-Mieler, J. J., C. R. Osswald and W. F. Mieler (2014). "Advances in ocular drug delivery: emphasis on the posterior segment." Expert Opin Drug Deliv 11(10): 1647-1660.
- Kanski, J. J. (2012). Oftalmología clínica, Elsevier Brasil.
- Kapoor, K. G., M. G. Wagner and A. L. Wagner (2015). "The Sustained-Release Dexamethasone Implant: Expanding Indications in Vitreoretinal Disease." Semin Ophthalmol 30(5-6): 475-481.
- Karal-Yilmaz, O., M. Serhatli, K. Baysal and B. M. Baysal (2011). "Preparation and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres using a double emulsion/solvent evaporation technique." J. Microencapsul 28(1): 46-54.

- Kass, M. A., D. K. Heuer, E. J. Higginbotham, C. A. Johnson, J. L. Keltner, J. P. Miller, R. K. Parrish, 2nd, M. R. Wilson and M. O. Gordon (2002). "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 120(6): 701-713; discussion 829-730.
- Kassen, S. C., R. Thummel, L. A. Campochiaro, M. J. Harding, N. A. Bennett and D. R. Hyde (2009). "CNTF induces photoreceptor neuroprotection and Muller glial cell proliferation through two different signaling pathways in the adult zebrafish retina." Exp Eye Res 88(6): 1051-1064.
- Kaur, C, V. Sivakumar, R. Robinson, W. S. Foulds, C. D. Luu, E. A. Ling. (2013). "Neuroprotective effect of melatonin against hypoxia-induced retinal ganglion cell death in neonatal rats." J Pineal Res 54: 190-206
- Kempen, D. H., L. Lu, X. Zhu, C. Kim, E. Jabbari, W. J. Dhert, B. L. Currier and M. J. Yaszemski (2004). "Development of biodegradable poly(propylene fumarate)/poly(lactic-co-glycolic acid) blend microspheres. I. Preparation and characterization." J Biomed Mater Res A 70(2): 283-292.
- Kern, T. S. and B. A. Berkowitz (2015). "Photoreceptors in diabetic retinopathy." J Diabetes Investig 6(4): 371-380.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer 26(4): 239-257.
- Khalin, I., R. Alyautdin, G. Kocherga and M. A. Bakar (2015). "Targeted delivery of brain-derived neurotrophic factor for the treatment of blindness and deafness." Int J Nanomedicine 10: 3245-3267.
- Kim, H. K. and T. G. Park (2004). "Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release." J Control Release 98(1): 115-125.

- Kim, H. S., H. J. Cho, S. G. Yoo, J. H. Kim, J. I. Han, T. G. Lee and J. W. Kim (2015). "Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor monotherapy for large submacular hemorrhage secondary to neovascular age-related macular degeneration." Eye (Lond) 29(9): 1141–1151.
- Kimura, A., K. Namekata, X. Guo, C. Harada and T. Harada (2016). "Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration." Int J Mol Sci 17(9).
- Kipnis, J., E. Yoles, Z. Porat, A. Cohen, F. Mor, M. Sela, I. R. Cohen and M. Schwartz (2000). "T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies." Proc Natl Acad Sci U S A 97(13): 7446-7451.
- Klein, R., K. J. Cruickshanks, S. D. Nash, E. M. Krantz, F. J. Nieto, G. H. Huang, J. S. Pankow and B. E. Klein (2010). "The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors." Arch Ophthalmol 128(6): 750-758.
- Klemm, M. and C. Gesser (2014). "The relevance of diabetes for patients with glaucoma." Klin Monbl Augenheilkd 231(2): 116-120.
- Klocker, N., F. Braunling, S. Isenmann and M. Bahr (1997). "In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells." Neuroreport 8(16): 3439-3442.
- Ko, M. L., D. N. Hu, R. Ritch and S. C. Sharma (2000). "The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(10): 2967-2971.
- Kodjikian, L., E. Decullier, E. H. Souied, J. F. Girmens, E. E. Durand, F. R. Chapuis and L. Huot (2014). "Bevacizumab and ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: an updated meta-analysis of randomised clinical trials." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 252(10): 1529-1537.

- Koeberle, P. D. and A. K. Ball (1998). "Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy." Vision Res 38(10): 1505-1515.
- Koennings, S., A. Sapin, T. Blunk, P. Menei and A. Goepferich (2007). "Towards controlled release of BDNF--manufacturing strategies for protein-loaded lipid implants and biocompatibility evaluation in the brain." J Control Release 119(2): 163-172.
- Koizumi, A., G. Zeck, Y. Ben, R. H. Masland and T. C. Jakobs (2007). "Organotypic culture of physiologically functional adult mammalian retinas." PLoS One 2(2): e221.
- Kola, I. and J. Landis (2004). "Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?" Nat Rev Drug Discov 3(8): 711-715.
- Kolomeyer, A. M. and M. A. Zarbin (2014). "Trophic factors in the pathogenesis and therapy for retinal degenerative diseases." Surv Ophthalmol 59(2): 134-165.
- Komeima, K., B. S. Rogers, L. Lu and P. A. Campochiaro (2006). "Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa." Proc Natl Acad Sci U S A 103(30): 11300-11305.
- Kompella, U. B., N. Bandi and S. P. Ayalasomayajula (2003). "Subconjunctival nano- and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(3): 1192-1201.
- Kompella, U. B., R. S. Kadam and V. H. Lee (2010). "Recent advances in ophthalmic drug delivery." Ther Deliv 1(3): 435-456.
- Kompella, U. B., A. C. Amrite, R. Pacha-Ravi and S. A. Durazo (2013). "Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging." Prog Retin Eye Res 36: 172-198.

- Koriyama, Y., Y. Nakayama, S. Matsugo and S. Kato (2013). "Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cellline." Brain Res 1499: 145-157.
- Koriyama, Y., K. Sugitani, K. Ogai and S. Kato (2014). "Heat shock protein 70 induction by valproic acid delays photoreceptor cell death by N-methyl-N-nitrosourea in mice." J Neurochem 130(5): 707-719.
- Koseki, N., M. Araie, A. Tomidokoro, M. Nagahara, T. Hasegawa, Y. Tamaki and S. Yamamoto (2008). "A placebo-controlled 3-year study of a calcium blocker on visual field and ocular circulation in glaucoma with low-normal pressure." Ophthalmology 115(11): 2049-2057.
- Kowluru, R. A. and M. Mishra (2015). "Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy." Biochim Biophys Acta 1852(11):2474-83.
- Kretz, A., J. K. Marticke, C. J. Happold, C. Schmeer and S. Isenmann (2007). "A primary culture technique of adult retina for regeneration studies on adult CNS neurons." Nat Protoc 2(1): 131-140.
- Kucharska, J., P. Del Rio, B. Arango-Gonzalez, M. Gorza, A. Feuchtinger, S. M. Hauck and M. Ueffing (2014). "Cyr61 activates retinal cells and prolongs photoreceptor survival in rd1 mouse model of retinitis pigmentosa." J Neurochem 130(2): 227-240.
- Kunchithapautham, K. and B. Rohrer (2007). "Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress." Autophagy 3(5): 433-441.
- Kuno, N. and S. Fujii (2010). "Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date." Drugs Aging 27(2): 117-134.
- Kuo, H. K., Y. H. Chen, P. C. Wu and Y. H. Kuo (2015). "The Effects of Ozurdex(R) (Dexamethasone Intravitreal Implant) on Experimental Proliferative Vitreoretinopathy." Ophthalmologica 233(3-4): 198-203.

- Kurihara, T., Y. Ozawa, S. Ishida, H. Okano and K. Tsubota (2012). "Renin-Angiotensin system hyperactivation can induce inflammation and retinal neural dysfunction." Int J Inflamm 2012: 581695.
- Kwong, J. M., A. Quan, H. Kyung, N. Piri and J. Caprioli (2011). "Quantitative analysis of retinal ganglion cell survival with Rbpms immunolabeling in animal models of optic neuropathies." Invest Ophthalmol Vis Sci 52(13): 9694-9702.
- Kyhn, M. V., H. Klassen, U. E. Johansson, K. Warfvinge, E. Lavik, J. F. Kiilgaard, J. U. Prause, E. Scherfig, M. Young and M. la Cour (2009). "Delayed administration of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) protects retinal ganglion cells in a pig model of acute retinal ischemia." Exp Eye Res 89(6): 1012-1020.
- Laengle, U. W., R. Markstein, D. Pralet, W. Seewald and D. Roman (2006). "Effect of GLC756, a novel mixed dopamine D1 receptor antagonist and dopamine D2 receptor agonist, on TNF-alpha release in vitro from activated rat mast cells." Exp Eye Res 83(6): 1335-1339.
- Lai, K. and G. Landa (2015). "Current choice of treatments for neovascular AMD." Expert Rev Clin Pharmacol 8(1): 135-140.
- Lambert, B. J., T. A. Mendelson and M. D. Craven (2011). "Radiation and ethylene oxide terminal sterilization experiences with drug eluting stent products." AAPS PharmSciTech 12(4): 1116-1126.
- Lambert, W. S., A. F. Clark and R. J. Wordinger (2004). "Effect of exogenous neurotrophins on Trk receptor phosphorylation, cell proliferation, and neurotrophin secretion by cells isolated from the human lamina cribrosa." Mol Vis 10: 289-296.
- Larrosa, J. M., A. A. Veloso, Jr., F. L. Leong and M. F. Refojo (1997). "Antiproliferative effect of intravitreal alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl-acid-succinate in a rabbit model of PVR." Curr Eye Res 16(10): 1030-1035.

- Leach, W. T., D. T. Simpson, T. N. Val, E. C. Anuta, Z. Yu, R. O. Williams, 3rd and K. P. Johnston (2005). "Uniform encapsulation of stable protein nanoparticles produced by spray freezing for the reduction of burst release." J Pharm Sci 94(1): 56-69.
- Lee, D., K. Y. Kim, M. S. Shim, S. Y. Kim, M. H. Ellisman, R. N. Weinreb and W. K. Ju (2014). "Coenzyme Q10 ameliorates oxidative stress and prevents mitochondrial alteration in ischemic retinal injury." Apoptosis 19(4): 603-614.
- Lee, D., M. S. Shim, K. Y. Kim, Y. H. Noh, H. Kim, S. Y. Kim, R. N. Weinreb and W. K. Ju (2014). "Coenzyme Q10 inhibits glutamate excitotoxicity and oxidative stress-mediated mitochondrial alteration in a mouse model of glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 55(2): 993-1005.
- Lee, S. C., J. T. Oh, M. H. Jang and S. I. Chung (1999). "Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration." J Control Release 59(2): 123-132.
- Lee, S. S., P. Hughes, A. D. Ross and M. R. Robinson (2010). "Biodegradable implants for sustained drug release in the eye." Pharm Res 27(10): 2043-2053.
- Leonard, K. C., D. Petrin, S. G. Coupland, A. N. Baker, B. C. Leonard, E. C. LaCasse, W. W. Hauswirth, R. G. Korneluk and C. Tsilfidis (2007). "XIAP protection of photoreceptors in animal models of retinitis pigmentosa." PLoS One 2(3): e314.
- Levi-Montalcini, R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." Science 237(4819): 1154-1162.
- Lewis, G. P., K. A. Linberg, S. F. Geller, C. J. Guerin and S. K. Fisher (1999). "Effects of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor in an experimental model of retinal detachment." Invest Ophthalmol Vis Sci 40(7): 1530-1544.

- Li, S. Y., Z. J. Fu and A. C. Lo (2012). "Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy." *Oxid Med Cell Longev* 2012: 426769.
- Li, Z., P. Wang, Z. Yu, Y. Cong, H. Sun, J. Zhang, J. Zhang, C. Sun, Y. Zhang and X. Ju (2015). "The effect of creatine and coenzyme q10 combination therapy on mild cognitive impairment in Parkinson's disease." *Eur Neurol* 73(3-4): 205-211.
- Liang, F. Q., T. S. Aleman, ZaixinYang, A. V. Cideciyan, S. G. Jacobson and J. Bennett (2001). "Melatonin delays photoreceptor degeneration in the rds/rds mouse." *Neuroreport* 12(5): 1011-1014.
- Liang, F. Q., L. Green, C. Wang, R. Alssadi and B. F. Godley (2004). "Melatonin protects human retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress." *Exp Eye Res* 78(6): 1069-1075.
- Liebler, D. C., D. S. Kling and D. J. Reed (1986). "Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione." *J Biol Chem* 261(26): 12114-12119.
- Lien, E. L. and B. R. Hammond (2011). "Nutritional influences on visual development and function." *Prog Retin Eye Res* 30(3): 188-203.
- Lin, H. H., S. M. Ko, L. R. Hsu and Y. H. Tsai (1996). "The preparation of norfloxacin-loaded liposomes and their in-vitro evaluation in pig's eye." *J Pharm Pharmacol* 48(8): 801-805.
- Lin, L. F., D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh and F. Collins (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." *Science* 260(5111): 1130-1132.
- Lin, L. F., T. J. Zhang, F. Collins and L. G. Armes (1994). "Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic factor." *J Neurochem* 63(2): 758-768.

- Lin, L., Y. J. Zhao, P. T. Chew, C. C. Sng, H. T. Wong, L. W. Yip, T. S. Wu, D. Bautista, M. Teng, A. L. Khoo and B. P. Lim (2014). "Comparative efficacy and tolerability of topical prostaglandin analogues for primary open-angle glaucoma and ocular hypertension." Ann Pharmacother 48(12): 1585-1593.
- Lindahl, M., M. Saarna and P. Lindholm (2017). "Unconventional neurotrophic factors CDNF and MANF: Structure, physiological functions and therapeutic potential." Neurobiol Dis 97(Pt B): 90-102.
- Lipinski, D. M., M. S. Singh and R. E. MacLaren (2011). "Assessment of cone survival in response to CNTF, GDNF, and VEGF165b in a novel ex vivo model of end-stage retinitis pigmentosa." Invest Ophthalmol Vis Sci 52(10): 7340-7346.
- Lipinski, D. M., A. R. Barnard, M. S. Singh, C. Martin, E. J. Lee, W. I. Davies and R. E. MacLaren (2015). "CNTF Gene Therapy Confers Lifelong Neuroprotection in a Mouse Model of Human Retinitis Pigmentosa." Mol Ther 23(8): 1308-1319.
- Lipton, S. A. (2004). "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 1(1): 101-110.
- Lo, A. C., T. T. Woo, R. L. Wong and D. Wong (2011). "Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue." Ophthalmologica 226 Suppl 1: 10-17.
- Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1965). "Programmed cell death-i. cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm." J Insect Physiol 11: 123-133.
- Los, L. I. (2008). "The rabbit as an animal model for post-natal vitreous matrix differentiation and degeneration." Eye (Lond) 22(10): 1223-1232.

- Lucas, D. R. and J. P. Newhouse (1957). "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina." AMA Arch Ophthalmol 58(2): 193-201.
- Lucini, C., L. Maruccio, M. Patruno, T. Martinello, F. Mascarello and L. Castaldo (2007). "Glial cell line-derived neurotrophic factor expression in the retina of adult zebrafish (*Danio rerio*)." Neurosci Lett 429(2-3): 156-160.
- Luo J, P. Baranov, S. Patel, H. Ouyang, J. Quach, F. Wu, A. Qiu, H. Luo, C. Hicks, J. Zeng, J. Zhu, J. Lu, N. Sfeir, C. Wen, M. Zhang, V. Reade, S. Patel, J. Sinden, X. Sun, P. Shaw, M. Young, K. Zhang (2014). "Human retinal progenitor cell transplantation preserves vision." J Biol Chem 289: 6362-6371.
- Lyseng-Williamson, K. A. (2016). "Idebenone: A Review in Leber's Hereditary Optic Neuropathy." Drugs 76(7): 805-813.
- Ma, G. (2014). "Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: strategy, preparation, and applications." J Control Release 193: 324-340.
- Ma, J., M. Kabiell, B. A. Tucker, J. Ge and M. J. Young (2011). "Combining chondroitinase ABC and growth factors promotes the integration of murine retinal progenitor cells transplanted into Rho(-/-) mice." Mol Vis 17: 1759-1770.
- Maestroni, G. J. (1999). "Therapeutic potential of melatonin in immunodeficiency states, viral diseases, and cancer." Adv Exp Med Biol 467: 217-226.
- Makadia, H. K. and S. J. Siegel (2011). "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier." Polymers (Basel) 3(3): 1377-1397.
- Malhotra, A., F. J. Minja, A. Crum and D. Burrowes (2011). "Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye." Semin Ultrasound CT MR 32(1): 2-13.
- Manabe, S., S. Kashii, Y. Honda, R. Yamamoto, H. Katsuki and A. Akaike (2002). "Quantification of axotomized ganglion cell death by explant culture of the rat retina." Neurosci Lett 334(1): 33-36.

- Mao, S., J. Xu, C. Cai, O. Germershaus, A. Schaper and T. Kissel (2007). "Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres." Int J Pharm 334(1-2): 137-148.
- Marchiafava, P. L. and B. Longoni (1999). "Melatonin as an antioxidant in retinal photoreceptors." J Pineal Res 26(3): 184-189.
- Marshall, K. A., R. J. Reiter, B. Poeggeler, O. I. Aruoma and B. Halliwell (1996). "Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro." Free Radic Biol Med 21(3): 307-315.
- Martín-Sabroso, C., A. I. Fraguas-Sánchez, J. Aparicio-Blanco, M. F. Cano-Abad and A. I. Torres-Suárez (2015). "Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles." Int J Pharm 480(1-2): 27-36.
- Martinez-Sancho, C., R. Herrero-Vanrell and S. Negro (2003). "Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of aciclovir: influence of fatty and non-fatty additives." J Microencapsul 20(6): 799-810.
- Martinez-Sancho, C., R. Herrero-Vanrell and S. Negro (2004). "Optimisation of aciclovir poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study." Int J Pharm 273(1-2): 45-56.
- Maruyama, K., T. Yuda, A. Okamoto, S. Kojima, A. Suginaka and M. Iwatsuru (1992). "Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol)." Biochim Biophys Acta 1128(1): 44-49.
- Mateovic, T., B. Kriznar, M. Bogataj and A. Mrhar (2002). "The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres." J Microencapsul 19(1): 29-36.

- McCarthy, C. A., R. E. Widdop, D. Deliyanti and J. L. Wilkinson-Berka (2013). "Brain and retinal microglia in health and disease: an unrecognized target of the renin-angiotensin system." Clin Exp Pharmacol Physiol 40(8): 571-579.
- McKernan, D. P., C. Caplis, M. Donovan, J. O'Brien C and T. G. Cotter (2006). "Age-dependent susceptibility of the retinal ganglion cell layer to cell death." Invest Ophthalmol Vis Sci 47(3): 807-814.
- McManus, M. J., M. P. Murphy and J. L. Franklin (2014). "Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate caspase-dependent and - independent neuronal deaths." Mol Cell Neurosci 63(0): 13-23.
- Mello-Filho, P. A., D. Guven, N. R. Beeley, E. de Juan, Jr. and S. R. Erickson (2009). "Helical intravitreal triamcinolone acetonide implant: a 6-month surgical feasibility study in rabbits." Ophthalmic Surg Lasers Imaging 40(2): 160-168.
- Meng, F. T., G. H. Ma, W. Qiu and Z. G. Su (2003). "W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles." J Control Release 91(3): 407-416.
- Mey, J. and S. Thanos (1993). "Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo." Brain Res 602(2): 304-317.
- Meyerson, C., G. Van Stavern and C. McClelland (2015). "Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives." Clin Ophthalmol 9: 1165-1176.
- Mi, X. S., T. F. Yuan and K. F. So (2014). "The current research status of normal tension glaucoma." Clin Interv Aging 9: 1563-1571.
- Miller, J. W. (2013). "Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture." Am J Ophthalmol 155(1): 1-35 e13.

- Mishra, G. P., M. Bagui, V. Tamboli and A. K. Mitra (2011). "Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery." J Drug Deliv 2011: 863734.
- Mitra, A. K., B. S. Anand and S. Duvvuri (2005). Drug Delivery to the Eye. En: *Advances in Organ Biology*. J. Fischbarg, Elsevier.
- Miyamoto, H., Y. Ogura, M. Hashizoe, N. Kunou, Y. Honda and Y. Ikada (1997). "Biodegradable scleral implant for intravitreal controlled release of fluconazole." Curr Eye Res 16(9): 930-935.
- Mohanan, D., B. Gander, T. M. Kundig and P. Johansen (2012). "Encapsulation of antigen in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres protects from harmful effects of gamma-irradiation as assessed in mice." Eur J Pharm Biopharm 80(2): 274-281.
- Montanari, L., M. Costantini, E. C. Signoretti, L. Valvo, M. Santucci, M. Bartolomei, P. Fattibene, S. Onori, A. Faucitano, B. Conti and I. Genta (1998). "Gamma irradiation effects on poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres." J Control Release 56(1-3): 219-229.
- Moore, D. B., O. Tomkins and I. Ben-Zion (2013). "A review of primary congenital glaucoma in the developing world." Surv Ophthalmol 58(3): 278-285.
- Morita, T., Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki and H. Yoshino (2000). "Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant." J Control Release 69(3): 435-444.
- Moritera, T., Y. Ogura, N. Yoshimura, Y. Honda, R. Wada, S. H. Hyon and Y. Ikada (1992). "Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci 33(11): 3125-3130.
- Morrison, P. W. and V. V. Khutoryanskiy (2014). "Advances in ophthalmic drug delivery." Ther Deliv 5(12): 1297-1315.

- Mozaffarieh, M., M. C. Grieshaber, S. Orgul and J. Flammer (2008). "The potential value of natural antioxidative treatment in glaucoma." Surv Ophthalmol 53(5): 479-505.
- Mundargi, R. C., V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel and T. M. Aminabhavi (2008). "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives." J Control Release 125(3): 193-209.
- Murakami, Y., S. Notomi, T. Hisatomi, T. Nakazawa, T. Ishibashi, J. W. Miller and D. G. Vavvas (2013). "Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations." Prog Retin Eye Res 37: 114-140.
- Nadal-Nicolas, F.M., E. Rodriguez-Villagra, I. Bravo-Osuna, P. Sobrado-Calvo, I.T. Molina-Martinez, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso, R. Herrero-Vanrell (2016). "Ketorolac Administration Attenuates Retinal Ganglion Cell Death After Axonal Injury." Invest Ophthalmol Vis Sci 57: 1183-1192.
- Nafissi, N. and M. Foldvari (2016). "Neuroprotective therapies in glaucoma: I. Neurotrophic factor delivery." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 8(2):240-254.
- Nagai, N., H. Kaji, H. Onami, Y. Ishikawa, M. Nishizawa, N. Osumi, T. Nakazawa and T. Abe (2014). "A polymeric device for controlled transscleral multi-drug delivery to the posterior segment of the eye." Acta Biomater 10(2): 680-687.
- Nagai, N., H. Kaji, H. Onami, Y. Katsukura, Y. Ishikawa, Z. K. Nezhad, K. Sampei, S. Iwata, S. Ito, M. Nishizawa, T. Nakazawa, N. Osumi, Y. Mashima and T. Abe (2014). "A platform for controlled dual-drug delivery to the retina: protective effects against light-induced retinal damage in rats." Adv Healthc Mater 3(10): 1555-1560, 1524.
- Niki, E., N. Noguchi, H. Tsuchihashi and N. Gotoh (1995). "Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene." Am J Clin Nutr 62(6 Suppl): 1322s-1326s.

- Nishikiori, N., M. Osanai, H. Chiba, T. Kojima, Y. Mitamura, H. Ohguro and N. Sawada (2007). "Glial cell-derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy." Diabetes 56(5): 1333-1340.
- Niyadurupola, N., P. Sidaway, A. Osborne, D. C. Broadway and J. Sanderson (2011). "The development of human organotypic retinal cultures (HORCs) to study retinal neurodegeneration." Br J Ophthalmol 95(5): 720-726.
- Noell, W. K. (1980). "Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes." Vision Res 20(12): 1163-1171.
- Nowak, J. Z. (2014). "AMD--the retinal disease with an unprecised etiopathogenesis: in search of effective therapeutics." Acta Pol Pharm 71(6): 900-916.
- Nucci, C., N. G. Strouthidis and P. T. Khaw (2013). "Neuroprotection and other novel therapies for glaucoma." Curr Opin Pharmacol 13(1): 1-4.
- Nunez, G., M. A. Benedict, Y. Hu and N. Inohara (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." Oncogene 17(25): 3237-3245.
- Nuschke, A. C., S. R. Farrell, J. M. Levesque and B. C. Chauhan (2015). "Assessment of retinal ganglion cell damage in glaucomatous optic neuropathy: Axon transport, injury and soma loss." Exp Eye Res 141:111-124.
- O'Leary, P. D. and R. A. Hughes (2003). "Design of potent peptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor." J Biol Chem 278(28): 25738-25744.
- Ohnaka, M., K. Miki, Y. Y. Gong, R. Stevens, T. Iwase, S. F. Hackett and P. A. Campochiaro (2012). "Long-term expression of glial cell line-derived neurotrophic factor slows, but does not stop retinal degeneration in a model of retinitis pigmentosa." J Neurochem 122(5): 1047-1053.

- Omodaka, K., K. M. Nishiguchi, M. Yasuda, Y. Tanaka, K. Sato, O. Nakamura, K. Maruyama and T. Nakazawa (2014). "Neuroprotective effect against axonal damage-induced retinal ganglion cell death in apolipoprotein E-deficient mice through the suppression of kainate receptor signaling." Brain Res 1586: 203-212.
- Ortin-Martinez, A., F. J. Valiente-Soriano, D. Garcia-Ayuso, L. Alarcon-Martinez, M. Jimenez-Lopez, J. M. Bernal-Garro, L. Nieto-Lopez, F. M. Nadal-Nicolas, M. P. Villegas-Perez, L. A. Wheeler and M. Vidal-Sanz (2014). "A novel in vivo model of focal light emitting diode-induced cone-photoreceptor phototoxicity: neuroprotection afforded by brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF." PLoS One 9(12): e113798.
- Osborne, N. N., G. Chidlow, M. S. Nash and J. P. Wood (1999). "The potential of neuroprotection in glaucoma treatment." Curr Opin Ophthalmol 10(2): 82-92.
- Osborne, N. N., M. Ugarte, M. Chao, G. Chidlow, J. H. Bae, J. P. Wood and M. S. Nash (1999). "Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma." Surv Ophthalmol 43 Suppl 1: S102-128.
- Osborne, N. N., R. J. Casson, J. P. Wood, G. Chidlow, M. Graham and J. Melena (2004). "Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies." Prog Retin Eye Res 23(1): 91-147.
- Osborne, N. N. (2009). "Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned." Acta Ophthalmol 87(4): 450-454.
- Paik, D. H. and S. W. Choi (2014). "Entrapment of protein using electrosprayed poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres with a porous structure for sustained release." Macromol Rapid Commun 35(11): 1033-1038.
- Panda, S. and J. B. Jonas (1992). "Decreased photoreceptor count in human eyes with secondary angle-closure glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 33(8): 2532-2536.

- Parisi, V., M. Centofanti, S. Gandolfi, D. Marangoni, L. Rossetti, L. Tanga, M. Tardini, S. Traina, N. Ungaro, M. Vetrugno and B. Falsini (2014). "Effects of coenzyme Q10 in conjunction with vitamin E on retinal-evoked and cortical-evoked responses in patients with open-angle glaucoma." J Glaucoma 23(6): 391-404.
- Park, S. W., H. S. Lee, M. S. Sung and S. J. Kim (2012). "The effect of melatonin on retinal ganglion cell survival in ischemic retina." Chonnam Med J 48(2): 116-122.
- Park, T. G. (1995). "Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition." Biomaterials 16(15): 1123-1130.
- Parkash, V., V. M. Leppanen, H. Virtanen, J. M. Jurvansuu, M. M. Bessalov, Y. A. Sidorova, P. Runeberg-Roos, M. Saarna and A. Goldman (2008). "The structure of the glial cell line-derived neurotrophic factor-coreceptor complex: insights into RET signaling and heparin binding." J Biol Chem 283(50): 35164-35172.
- Pasantés-Morales, H., H. Quiroz and O. Quesada (2002). "Treatment with taurine, diltiazem, and vitamin E retards the progressive visual field reduction in retinitis pigmentosa: a 3-year follow-up study." Metab Brain Dis 17(3): 183-197.
- Patel, A., K. Cholkar, V. Agrahari and A. K. Mitra (2013). "Ocular drug delivery systems: An overview." World J Pharmacol 2(2): 47-64.
- Patel, K. and S. Patel (2014). "Angle-closure glaucoma." Dis Mon 60(6): 254-262.
- Patel, S. P., R. Vaishya, D. Pal and A. K. Mitra (2015). "Novel pentablock copolymer-based nanoparticulate systems for sustained protein delivery." AAPS PharmSciTech 16(2): 327-343.
- Payne, A. J., S. Kaja, N. R. Sabates and P. Koulen (2013). "A case for neuroprotection in ophthalmology: developments in translational research." Mo Med 110(5): 429-436.

- Péan, J. M., M. C. Venier-Julienne, R. Filmon, M. Sergent, R. Phan-Tan-Luu and J. P. Benoit (1998). "Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles." Int J Pharm 166(1): 105-115.
- Pearce, W., J. Hsu and S. Yeh (2015). "Advances in drug delivery to the posterior segment." Curr Opin Ophthalmol 26(3): 233-239.
- Pearson, R. A., A. C. Barber, M. Rizzi, C. Hippert, T. Xue, E. L. West, Y. Duran, A. J. Smith, J. Z. Chuang, S. A. Azam, U. F. Luhmann, A. Benucci, C. H. Sung, J. W. Bainbridge, M. Carandini, K. W. Yau, J. C. Sowden and R. R. Ali (2012). "Restoration of vision after transplantation of photoreceptors." Nature 485(7396): 99-103.
- Pease, M. E., S. J. McKinnon, H. A. Quigley, L. A. Kerrigan-Baumrind and D. J. Zack (2000). "Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(3): 764-774.
- Peinado-Ramon, P., M. Salvador, M. P. Villegas-Perez and M. Vidal-Sanz (1996). "Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study." Invest Ophthalmol Vis Sci 37(4): 489-500.
- Perez, M. T. and E. Caminos (1995). "Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina." Neurosci Lett 183(1-2): 96-99.
- Pescosolido, N., V. Gatto, A. Stefanucci and D. Rusciano (2015). "Oral treatment with the melatonin agonist agomelatine lowers the intraocular pressure of glaucoma patients." Ophthalmic Physiol Opt 35(2): 201-205.
- Pierce, E. A. (2001). "Pathways to photoreceptor cell death in inherited retinal degenerations." Bioessays 23(7): 605-618.
- Pintor, J., L. Martin, T. Pelaez, C. H. Hoyle and A. Peral (2001). "Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits." Eur J Pharmacol 416(3): 251-254.

- Pisal, D. S., M. P. Kosloski and S. V. Balu-Iyer (2010). "Delivery of therapeutic proteins." J Pharm Sci 99(6): 2557-2575.
- Platt, N., R. P. da Silva and S. Gordon (1998). "Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells." Trends Cell Biol 8(9): 365-372.
- Politi, L. E., N. P. Rotstein and N. G. Carri (2001). "Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid." Invest Ophthalmol Vis Sci 42(12): 3008-3015.
- Portera-Cailliau, C., C. H. Sung, J. Nathans and R. Adler (1994). "Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa." Proc Natl Acad Sci U S A 91(3): 974-978.
- Prea, S. M., E. C. Chan, G. J. Dusting, A. J. Vingrys, B. V. Bui and G. S. Liu (2015). "Gene Therapy with Endogenous Inhibitors of Angiogenesis for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Beyond Anti-VEGF Therapy." J Ophthalmol 2015: 201726.
- Putz, R., J. Sobotta and R. Pabst (2008). Sobotta atlas of human anatomy: head, neck, upper limb, thorax, abdomen, pelvis, lower limb, Elsevier.
- Qu, J., D. Wang and C. L. Grosskreutz (2010). "Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma." Exp Eye Res 91(1): 48-53.
- Quaranta, L., I. Riva, A. Katsanos, I. Floriani, M. Centofanti and A. G. Konstas (2015). "Safety and efficacy of travoprost solution for the treatment of elevated intraocular pressure." Clin Ophthalmol 9: 633-643.
- Querques, G., P. J. Rosenfeld, E. Cavallero, E. Borrelli, F. Corvi, L. Querques, F. M. Bandello and M. A. Zarbin (2014). "Treatment of dry age-related macular degeneration." Ophthalmic Res 52(3): 107-115.
- Quigley, H. A., E. M. Addicks, W. R. Green and A. E. Maumenee (1981). "Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage." Arch Ophthalmol 99(4): 635-649.

- Quigley, H. A., S. J. McKinnon, D. J. Zack, M. E. Pease, L. A. Kerrigan-Baumrind, D. F. Kerrigan and R. S. Mitchell (2000). "Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci 41(11): 3460-3466.
- Raghava, S., M. Hammond and U. B. Kompella (2004). "Periocular routes for retinal drug delivery." Expert Opin Drug Deliv 1(1): 99-114.
- Ramli, N., B. S. Nurull, N. N. Hairi and Z. Mimiwati (2013). "Low nocturnal ocular perfusion pressure as a risk factor for normal tension glaucoma." Prev Med 57 Suppl: S47-49.
- Ranchon I, J. M. Gorrard, J. Cluzel, M. T. Droy-Lefaix and M. Doly (1999). "Functional protection of photoreceptors from light-induced damage by dimethylthiourea and Ginkgo biloba extract." Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 1191-1199
- Ranta, V. P., E. Mannermaa, K. Lummeppuro, A. Subrizi, A. Laukkanen, M. Antopolsky, L. Murtomaki, M. Hornof and A. Urtti (2010). "Barrier analysis of periocular drug delivery to the posterior segment." J Control Release 148(1): 42-48.
- Ranta, V. P. and A. Urtti (2006). "Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling." Adv Drug Deliv Rev 58(11): 1164-1181.
- Ratnayaka, J. A., L. C. Serpell and A. J. Lotery (2015). "Dementia of the eye: the role of amyloid beta in retinal degeneration." Eye (Lond) 29(8): 1013-1026.
- Rawat, S., N. Kohli, C. R. Suri and D. K. Sahoo (2012). "Molecular mechanism of improved structural integrity of protein in polymer based microsphere delivery system." Mol Pharm 9(9): 2403-2414.

- Rechtman, E., I. Stalmans, J. Glovinsky, C. Breusegem, J. Moisseiev, J. Van Calster and A. Harris (2011). "The effect of intravitreal bevacizumab (Avastin) on ocular pulse amplitude in neovascular age-related macular degeneration." Clin Ophthalmol 5: 37-44.
- Real Farmacopea Española. (2015). 5ª Ed. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).
- Reichenbach, A. and A. Bringmann (2013). "New functions of Muller cells." Glia 61(5): 651-678.
- Reinhold, S. E. and S. P. Schwendeman (2013). "Effect of polymer porosity on aqueous self-healing encapsulation of proteins in PLGA microspheres." Macromol Biosci 13(12): 1700-1710.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, J. C. Mayo, R. M. Sainz, J. Leon and Z. Czarnocki (2003). "Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans." Acta Biochim Pol 50(4): 1129-1146.
- Rincon Alarcon, A. and I. T. Molina Martinez (2006). "Intraocular drug delivery systems." Arch Soc Esp Oftalmol 81(2): 57-59.
- Ritch, R. (2005). "Complementary therapy for the treatment of glaucoma: a perspective." Ophthalmol Clin North Am 18(4): 597-609.
- Rocco, M. L., B. O. Balzamino, P. Petrocchi Passeri, A. Micera and L. Aloe (2015). "Effect of purified murine NGF on isolated photoreceptors of a rodent developing retinitis pigmentosa." PLoS One 10(4): e0124810.
- Rojas, B., R. de Hoz, A. Ramírez, J. J. Salazar, B. Gallego, A. Triviño, V. Andrés-Guerrero, R. Herrero-Vanrell, G. Mihov, A. Dias, M. Zong, J. M. Ramírez (2013). Handling of PEA Microparticles for in vivo intraocular injections. XXV Symposium of the European Society for Biomaterials. Spain, Madrid.

- Rong, X., W. Yuan, Y. Lu and X. Mo (2014). "Safety evaluation of poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(lactic-acid) microspheres through intravitreal injection in rabbits." Int J Nanomedicine 9: 3057-3068.
- Rosenfeld, P. J., G. S. Cowley, T. L. McGee, M. A. Sandberg, E. L. Berson and T. P. Dryja (1992). "A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa." Nat Genet 1(3): 209-213.
- Rovere, G., F. M. Nadal-Nicolas, P. Sobrado-Calvo, D. Garcia-Bernal, M. P. Villegas-Perez, M. Vidal-Sanz and M. Agudo-Barriuso (2016). "Topical Treatment With Bromfenac Reduces Retinal Gliosis and Inflammation After Optic Nerve Crush." Invest Ophthalmol Vis Sci 57(14): 6098-6106.
- Ruiz-Moreno, J. M., J. A. Montero, A. Bayon, J. Rueda and M. Vidal (2007). "Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide at high doses in the rabbit." Exp Eye Res 84(2): 342-348.
- Russelakis-Carneiro, M., L. C. Silveira and V. H. Perry (1996). "Factors affecting the survival of cat retinal ganglion cells after optic nerve injury." J Neurocytol 25(6): 393-402.
- Russo, R., F. Cavaliere, L. Rombola, M. Gliozzi, A. Cerulli, C. Nucci, E. Fazzi, G. Bagetta, M. T. Corasaniti and L. A. Morrone (2008). "Rational basis for the development of coenzyme Q10 as a neurotherapeutic agent for retinal protection." Prog Brain Res 173: 575-582.
- Saishin, Y., R. L. Silva, Y. Saishin, K. Callahan, C. Schoch, M. Ahlheim, H. Lai, F. Kane, R. K. Brazzell, D. Bodmer and P. A. Campochiaro (2003). "Periocular injection of microspheres containing PKC412 inhibits choroidal neovascularization in a porcine model." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(11): 4989-4993.
- Salt, T. E., S. Nizari, M. F. Cordeiro, H. Russ and W. Danysz (2014). "Effect of the Abeta aggregation modulator MRZ-99030 on retinal damage in an animal model of glaucoma." Neurotox Res 26(4): 440-446.

- Samples, J. R., G. Krause and A. J. Lewy (1988). "Effect of melatonin on intraocular pressure." Curr Eye Res 7(7): 649-653.
- Sanchez, A., A. C. Calpena and B. Clares (2015). "Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin." Int J Mol Sci 16(8): 16981-17004.
- Sanford, M. (2014). "Preservative-free latanoprost eye drops in patients with primary open-angle glaucoma/ocular hypertension." Clin Drug Investig 34(7): 521-528.
- Scalinci, S. Z., L. Scorolli, G. Corradetti, D. Domanico, E. M. Vingolo, A. Meduri, M. Bifani and D. Siravo (2011). "Potential role of intravitreal human placental stem cell implants in inhibiting progression of diabetic retinopathy in type 2 diabetes: neuroprotective growth factors in the vitreous." Clin Ophthalmol 5: 691-696.
- Schimmel, A. M., L. Abraham, D. Cox, A. Sene, C. Kraus, D. S. Dace, N. Ercal and R. S. Apte (2011). "N-acetylcysteine amide (NACA) prevents retinal degeneration by up-regulating reduced glutathione production and reversing lipid peroxidation." Am J Pathol 178(5): 2032-2043.
- Schmidl, D., L. Schmetterer, G. Garhofer and A. Popa-Cherecheanu (2015). "Pharmacotherapy of glaucoma." J Ocul Pharmacol Ther 31(2): 63-77.
- Scholz, R., M. Sobotka, A. Caramoy, T. Stempf, C. Moehle and T. Langmann (2015). "Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration." J Neuroinflammation 12: 209.
- Schwartz, S. D., C. D. Regillo, B. L. Lam, D. Elliott, P. J. Rosenfeld, N. Z. Gregori, J. P. Hubschman, J. L. Davis, G. Heilwell, M. Spirn, J. Maguire, R. Gay, J. Bateman, R. M. Ostrick, D. Morris, M. Vincent, E. Anglade, L. V. Del Priore and R. Lanza (2015). "Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies." Lancet 385(9967): 509-516.

- Schwendeman, S. P. (2002). "Recent advances in the stabilization of proteins encapsulated in injectable PLGA delivery systems." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 19(1): 73-98.
- Seigel, G. M. (1999). "The golden age of retinal cell culture." Mol Vis 5: 4.
- Seitz, R. and E. R. Tamm (2014). "Muller cells and microglia of the mouse eye react throughout the entire retina in response to the procedure of an intravitreal injection." Adv Exp Med Biol 801: 347-353.
- Shannon, K. M. and A. Frait (2015). "Therapeutic advances in Huntington's Disease." Mov Disord 30(11):1539-46.
- Sharma, J., S. M. Barr, Y. Geng, Y. Yun and R. D. Higgins (2003). "Ibuprofen improves oxygen-induced retinopathy in a mouse model." Curr Eye Res 27(5): 309-314.
- Shin, J. P., Y. C. Park, J. H. Oh, J. W. Lee, Y. M. Kim, J. O. Lim and S. Y. Kim (2009). "Biodegradable intrascleral implant of triamcinolone acetonide in experimental uveitis." J Ocul Pharmacol Ther 25(3): 201-208.
- Shive, M. S. and J. M. Anderson (1997). "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres." Adv Drug Deliv Rev 28(1): 5-24.
- Short, B. G. (2008). "Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations." Toxicol Pathol 36(1): 49-62.
- Siegel, G. J. and N. B. Chauhan (2000). "Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain." Brain Res Rev 33(2-3): 199-227.
- Simo, R. and C. Hernandez (2012). "Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications." Br J Ophthalmol 96(10): 1285-1290.
- Simo, R. and C. Hernandez (2015). "Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence." Prog Retin Eye Res 48: 160-180.

- Sinha, V. R. and A. Trehan (2003). "Biodegradable microspheres for protein delivery." J Control Release 90(3): 261-280.
- Siqueira, R. C., A. Messias, J. C. Voltarelli, I. U. Scott and R. Jorge (2011). "Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial." Retina 31(6): 1207-1214.
- Siu, A. W., R. J. Reiter and C. H. To (1999). "Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates." J Pineal Res 27(2): 122-128.
- Sleeman, M. W., K. D. Anderson, P. D. Lambert, G. D. Yancopoulos and S. J. Wiegand (2000). "The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha." Pharm Acta Helv 74(2-3): 265-272.
- Smerdon, D. (2000). "Anatomy of the eye and orbit." Current Anaesthesia & Critical Care 11(6): 286-292.
- Smith, S. J., B. D. Smith and B. G. Mohny (2014). "Ocular side effects following intravitreal injection therapy for retinoblastoma: a systematic review." Br J Ophthalmol 98(3): 292-297.
- Smolec, J., B. DeSilva, W. Smith, R. Weiner, M. Kelly, B. Lee, M. Khan, R. Tacey, H. Hill, A. Celniker, V. Shah, R. Bowsher, A. Mire-Sluis, J. W. Findlay, M. Saltarelli, V. Quarmby, D. Lansky, R. Dillard, M. Ullmann, S. Keller and H. T. Karnes (2005). "Bioanalytical method validation for macromolecules in support of pharmacokinetic studies." Pharm Res 22(9): 1425-1431.
- Sommer, A. (1989). "Intraocular pressure and glaucoma." Am J Ophthalmol 107(2): 186-188.
- Song, W., P. Huang and C. Zhang (2015). "Neuroprotective therapies for glaucoma." Drug Des Dev Ther 9: 1469.
- Soto, C. (2003). "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci 4(1): 49-60.

- Spiga, M. G. and T. Borrás (2010). "Development of a gene therapy virus with a glucocorticoid-inducible MMP1 for the treatment of steroid glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci 51(6): 3029-3041.
- Stitt, A. W., T. M. Curtis, M. Chen, R. J. Medina, G. J. McKay, A. Jenkins, T. A. Gardiner, T. J. Lyons, H. P. Hammes, R. Simo and N. Lois (2016). "The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy." Prog Retin Eye Res 51:156-186.
- Strauss, O. (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." Physiol Rev 85(3): 845-881.
- Stubendorff, K., V. Larsson, C. Ballard, L. Minthon, D. Aarsland and E. Londos (2014). "Treatment effect of memantine on survival in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: a prospective study." BMJ open 4(7): e005158.
- Sun, S. W., Y. I. Jeong, S. W. Jung and S. H. Kim (2003). "Characterization of FITC-albumin encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres and its release characteristics." J Microencapsul 20(4): 479-488.
- Talu, S., D. M. Calugaru and C. A. Lupascu (2015). "Characterisation of human non-proliferative diabetic retinopathy using the fractal analysis." Int J Ophthalmol 8(4): 770-776.
- Tanna, A. P. and A. B. Lin (2015). "Medical therapy for glaucoma: what to add after a prostaglandin analogs?" Curr Opin Ophthalmol 26(2): 116-120.
- Taskintuna, I., M. E. Elsayed and P. Schatz (2016). "Update on Clinical Trials in Dry Age-related Macular Degeneration." Middle East Afr J Ophthalmol 23(1): 13-26.
- Teixeira, J., T. Silva, P. B. Andrade and F. Borges (2013). "Alzheimer's disease and antioxidant therapy: how long how far?" Curr Med Chem 20(24): 2939-2952.

- Terrasa, A. M., M. H. Guajardo, C. A. Marra and G. Zapata (2009). "Alpha-tocopherol protects against oxidative damage to lipids of the rod outer segments of the equine retina." Vet J 182(3): 463-468.
- Tezel, G., R. Hernandez and M. B. Wax (2000). "Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes." Arch Ophthalmol 118(4): 511-518.
- Tham, Y. C., X. Li, T. Y. Wong, H. A. Quigley, T. Aung and C. Y. Cheng (2014). "Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis." Ophthalmology 121(11): 2081-2090.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science 267(5203): 1456-1462.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science 281(5381): 1312-1316.
- Thrimawithana, T. R., S. Young, C. R. Bunt, C. Green and R. G. Alany (2011). "Drug delivery to the posterior segment of the eye." Drug Discov Today 16(5-6): 270-277.
- Tobio, M., J. Nolley, Y. Guo, J. McIver and M. J. Alonso (1999). "A novel system based on a poloxamer/PLGA blend as a tetanus toxoid delivery vehicle." Pharm Res 16(5): 682-688.
- Toris, C. B. (2010). "Pharmacotherapies for glaucoma." Curr Mol Med 10(9): 824-840.
- Tosini, G., K. Baba, C. K. Hwang and P. M. Iuvone (2012). "Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology." Exp Eye Res 103: 82-89.
- Tosini, G. and M. Menaker (1996). "Circadian rhythms in cultured mammalian retina." Science 272(5260): 419-421.

- Tremolada, G., C. Del Turco, R. Lattanzio, S. Maestroni, A. Maestroni, F. Bandello and G. Zerbini (2012). "The role of angiogenesis in the development of proliferative diabetic retinopathy: impact of intravitreal anti-VEGF treatment." Exp Diabetes Res 2012: 728325.
- Tsai, J. C., B. J. Song, L. Wu and M. Forbes (2007). "Erythropoietin: a candidate neuroprotective agent in the treatment of glaucoma." J Glaucoma 16(6): 567-571.
- Tsuda, K. (2004). "Neuroprotective effects of MK-801 and catecholamine release in the central nervous system." Stroke 35(5): e96.
- Tucker, B. A., I. H. Park, S. D. Qi, H. J. Klassen, C. Jiang, J. Yao, S. Redenti, G. Q. Daley and M. J. Young (2011). "Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptor precursors restores retinal structure and function in degenerative mice." PLoS One 6(4): e18992.
- Urtti, A. (2006). "Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery." Adv Drug Deliv Rev 58(11): 1131-1135.
- Valiente-Soriano, F. J., F. M. Nadal-Nicolas, M. Salinas-Navarro, M. Jimenez-Lopez, J. M. Bernal-Garro, M. P. Villegas-Perez, M. Agudo-Barriuso and M. Vidal-Sanz (2015). "BDNF Rescues RGCs But Not Intrinsically Photosensitive RGCs in Ocular Hypertensive Albino Rat Retinas." Invest Ophthalmol Vis Sci 56(3): 1924-1936.
- Van Acker, S. A., L. M. Koymans and A. Bast (1993). "Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity." Free Radic Biol 15(3): 311-328.
- Van de Moere, A., S. S. Sandhu, R. Kak, K. W. Mitchell and S. J. Talks (2005). "Effect of posterior juxtasceral triamcinolone acetonide on choroidal neovascular growth after photodynamic therapy with verteporfin." Ophthalmology 112(11): 1896-1903.

- van de Weert, M., W. E. Hennink and W. Jiskoot (2000). "Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles." Pharm Res 17(10): 1159-1167.
- van Leeuwen, R., S. Boekhoorn, J. R. Vingerling, J. C. Witteman, C. C. Klaver, A. Hofman and P. T. de Jong (2005). "Dietary intake of antioxidants and risk of age-related macular degeneration." JAMA 294(24): 3101-3107.
- van Rooij, J., S. G. Schwartzberg, P. G. Mulder and S. G. Baarsma (1999). "Oral vitamins C and E as additional treatment in patients with acute anterior uveitis: a randomised double masked study in 145 patients." Br J Ophthalmol 83(11): 1277-1282.
- van Soest, S., A. Westerveld, P. T. de Jong, E. M. Bleeker-Wagemakers and A. A. Bergen (1999). "Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view." Surv Ophthalmol 43(4): 321-334.
- Vecino, E., D. Garcia-Crespo, M. Garcia, L. Martinez-Millan, S. C. Sharma and E. Carrascal (2002). "Rat retinal ganglion cells co-express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB." Vision Res 42(2): 151-157.
- Veloso, A. A., Jr., Q. Zhu, R. Herrero-Vanrell and M. F. Refojo (1997). "Ganciclovir-loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus." Invest Ophthalmol Vis Sci 38(3): 665-675.
- Vila-Jato, J. (2001). *Tecnología Farmacéutica, Síntesis*.
- Villegas, V. M., L. A. Aranguren, J. L. Kovach, S. G. Schwartz and H. W. Flynn, Jr. (2017). "Current advances in the treatment of neovascular age-related macular degeneration." Expert Opin Drug Deliv 14(2): 273-282.
- Vinores, S. A. (2005). "Anecortave (Alcon Laboratories)." IDrugs 8(4): 327-334.
- Voss, K., K. Falke, A. Bernsdorf, N. Grabow, C. Kastner, K. Sternberg, I. Minrath, T. Eickner, A. Wree, K. P. Schmitz, R. Guthoff, M. Witt and M. Hovakimyan (2015). "Development of a novel injectable drug delivery system for subconjunctival glaucoma treatment." J Control Release 214: 1-11.

- Wang, L., Y. Liu, W. Zhang, X. Chen, T. Yang and G. Ma (2013). "Microspheres and microcapsules for protein delivery: strategies of drug activity retention." Curr Pharm Des 19(35): 6340-6352.
- Wang, M., Q. Feng, X. Niu, R. Tan and Z. She (2010). "A spheres-in-sphere structure for improving protein-loading poly (lactide-co-glycolide) microspheres." Polym Degrad Stab 95(1): 6-13.
- Wang, N., X. S. Wu, C. Li and M. F. Feng (2000). "Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: I. Synthesis and characterization." J Biomater Sci Polym Ed 11(3): 301-318.
- Wang, S. W., X. Mu, W. J. Bowers and W. H. Klein (2002). "Retinal ganglion cell differentiation in cultured mouse retinal explants." Methods 28(4): 448-456.
- Wang, Y., A. Rajala, B. Cao, M. Ranjo-Bishop, M. P. Agbaga, C. Mao and R. V. Rajala (2016). "Cell-Specific Promoters Enable Lipid-Based Nanoparticles to Deliver Genes to Specific Cells of the Retina In Vivo." Theranostics 6(10): 1514-1527.
- Ward, M. S., A. Khoobehi, E. B. Lavik, R. Langer and M. J. Young (2007). "Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres." J Pharm Sci 96(3): 558-568.
- Weijtens, O., E. J. Feron, R. C. Schoemaker, A. F. Cohen, E. G. Lentjes, F. P. Romijn and J. C. van Meurs (1999). "High concentration of dexamethasone in aqueous and vitreous after subconjunctival injection." Am J Ophthalmol 128(2): 192-197.
- Weinreb, R. N., T. Aung and F. A. Medeiros (2014). "The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review." JAMA 311(18): 1901-1911.
- Wert, K. J., J. H. Lin and S. H. Tsang (2014). "General pathophysiology in retinal degeneration." Dev Ophthalmol 53: 33-43.

- Wesnes, K. A., D. Aarsland, C. Ballard and E. Londos (2015). "Memantine improves attention and episodic memory in Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies." Int J Geriatr Psychiatry 30(1): 46-54.
- Whitcup, S. M. and M. R. Robinson (2015). "Development of a dexamethasone intravitreal implant for the treatment of noninfectious posterior segment uveitis." Ann N Y Acad Sci 1358: 1-12.
- Whitmire, W., M. M. Al-Gayyar, M. Abdelsaid, B. K. Yousufzai and A. B. El-Remessy (2011). "Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far." Mol Vis 17: 300-308.
- Victorin, K. and H. Widner (2016). "Memantine and reduced time with dyskinesia in Parkinson' s Disease." Acta Neurol Scand. 133(5):355-60.
- Wiechmann, A. F. and J. A. Summers (2008). "Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues." Prog Retin Eye Res 27(2): 137-160.
- Wilkinson-Berka, J. L. (2004). "Diabetes and retinal vascular disorders: role of the renin-angiotensin system." Expert Rev Mol Med 6(15): 1-18.
- Wilson, A. M. and A. Di Polo (2012). "Gene therapy for retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma." Gene Ther 19(2): 127-136.
- Wirth, T., N. Parker and S. Yla-Herttuala (2013). "History of gene therapy." Gene 525(2): 162-169.
- Wong, T. Y., C. M. Cheung, M. Larsen, S. Sharma and R. Simo (2016). "Diabetic retinopathy." Nat Rev Dis Primers 2: 16012.
- Wordinger, R. J., W. Lambert, R. Agarwal, X. Liu and A. F. Clark (2003). "Cells of the human optic nerve head express glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and the GDNF receptor complex." Mol Vis 9: 249-256.

- Wright, A. F., C. F. Chakarova, M. M. Abd El-Aziz and S. S. Bhattacharya (2010). "Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait." Nat Rev Genet 11(4): 273-284.
- Wu, W. C., C. C. Lai, S. L. Chen, M. H. Sun, X. Xiao, T. L. Chen, R. J. Tsai, S. W. Kuo and Y. P. Tsao (2004). "GDNF gene therapy attenuates retinal ischemic injuries in rats." Mol Vis 10: 93-102.
- Wu, X. S. (2004). "Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application." Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 32(4): 575-591.
- Wu, X. S. and N. Wang (2001). "Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation." J Biomater Sci Polym Ed 12(1): 21-34.
- Wyględowska-Promienska, D., A. Piotrowska-Gwozdz, A. Piotrowska-Seweryn and G. Mazur-Piotrowska (2015). "Combination of Aflibercept and Bromfenac Therapy in Age-Related Macular Degeneration: A Pilot Study Aflibercept and Bromfenac in AMD." Med Sci Monit 21: 3906-3912.
- Xu, J., Y. Wang, Y. Li, X. Yang, P. Zhang, H. Hou, Y. Shi and C. Song (2007). "Inhibitory efficacy of intravitreal dexamethasone acetate-loaded PLGA nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model." J Ocul Pharmacol Ther 23(6): 527-540.
- Yan, Q., J. Wang, C. R. Matheson and J. L. Urich (1999). "Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." J Neurobiol 38(3): 382-390.
- Yandrapu, S. K., A. K. Upadhyay, J. M. Petrash and U. B. Kompella (2013). "Nanoparticles in porous microparticles prepared by supercritical infusion and pressure quench technology for sustained delivery of bevacizumab." Mol Pharm 10(12): 4676-4686.

- Yang, J. and J. L. Cleland (1997). "Factors affecting the in vitro release of recombinant human interferon-gamma (rhIFN-gamma) from PLGA microspheres." J Pharm Sci 86(8): 908-914.
- Yang, X., Y. Zhang, H. Xu, X. Luo, J. Yu, J. Liu and R. C. Chang (2016). "Neuroprotection of Coenzyme Q10 in Neurodegenerative Diseases." Curr Top Med Chem. 16(8):858-866.
- Yao, J., B. A. Tucker, X. Zhang, P. Checa-Casalengua, R. Herrero-Vanrell and M. J. Young (2011). "Robust cell integration from co-transplantation of biodegradable MMP2-PLGA microspheres with retinal progenitor cells." Biomaterials 32(4): 1041-1050.
- Yap, Y. C., T. Papathomas and A. Kamal (2015). "Results of intravitreal dexamethasone implant 0.7 mg (Ozurdex(R)) in non-infectious posterior uveitis." Int J Ophthalmol 8(4): 835-838.
- Yasukawa, T., Y. Ogura, H. Kimura, E. Sakurai and Y. Tabata (2006). "Drug delivery from ocular implants." Expert Opin Drug Deliv 3(2): 261-273.
- Yasukawa, T., Y. Tabata, H. Kimura and Y. Ogura (2011). "Recent advances in intraocular drug delivery systems." Recent Pat Drug Deliv Formul 5(1): 1-10.
- Yau, J. W., S. L. Rogers, R. Kawasaki, E. L. Lamoureux, J. W. Kowalski, T. Bek, S. J. Chen, J. M. Dekker, A. Fletcher, J. Grauslund, S. Haffner, R. F. Hamman, M. K. Ikram, T. Kayama, B. E. Klein, R. Klein, S. Krishnaiah, K. Mayurasakorn, J. P. O'Hare, T. J. Orchard, M. Porta, M. Rema, M. S. Roy, T. Sharma, J. Shaw, H. Taylor, J. M. Tielsch, R. Varma, J. J. Wang, N. Wang, S. West, L. Xu, M. Yasuda, X. Zhang, P. Mitchell and T. Y. Wong (2012). "Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy." Diabetes Care 35(3): 556-564.
- Ye, M., S. Kim and K. Park (2010). "Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles." J Control Release 146(2): 241-260.

- Yonekawa, Y., J. W. Miller and I. K. Kim (2015). "Age-Related Macular Degeneration: Advances in Management and Diagnosis." J Clin Med 4(2): 343-359.
- Young, R. W. (1984). "Cell death during differentiation of the retina in the mouse." J Comp Neurol 229(3): 362-373.
- Yu, H. S., R. W. Yee, K. A. Howes and R. J. Reiter (1990). "Diurnal rhythms of immunoreactive melatonin in the aqueous humor and serum of male pigmented rabbits." Neurosci Lett 116(3): 309-314.
- Yu, S., T. Tanabe, M. Dezawa, H. Ishikawa and N. Yoshimura (2006). "Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model." Biochem Biophys Res Commun 344(4): 1071-1079.
- Yuan, W., F. Wu, M. Guo and T. Jin (2009). "Development of protein delivery microsphere system by a novel S/O/O/W multi-emulsion." Eur J Pharm Sci 36(2-3): 212-218.
- Zahn, G., K. Volk, G. P. Lewis, D. Vossmeier, R. Stragies, J. S. Heier, P. E. Daniel, Jr., A. P. Adamis, E. A. Chapin, S. K. Fisher, F. G. Holz, K. U. Löffler and J. Knolle (2010). "Assessment of the integrin alpha5beta1 antagonist JSM6427 in proliferative vitreoretinopathy using in vitro assays and a rabbit model of retinal detachment." Invest Ophthalmol Vis Sci 51(2): 1028-1035.
- Zarbin, M. A. and P. J. Rosenfeld (2010). "Pathway-based therapies for age-related macular degeneration: an integrated survey of emerging treatment alternatives." Retina 30(9): 1350-1367.
- Zarbin, M. A., T. Arlow and R. Ritch (2013). "Regenerative nanomedicine for vision restoration." Mayo Clin Proc 88(12): 1480-1490.

- Zhang, H. X., X. P. Zhang, G. Y. Xiao, Y. Hou, L. Cheng, M. Si, S. S. Wang, Y. H. Li and L. Nie (2016). "In vitro and in vivo evaluation of calcium phosphate composite scaffolds containing BMP-VEGF loaded PLGA microspheres for the treatment of avascular necrosis of the femoral head." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 60: 298-307.
- Zhang, J. X., N. L. Wang and Q. J. Lu (2015). "Development of gene and stem cell therapy for ocular neurodegeneration." Int J Ophthalmol 8(3): 622-630.
- Zhang, K., J. J. Hopkins, J. S. Heier, D. G. Birch, L. S. Halperin, T. A. Albini, D. M. Brown, G. J. Jaffe, W. Tao and G. A. Williams (2011). "Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A 108(15): 6241-6245.
- Zhang, M., X. Mo, Y. Fang, W. Guo, J. Wu, S. Zhang and Q. Huang (2009). "Rescue of photoreceptors by BDNF gene transfer using in vivo electroporation in the RCS rat of retinitis pigmentosa." Curr Eye Res 34(9): 791-799.
- Zhang, S. S., X. Y. Fu and C. J. Barnstable (2002). "Tissue culture studies of retinal development." Methods 28(4): 439-447.
- Zhao, T., J. Gao, J. Van, E. To, A. Wang, S. Cao, J. Z. Cui, J. P. Guo, M. Lee, P. L. McGeer and J. A. Matsubara (2015). "Age-related increases in amyloid beta and membrane attack complex: evidence of inflammasome activation in the rodent eye." J Neuroinflammation 12: 121.
- Zheng, A., Y. Li and S. H. Tsang (2015). "Personalized therapeutic strategies for patients with retinitis pigmentosa." Expert Opin Biol Ther 15(3): 391-402.
- Zhong, L., J. Bradley, W. Schubert, E. Ahmed, A. P. Adamis, D. T. Shima, G. S. Robinson and Y. S. Ng (2007). "Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice." Invest Ophthalmol Vis Sci 48(3): 1212-1218.

TESIS DOCTORAL

Ph.D THESIS

Cristina G. García Caballero

2017