

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria



TESIS DOCTORAL

Co-liberación de agentes neuroprotectores a partir de sistemas microparticulares biodegradables: uso potencial en el tratamiento de patologías degenerativas del nervio óptico y la retina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia Arranz Romera

Directoras

Rocío Herrero Vanrell

Irene Bravo Osuna

Madrid

Ed. electrónica 2019



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia | Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria

TESIS DOCTORAL | Ph. D. THESIS

**CO-LIBERACIÓN DE AGENTES NEUROPROTECTORES A PARTIR
DE SISTEMAS MICROPARTICULARES BIODEGRADABLES.
USO POTENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS
DEGENERATIVAS DEL NERVIÓ ÓPTICO Y LA RETINA**

CO-DELIVERY OF NEUROPROTECTIVE AGENTS FROM
BIODEGRADABLE MICROPARTICULATE SYSTEMS. POTENTIAL
USE FOR THE TREATMENT OF RETINAL AND OPTIC NERVE
DEGENERATIVE DISEASES

Alicia Arranz Romera

Bajo la dirección de las Doctoras: Rocío Herrero Vanrell | Irene Bravo Osuna

MADRID 2019



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología
Alimentaria**



TESIS DOCTORAL

**CO-LIBERACIÓN DE AGENTES NEUROPROTECTORES
A PARTIR DE SISTEMAS MICROPARTICULARES
BIODEGRADABLES. USO POTENCIAL EN EL
TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS DEGENERATIVAS DEL
NERVIO ÓPTICO Y LA RETINA**

Alicia Arranz Romera

Bajo la dirección de las Doctoras:

**Rocío Herrero Vanrell
Irene Bravo Osuna**

Madrid, 2019

DRA. ROCÍO HERRERO VANRELL Y DRA. IRENE BRAVO OSUNA
PROFESORA TITULAR Y PROFESORA CONTRATADA DOCTOR DEL
DEPARTAMENTO DE FARMACIA GALÉNICA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA
DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada

“Co-liberación de agentes neuroprotectores a partir de sistemas microparticulares biodegradables. Uso potencial en el tratamiento de patologías degenerativas del nervio óptico y la retina”

“Co-delivery of neuroprotective agents from biodegradable microparticulate systems. Potential use for the treatment of retinal and optic nerve degenerative diseases”

ha sido elaborada bajo su dirección por la Licenciada en Farmacia **Dña. Alicia Arranz Romera** en el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria y, hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Madrid a 23 de enero de 2019.

Fdo. Rocío Herrero Vanrell

Fdo. Irene Bravo Osuna

COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID

FACULTY OF PHARMACY

Department of Pharmaceutics and Food Technology



Ph.D. THESIS

**CO-DELIVERY OF NEUROPROTECTIVE AGENTS FROM
BIODEGRADABLE MICROPARTICULATE SYSTEMS.
POTENTIAL USE FOR THE TREATMENT OF RETINAL
AND OPTIC NERVE DEGENERATIVE DISEASES**

Alicia Arranz Romera

Under the supervision of the PhDs:

**Rocío Herrero Vanrell
Irene Bravo Osuna**

Madrid, 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que me han acompañado en el largo camino recorrido hasta finalizar esta tesis doctoral:

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directoras de tesis, las Doctoras Rocío Herrero Vanrell e Irene Bravo Osuna, por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y compartir generosamente conmigo sus conocimientos y calidad investigadora. Gracias por vuestra dedicación y constante apoyo durante todos estos años tanto a nivel profesional como personal.

Al Dr. Juan José Torrado Durán y a la Dra. Emilia Barcia Hernández, directores del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria 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.

Al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades debo un especial agradecimiento por la concesión de la beca de Formación de Personal Investigador, gracias a la cual, he podido realizar esta tesis doctoral, así como las estancias de investigación.

A la Dra. Patricia Fernández Robredo, del laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Navarra y a todo su grupo de investigación, por el desarrollo de los estudios de tolerancia y eficacia *in vitro* recogidos en el primer trabajo de esta tesis. A Jaione Bezunartea Bezunartea por su gran apoyo técnico. Me gustaría agradecer tanto a la Dra. Patricia Fernández como a su grupo no sólo su gran dedicación, sino también la cálida acogida recibida los días que pasé en su laboratorio.

A la Dra. M. Francesca Cordeiro y al Dr. Benjamin M. Davis, del Instituto de Oftalmología de la University College de Londres, les agradezco su inestimable trabajo en los estudios de eficacia recogidos en el capítulo II de esta tesis doctoral. Tanto ellos como todo su grupo de investigación me acogieron de una

manera excepcional e hicieron más fáciles mis días en Londres. Muchas gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación investigadora como es la realización de una estancia de investigación.

Al Dr. Nicolás Cuenca y su grupo de investigación por la realización de los estudios *in vivo* preliminares de la formulación optimizada en el tercer capítulo. En especial mi agradecimiento a la Dra. Laura Fernández Sánchez por su esfuerzo y compromiso con este proyecto. Así mismo, me gustaría agradecer tanto al Dr. Nicolás Cuenca como a todo su grupo de investigación, la buena acogida que me brindaron los días que pasé en su laboratorio.

Al Dr. Michael J. Young, del Departamento de Oftalmología del Schepens Eye Research Institute de la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard, le agradezco la oportunidad de permitirme realizar una estancia de investigación bajo su dirección. No cabe duda de que esta experiencia ha enriquecido mi formación de investigadora. De forma especial quiero expresar mi gratitud a la Dra. Deepti Singh por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia en el ámbito de la inmunohistoquímica y los cultivos *ex vivo*.

A mi compañera y amiga la Dra. Vanessa Andrés Guerrero por su inagotable ayuda durante todos estos años. Gracias por compartir conmigo tus conocimientos y por brindarme siempre buenos consejos, espero que sepas que eres un referente para mí. A la Dra. Cristina Genoveva García Caballero por ayudarme siempre que lo he necesitado, siendo no sólo una compañera de trabajo sino también una amiga.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, tanto aquellos con los que tuve el placer de coincidir al principio de esta andadura, como aquellos con los que tengo la suerte de trabajar día a día. Gracias por los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio. De forma especial quiero agradecer a mi compañero y amigo Sergio todo su apoyo a nivel investigador, pero principalmente gracias por tu calidad humana. Estos años no habrían sido lo mismo sin ti y aunque esta etapa haya llegado a su fin, espero que sepas que siempre podrás contar conmigo.

A mi novio por su apoyo durante todos estos años, porque tanto en los buenos como en los malos momentos siempre estuviste y estás ahí. Por la felicidad que me aportas día a día. Por todos estos años en los que hemos crecido juntos y por todos los que nos quedan. Conocerme ha sido una de las mejores cosas que me ha dado el doctorado. Te quiero.

A mis amigos, que siempre han tenido palabras de ánimo y han sabido sacarme una sonrisa.

A toda mi familia por su apoyo durante esta andadura. A mi hermana, cuya capacidad de esfuerzo, tenacidad y constancia ha sido una inspiración para mí desde pequeña, te quiero. Por último y de forma muy especial, gracias a mis padres. Nunca encontraré suficientes palabras para expresar lo que os quiero y lo agradecida que estoy de teneros como padres. Gracias por vuestro sacrificio, apoyo y cariño durante toda mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado y por creer en mí. Gracias por ofrecerme las mejores oportunidades posibles. Sois mi ejemplo a seguir en la vida y a vosotros os dedico esta tesis doctoral. Os quiero.

A mis padres y a mi hermana

Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.

- Marie Curie

ÍNDICE

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN - SUMMARY	11
INTRODUCCIÓN	23
1. Anatomofisiología ocular	25
1.1. Capas del globo ocular	26
1.2. Segmentos y cámaras del globo ocular	27
1.3. Retina	28
1.4. Anexos del globo ocular	32
2. Patologías degenerativas que afectan al segmento posterior del ojo	33
2.1. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)	34
2.2. Glaucoma	38
2.3. Retinopatía Diabética (RD)	42
2.4. Retinosis pigmentaria (RP)	44
2.5. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL)	47
3. Vías de administración de sustancias activas para el tratamiento de las patologías que afectan al segmento posterior del ojo	48
3.1. Administración tópica	49
3.2. Administración por vías que impliquen efecto sistémico	50
3.3. Administración intraocular	51
3.4. Administración periocular	53
4. Sistemas de liberación controlada de sustancias activas por vía oftálmica en el segmento posterior del ojo	54
4.1. Implantes	55
4.2. Micro- y Nanopartículas	61
4.3. Liposomas	69
5. Terapia farmacológica en la neuroprotección ocular	73
5.1. Prevención frente a la excitotoxicidad	73
5.2. Prevención frente a la disfunción mitocondrial	76
5.3. Prevención frente al plegamiento anómalo de proteínas	77
5.4. Prevención frente al estrés oxidativo	78
5.5. Estrategias antiinflamatorias e inmunológicas	79
5.6. Suplementación con factores neurotróficos exógenos	80

6. Agentes neuroprotectores para el tratamiento de patologías del segmento posterior del ojo seleccionados para los trabajos experimentales.....	81
6.1. Factores neurotróficos.....	81
6.2. Vitamina E	88
6.3. Dexametasona	91
6.4. Melatonina	93
6.5. Coenzima Q10.....	96
6.6. Ácido Tauroursodeoxicólico	98
7. Métodos de microencapsulación de sustancias activas para su administración intravitrea	100
HIPÓTESIS DE TRABAJO	105
OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO – OBJECTIVES AND APPROACH.....	109
CAPÍTULO I – CHAPTER I	
<i>BDNF and GDNF/Vitamin E sustained delivery system improves migration in ARPE-19 cells: potential usefulness in degenerative retinal pathologies</i>	119
1. Introduction.....	125
2. Materials and methods	128
2.1 Microspheres elaboration:	128
2.2 Microspheres characterization:	129
2.3 Cell culture.....	130
2.4 Retinal pigment epithelium and endothelial cell characterization	131
2.5 Cellular viability assay MTT.....	132
2.6 Cell migration assays on ARPE-19 cells and angiogenesis assays on RF/6A cells assessed by wound healing.....	132
2.7 TUNEL assay to detect cell apoptosis	132
2.8 Statistical analysis	133
3. Results.....	134
3.1 Microspheres characterization	134
3.2 In vitro release studies	136
3.3 GDNF and BDNF MSs are safe for ARPE-19 and RF/6A cells	137
3.4 Wound closure analysis: migration in ARPE-19 and angiogenesis in RF/6A cells	139
4. Discussion	143
CAPÍTULO II – CHAPTER II	
<i>Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma</i>.....	149

1. Introduction.....	155
2. Materials and methods	158
2.1 <i>Manufacture of PLGA Microspheres</i>	158
2.2 <i>Dexamethasone/melatonin/coenzyme Q10 quantification by LC/MS</i>	159
2.3 <i>Microspheres characterization</i>	160
2.4 <i>Cell culture</i>	162
2.5 <i>Animals</i>	163
3. Results.....	166
3.1 <i>Microspheres characterization</i>	166
3.2 <i>DX/MEL/CoQ10-loaded MSs are neuroprotective in vitro against established model of excitotoxicity-mediated neurotoxicity in R28 retinal cultures</i>	171
3.3 <i>Multiloaded MSs formulation inhibits RGC degeneration in the Morrison's model of ocular hypertension</i>	172
4. Discussion	175
5. Conclusion.....	180
CAPÍTULO III - CHAPTER III	
<i>Co-delivery of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) from PLGA microspheres. Potential combination therapy of retinal diseases</i>	183
1. Introduction.....	189
2. Materials and methods	191
2.1 <i>Materials</i>	191
2.2 <i>Elaboration of Microspheres</i>	192
2.3 <i>Microspheres characterization</i>	193
3. Results.....	197
3.1 <i>Microspheres characterization</i>	197
3.2 <i>Morphological studies</i>	197
3.3 <i>Encapsulation efficiencies (EE%)</i>	201
3.4 <i>In vitro burst release</i>	202
4. Discussion	205
5. Conclusions	211
Preliminary studies	213
DISCUSIÓN GENERAL	223
CONCLUSIONES - CONCLUSIONS	245

ÍNDICE

BIBLIOGRAFÍA.....251
ANEXO - APPENDIX.....307

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

El trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis doctoral ha sido presentado a los siguientes congresos:

Microparticulate drug delivery systems for the treatment of ophthalmic diseases affecting the optic nerve and the retina. Rocío Herrero Vanrell. XIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. Santiago de Compostela, España. 2019. (Conferencia plenaria).

Co-delivery of neuroprotectants from a microparticulate drug delivery system. Potential combination therapy in glaucoma. D. García-Herranz, A. Arranz-Romera, B.M. Davis, L. Guo, I.T. Molina-Martínez, I. Bravo-Osuna, M.F. Cordeiro, R. Herrero-Vanrell. XIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. Santiago de Compostela, España. 2019. (Comunicación oral).

Neuroprotective efficacy of a multi-loaded micro particulate drug delivery system in an ocular hypertension model of glaucoma. Arranz-Romera A, Davis BM, Esteban-Pérez S, Guo L, Bravo-Osuna I, Shamsher E, Ravindran N, Molina-Martínez I.T, Cordeiro MF, Herrero-Vanrell. European Association for Vision and Eye Research Conference (EVER). Niza, Francia. 2018. (Comunicación oral).

Microparticles as therapeutic tools in retinal diseases. R. Herrero-Vanrell. EURORETINA. Viena, Austria. 2018. (Comunicación oral).

Simultaneous Co-delivery of Therapeutics with Biodegradable Microparticles. Potential Treatment of Retinal Diseases. Rocío Herrero-Vanrell. International Society for Eye Research (ISER). Belfast, Reino Unido. 2018. (Comunicación oral).

Co-delivery of Dexamethasone-Melatonin-CoQ10 from a microparticulate drug delivery system. Potential usefulness in neuroprotective therapy. Arranz-Romera A, Shamsher E, Esteban-Pérez S, Davis BM, García-Herranz D, Guo L, Molina-Martínez I.T, Bravo-Osuna I, Cordeiro MF, Herrero-Vanrell R. ARVO Annual Meeting. Honolulu, Hawaii, USA. 2018. (Póster).

Diseño y caracterización de sistemas biodegradables microparticulares cargados con agentes neuroprotectores. Arranz-Romera A. Seminario de investigación en la XII Jornada sobre Tecnología Farmacéutica, Biofarmacia y Farmacocinética. Madrid. 2018. (Comunicación oral).

Multiloading 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).

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).

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).

ABREVIATURAS

A/O Acuo-oleosa

A/O/A Acuo-óleo-acuosa

ACh Acetilcolina

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ADNmt ADN mitocondrial

AG Atrofia geográfica

AIF Factor inductor de la apoptosis (*Apoptotic Inducing Factor*)

AINE Antiinflamatorio no esteroideo

AMD *age-related macular degeneration*

AMPc adenosin monofosfato cíclica

ARN Ácido ribonucleico

ARTN Artemina

ATP Adenosín trifosfato (adenosine triphosphate)

BDNF Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)

BSA Albúmina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)

CCG Capa de células ganglionares

CGR Células ganglionares de la retina

CMV Citomegalovirus

CNE Capa nuclear externa

CNI Capa nuclear interna

CNTF Factor Neurotrófico Ciliar (*Ciliary Neurotrophic Factor*)

CNV Choroidal neovascularization

CoQ10 Coenzima Q10

CPE Capa plexiforme externa

CPI Capa plexiforme interna

CSE Capa de segmentos externos de los fotorreceptores

DMAE Degeneración macular asociada a la edad

DME Edema macular diabético (*Diabetic macular edema*)

DX Dexametasona

ECT Encapsulated Cell Therapy

ABREVIATURAS

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

EVA Acetato de etilvinilo

FDA United States Food and Drugs Administration

GC Glucocorticoides

GDNF Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*)

GFLs Familia de GDNF (*GDNF Family of Ligands*)

HBO Oxigenación hiperbárica (*Hyperbaric oxygen*)

HPMC Hidroxipropilmetil celulosa (*hydroxypropyl methylcellulose*)

HSP Proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*)

IL Interleuquina

iNOS Enzima óxido nítrico sintasa

IODDS intraocular drug delivery systems

IOP Intraocular pressure

iPSC células madre pluripotenciales inducidas (*induced pluripotent stem cells*)

LPD Liposoma-protamina-ADN

LUV Vesículas unilaminares grandes

MEL Melatonina

MLE Membrana limitante externa

MLI Membrana limitante interna

MLV Vesículas multilaminares

MMP Metaloproteasa

MSs Microspheres

MT Receptores de melatonina

NGF Factor de Crecimiento Nervioso (*Nerve growth factor*)

NMDA Receptor N-metilD-aspartato (*N-methyl-D-aspartate receptor*)

NO Óxido nítrico (*Nitric oxide*)

NOHL Neuropatía óptica hereditaria de Leber

NRTN Neuroturina

- NT** Neurotrofina
- NVC** Neovascularización coroidea
- O/A** Óleo-acuosa
- O/O** Óleo-oleosa
- OMS** Organización Mundial de la Salud
- PBS** Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)
- PCL** Policaprolactona
- PEDF** Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (*Pigment Epithelium-Derived Factor*)
- PEG** Polietilenglicol
- PGA** Productos de la glicosilación avanzada
- PIGF** Factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor*)
- PIO** Presión intraocular
- PKA** Proteína Kinasa A
- PLA** Ácido poliláctico
- PLGA** Ácido poli(láctico-co-glicólico) (*poly(lactic-co-glycolic) acid*)
- POE** Poli(orto)éster
- PSPN** Persepina
- PVA** Alcohol polivinílico
- RD** Retinopatía diabética
- RG** receptor intracitoplasmático específico
- RGCs** *Retinal ganglion cells*
- ROS** Especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)
- RP** Retinosis pigmentaria
- SNC** Sistema nervioso central
- SUV** Vesículas unilaminares pequeñas
- Tfam** Factor de transcripción mitocondrial A (*Mitochondrial transcription factor A-Tfam*)
- TGF- β** Factor de Crecimiento Transformante Beta (*Transforming Growth Factor beta*)
- TNF** Factor de Necrosis Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
- TUDCA** Ácido Tauroursodeoxicólico (*Tauroursodeoxycholic acid*)
- TUNEL** TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling

ABREVIATURAS

UDCA Ácido ursodeoxicólico (*ursodeoxycholic acid*)

VEGF Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)

VitE Vitamina E

RESUMEN
SUMMARY

RESUMEN

“CO-LIBERACIÓN DE AGENTES NEUROPROTECTORES A PARTIR DE SISTEMAS MICROPARTICULARES BIODEGRADABLES. USO POTENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS DEGENERATIVAS DEL NERVIÓ ÓPTICO Y LA RETINA”

Las patologías degenerativas que afectan al nervio óptico y la retina se caracterizan por ser devastadoras y comprometer significativamente la visión. En su mayoría son crónicas y cursan con un daño progresivo del nervio óptico y la pérdida de las células ganglionares de la retina (CGR), fotorreceptores y otras células retinianas, en un proceso que se conoce como neurodegeneración. En este proceso de patogénesis se encuentran implicados numerosos mecanismos de daño tales como el estrés oxidativo, la inflamación o la disfunción mitocondrial, que actúan además interaccionando entre sí. Esto, pone de manifiesto la complejidad y naturaleza multifactorial de estas enfermedades. Una de las estrategias terapéuticas encaminadas al tratamiento de las patologías neurodegenerativas es la neuroprotección, la cual se centra en prevenir, limitar, y en algunos casos revertir, la degeneración o muerte de las células neuronales. Además, dado que estas patologías presentan una etiología multifactorial, una actuación neuroprotectora múltiple con diversos agentes activos dirigidos frente a uno o varios mecanismos implicados en la patogénesis resulta sumamente interesante. Este enfoque terapéutico es lo que se conoce como terapia combinada o terapia de combinación.

En la neuroprotección ocular, diversas moléculas, que actúan mediante diferentes mecanismos, han demostrado capacidad para promover la supervivencia de las CGR y los fotorreceptores. Entre ellos, se encuentran, el Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF) y el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) (agentes neurotróficos), la dexametasona (modulador de la inflamación), la melatonina (antioxidantes), la coenzima Q10 (biorreguladores mitocondriales) y el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) (agente antiapoptótico).

El tratamiento de las patologías que afectan al segmento posterior del ojo requiere de concentraciones eficaces de las sustancias activas en el lugar de acción. Por ello, se hace necesario el empleo de vías de administración

directas como la intravítrea, la cual posibilita el depósito de los agentes activos en una zona cercana al tejido diana. No obstante, debido al carácter crónico de las enfermedades neurodegenerativas, se precisa del empleo de inyecciones repetidas que se asocian a efectos secundarios indeseados, tales como desprendimiento de retina, cataratas o endoftalmitis. Así, las terapias basadas en el empleo de sistemas de liberación controlada representan una excelente alternativa terapéutica. Estos sistemas, son capaces de proporcionar concentraciones terapéuticas de las sustancias activas en el lugar de acción durante periodos prolongados de tiempo. Además, si el sistema desarrollado es biodegradable, desaparece del lugar de administración una vez ejercido su efecto, evitando un proceso quirúrgico para su retirada. Dentro de ellos, los sistemas microparticulares biodegradables de liberación controlada han despertado un notable interés. Tras su inyección intravítrea, en forma de suspensión, estos microsistemas quedan agregados cerca del lugar de administración, liberando progresivamente los agentes encapsulados en su interior y desapareciendo una vez ejercido el efecto. Por todo ello, las micropartículas de estructura matricial (microesferas) han sido los sistemas 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 varias formulaciones de terapia neuroprotectora combinada basadas en microesferas (MSs) de ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) un polímero biocompatible y biodegradable. Las microesferas se han cargado con diversos agentes neuroprotectores, para su empleo como sistemas intraoculares de liberación controlada destinados al tratamiento de patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo, y más concretamente, como una nueva aproximación terapéutica basada en una terapia neuroprotectora de combinación.

Para la obtención de los microsistemas de carga múltiple se ha empleado el método de la extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión de fase externa acuosa. En aquellos sistemas que portaron sustancias activas de naturaleza proteica, como el GDNF o el BDNF, se recurrió a la utilización de un aditivo oleoso (vitamina E) para la incorporación de estas al estado sólido, favoreciendo así el mantenimiento de su integridad estructural (técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A).

En los estadios avanzados de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), independientemente de la forma en la que se exprese (atrofia geográfica o neovascularización coroidea), se produce el deterioro grave del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y una importante atrofia coroidea. Así, el desarrollo de terapias complementarias a las existentes para la DMAE en estado avanzado resulta de gran interés. Como **primer objetivo** de esta tesis doctoral se propuso la evaluación *in vitro* del efecto migratorio y antiangiogénico de microesferas de PLGA cargadas con GDNF o con una combinación de GDNF y BDNF. Para la determinación de cada uno de los efectos se acudió al empleo de células del epitelio pigmentario de la retina (*Human retinal pigment epithelial cells*, ARPE-19) y células endoteliales de la coroides (*primary primate endothelial choroidal cell line*, RF/6A). En este trabajo, tanto la formulación de monoterapia (MSs de GDNF), como la de terapia combinada (MSs de GDNF/BDNF) fueron capaces de liberar *in vitro* de forma controlada los agentes activos durante 77 días. Ambas formulaciones presentaron una buena tolerancia *in vitro* en los dos tipos celulares empleados en este trabajo. Los estudios de eficacia en términos de migración demostraron que la formulación de microesferas cargadas con la combinación de GDNF/BDNF aumentó significativamente ($p < 0,01$) la migración de las células del epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en cuanto al efecto antiangiogénico en las RF/6A. En este trabajo se puso de manifiesto el efecto beneficioso de la combinación de factores neurotróficos (GDNF y BDNF), ya que la formulación microparticulada de monoterapia con GDNF no fue capaz de promover la migración de las células del EPR. Así, la formulación de carga múltiple desarrollada se presenta como una herramienta terapéutica interesante para la reparación del EPR, postulándose además como una posible terapia coadyuvante de la terapia antiangiogénica en la DMAE.

A la hora de desarrollar sistemas microparticulares de liberación controlada para el tratamiento de patologías crónicas, como son las enfermedades neurodegenerativas oftálmicas del segmento posterior del ojo, la tolerancia a estos dispositivos resulta crítica pudiendo condicionar la eficacia terapéutica. En este contexto, el empleo de sistemas microparticulares de carga múltiple no solo posibilita la administración conjunta de varios agentes activos, sino también la reducción del biomaterial polimérico administrado. Por todo ello,

como **segundo objetivo** de esta tesis doctoral se planteó, por un lado, la evaluación del efecto neuroprotector de una formulación de MSs cargada con tres agentes activos (dexametasona, melatonina y coenzima Q10). Además se realizó una comparación entre la nueva formulación desarrollada y una mezcla física equivalente (en dosis de sustancias activas) de MSs cargadas individualmente, en un modelo de hipertensión ocular por inyección hipersalina en rata (Morrison's ocular hypertension model). La administración intravítrea de la formulación de carga múltiple promovió significativamente ($p < 0,05$) la supervivencia de las células ganglionares de la retina (CGR) en el modelo animal de glaucoma, en comparación con la administración de la mezcla de MSs de carga individual o las MSs blanco. Además, la cantidad de polímero administrado con la mezcla física de MSs fue casi tres veces superior a la empleada con la formulación de carga múltiple, hecho que pudo derivar en una cierta toxicidad retiniana y por ende en la ausencia de efecto terapéutico. Por lo tanto, se pudo concluir que la incorporación de los diversos agentes activos dentro de una misma matriz polimérica permite una mejora de la tolerancia de los sistemas microparticulares a nivel de la retina, postulándose como una estrategia neuroprotectora prometedora para el tratamiento de enfermedades retinianas multifactoriales como el glaucoma.

Finalmente, como **tercer objetivo** de la tesis doctoral se planteó la elaboración y optimización de una formulación microparticulada de terapia combinada para la liberación simultánea de dos compuestos activos de distinta naturaleza y entidad física, un producto biotecnológico (GDNF) y un compuesto de bajo peso molecular (TUDCA). Desde el punto de vista farmacológico, el GDNF actúa como factor neurotrófico y el TUDCA como agente antiapoptótico. Para la obtención de la formulación optimizada, se emplearon distintos recursos tecnológicos en el proceso de microencapsulación: el empleo de distintas proporciones de un co-solvente polar (etanol) en la fase interna, la inclusión de un viscosizante de fase externa (hidroxipropilmetil celulosa (HPMC)) o el incremento de presión osmótica en una fase externa viscosa (HPMC + una sal (NaCl)). De acuerdo con los datos obtenidos en la caracterización de todas las formulaciones elaboradas, la formulación optimizada correspondió a las MSs elaboradas con un 25% de etanol en la fase interna y una fase externa viscosa. Gracias a esta combinación se consiguió disminuir la liberación inicial del producto biotecnológico (GDNF) y una mayor encapsulación de la molécula de

bajo peso molecular (TUDCA). Además, fueron capaces de liberar conjuntamente de forma homogénea y controlada ambas sustancias activas a largo plazo (91 días). Dado que uno de los objetivos principales del desarrollo de sistemas de cesión controlada para el tratamiento de enfermedades crónicas consiste en la obtención de formulaciones capaces de encapsular de forma significativa sustancias activas, así como de ejercer un control en su liberación, las MSs de carga múltiple optimizadas en este tercer trabajo se presentan como una interesante opción terapéutica para el tratamiento de distintas patologías retinianas.

SUMMARY

“CO-DELIVERY OF NEUROPROTECTIVE AGENTS FROM BIODEGRADABLE MICROPARTICULATE SYSTEMS. POTENTIAL USE FOR THE TREATMENT OF RETINAL AND OPTIC NERVE DEGENERATIVE DISEASES”

Degenerative pathologies affecting optic nerve and retina are characterized by gradual degeneration of neuronal tissue and significantly compromise the vision. Generally, eye diseases of the posterior segment are chronic leading to progressive damage to the optic nerve and loss of retinal ganglion cells (RGCs), photoreceptors and other retinal cells in a process called neurodegeneration. Several mechanisms have been implicated in the pathogenesis of neurodegeneration, such as oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction. Moreover, these events can interact and compound, underlying the complexity and multifactorial aetiology of these ocular pathologies. New therapeutic strategies for the treatment of these conditions are being sought. One such approach is neuroprotection which is defined as a “therapeutic approach” aiming to directly prevent, hinder and, in some cases, reverse neuronal cell damage. Attributed to the potential synergistic activities of drugs with different mechanisms of action, neuroprotective strategies based on a multi-modal approach are currently receiving considerable attention. This therapeutic tool is known as combination therapy or combined therapy.

Several molecules, implicated in different mechanisms of actions, have demonstrated the ability to promote the survival of damaged RGCs and photoreceptors. Among them, Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (neurotrophic agents), dexamethasone (inflammatory modulator), melatonin (antioxidant), coenzyme Q10 (regulator of mitochondrial bioenergetics) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) (antiapoptotic agent).

Successful treatments of vitreoretinal diseases require effective concentrations of the active substance maintained during long periods in the target site. Therefore, it is necessary to use direct administration routes such as intravitreal administration, which allows the deposit of active agents near to the target tissue. A significant limitation of this administration route is the need for

SUMMARY

repeated injections, which are associated with rare but serious side effects (including retinal detachment, cataracts or endophthalmitis). Thus, therapies based on intraocular drug delivery systems (IODDS) offer an excellent therapeutic alternative. IODDS are capable of providing effective therapeutic concentrations of the active substances maintained during a long period of time in the intraocular target site. Furthermore, if the developed systems are biodegradable, they will remove themselves from the administration site over time, so avoiding the need for surgical removal. Among the different IODDS, biodegradable microspheres (MSs) have recently gained considerable attention for ocular applications. MS are administered intravitreally as a suspension, where they progressively release therapeutic concentrations of drugs to target retinal tissues before degradation. For these reasons, microparticles based on polymeric matrices (microspheres) were selected as the subject of this PhD Thesis.

The overall aim of this research study is focused on the design and characterisation of several formulations of combination therapy based on microspheres (MSs) of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA), a biocompatible and biodegradable polymer. The microspheres have been loaded with different neuroprotectants for use as an IODDS to the treatment of neurodegenerative posterior segment eye diseases and, more specifically, as a new therapeutic approach based on neuroprotective combination therapy.

To obtain the multi-loaded microsystems, the oil-in-water (O/A) emulsion solvent-extraction evaporation technique was employed. In those microsystems loaded with protein active substances, such as GDNF or BDNF, an oily additive (vitamin E) was included to incorporate them in a solid-states promoting the maintenance of the structural integrity (solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion solvent evaporation technique).

Advanced stages of age-related macular degeneration (AMD), regardless of the advanced form of the disease (choroidal neovascularization (CNV) or geographic atrophy), can lead to the development of focal choroidal atrophy and RPE loss. Thus, the development of adjuvant therapies against those currently existing for advanced AMD is very interesting. As the **first objective** of this PhD Thesis, it was proposed the *in vitro* evaluation of the effect of GDNF or GDNF/BDNF microspheres on cell migration and angiogenesis. Two

different cell types were used: ARPE-19 (*human retinal pigment epithelial cells*) for cell migration and RF/6A cells (*primary primate endothelial choroidal cell line*) for angiogenesis assessment. In this work, both the monotherapy formulation (GDNF loaded-MSs (MSs-GE)) and the combination therapy (GDNF/BDNF loaded-MSs (MSs-GBE)) were able to *in vitro* release the active agents in a controlled manner for 77 days. Neither MSs-GE nor MSs-GBE groups showed any sign of toxicity in ARPE-19 and RF/6A cells. Efficiency studies in terms of cell migration showed that the formulation of microspheres loaded with the GDNF/BDNF combination significantly increased ($p < 0.01$) migration of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19). Regarding angiogenesis, it was not found any statistical significance between groups of study in RF/6A endothelial cells. This work suggests a beneficial role of a combination of neurotrophic factors (BDNF/GDNF) since the GDNF-loaded formulation of monotherapy was not able to promote RPE migration improvement. Thus, the developed multi-loaded formulation is described as an interesting therapeutic tool for RPE repair, presenting itself as a possible adjuvant of antiangiogenic therapy in AMD.

When developing microparticulate controlled release systems for the treatment of chronic pathologies, such as ophthalmic neurodegenerative diseases of the posterior segment of the eye, tolerance to these devices is a critical issue that may compromise therapeutic efficacy, the use of multi-loaded microparticulate systems not only enables the co-administration of several active agents, but also the reduction of polymeric biomaterial administered. Therefore, as the **second objective** of this PhD Thesis we sought to evaluate the neuroprotective effect of multi-loaded microspheres incorporating three neuroprotective agents (dexamethasone, melatonin and coenzyme Q10). Moreover, a comparison was made between the new formulation developed and an equivalent physical mixture (in doses of active substances) of the single drug loaded MSs on RGC survival using a rodent model of ocular hypertension. Intravitreal administration of the multi-loaded formulation was found to significantly ($p < 0.05$) promote the RGCs survival compared to administration of the physical mixture of single drug loaded and the empty MSs. Furthermore, the amount of polymer administered with the physical mixture of MSs was almost three-fold higher than that in the multi-loaded particles, which may contribute to retinal toxicity leading to the absence of therapeutic effect. Therefore, it could be concluded that the co-incorporation of different drugs into a single microcarrier

SUMMARY

allows improving the tolerance of the microparticulate systems at the retina, presenting as a promising neuroprotective strategy for the treatment of multifactorial retinal diseases such as glaucoma.

Finally, as the **third objective** of the PhD Thesis the elaboration and optimization of a microparticle formulation of combination therapy for the simultaneous release of two active compounds of different nature and physical entity, a biotechnological product (GDNF) and a low weight compound (TUDCA) was proposed. From the pharmacological standpoint, GDNF acts as a neurotrophic factor and TUDCA acts as an antiapoptotic agent. To obtain the optimized formulation, different technological strategies were used in the microencapsulation process: different proportions of a polar co-solvent (ethanol) into the inner phase, the use of a viscosity enhancer in the external phase (hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)) or the increase of osmotic pressure in a viscous external phase (HPMC + a salt (NaCl)). According to the data obtained in the microparticles' characterizations, the optimized formulation corresponded to the MSs elaborated with 25% ethanol in the internal phase and a viscous external phase. Thanks to this combination, it was possible to decrease the initial release of the biotechnological product (GDNF) and a higher encapsulation of the low molecular weight molecule (TUDCA). Furthermore, they were able to homogeneously co-release both active substances in a controlled manner for an extended period of time (91 days). Given that one of the main aims in the development of controlled drug delivery systems for the treatment of chronic diseases consists in obtaining formulations capable of significantly encapsulating active substances as well as exerting control in their releases, the optimized multi-loaded MSs optimized in this third work is presented as an interesting therapeutic option for the treatment of different retinal pathologies.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ANATOMOFISIOLOGÍA OCULAR

El ojo o globo ocular es la estructura anatómica que hace posible el inicio del complejo proceso de la visión. Su función consiste en transformar la energía lumínica del espectro visible (rango de longitudes de onda de 400 a 700 nm) en impulsos electroquímicos, que son enviados al cerebro a través del nervio óptico.

Se trata de un órgano par situado a ambos lados del plano sagital, protegido por grasa, tejidos blandos y por las paredes óseas que componen las cavidades orbitales. En ellas además se alojan el nervio óptico, los músculos oculares, las glándulas lagrimales, vasos y nervios. Las partes aledañas al ojo compuestas por los párpados, las pestañas y las cejas, cumplen funciones protectoras del ojo (Bueno 1994).

Estructuralmente está constituido por (Derrickson 2013) (Figura 1):

- Tres túnicas o capas concéntricas, formadas de fuera hacia dentro por: la *túnica fibrosa*, la *túnica vascular* y la *túnica nerviosa*.
- Tres medios transparentes, conformados de la zona más externa a la más interna por: el *humor acuoso*, el *crystalino*, y el *cuerpo vítreo*.

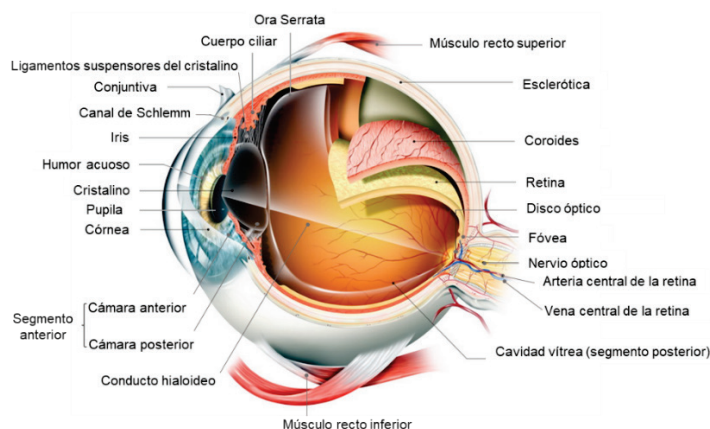


Figura 1. Anatomía del globo ocular. Corte sagital con las distintas estructuras del ojo [Fuente: Sobotta atlas of human anatomy. Elsevier].

1.1. Capas del globo ocular

Capa Fibrosa o córneo-escleral

Capa más externa, avascular y de naturaleza gruesa y resistente. Se compone de dos porciones: una anterior, *córnea* y una posterior, *esclerótica*. La zona de transición entre la córnea y la esclerótica se conoce como *limbo*. Revistiendo los párpados por su cara posterior y el globo ocular por su parte anterior está la *conjuntiva*, membrana en la que se vierte la secreción lagrimal.

La córnea es una estructura transparente, compuesta a su vez por cinco capas, que permite la entrada de luz al ojo. Es la parte más importante de refracción del ojo, y se alimenta por el humor acuoso y los vasos periféricos. Por el contrario, la esclera es opaca y blanca, está compuesta de tejido conectivo resistente y cubre los cuatro quintos de la superficie del globo ocular con un orificio anterior para la córnea y otro posterior para el *nervio óptico*.

Capa vascular o úvea

Capa media del ojo, es una membrana de color oscuro la cual se divide en tres zonas: anterior o *iris*, media o *zona ciliar* y posterior o *coroides*.

El iris es una membrana coloreada y circular con una abertura central llamada *pupila* a través de la cual se distingue el interior del globo ocular. El iris se suelda a la coroides por medio de un robusto anillo muscular constituido por fibras: circulares (músculo ciliar) y radiales (a través de los procesos ciliares). Actúa como un verdadero diafragma regulando la cantidad de luz que entra al ojo mediante su contracción o dilatación.

Detrás del iris se encuentra el *crystalino*, una estructura biconvexa y transparente que ofrece poder de refracción y acomodación. En la base del iris se encuentra una región especializada llamada *cuerpo ciliar* que produce el humor acuoso, encargado de proporcionar nutrientes a las zonas anteriores avasculares como la córnea y el cristalino. Además, este conjunto de músculos que conforman el cuerpo ciliar realiza la acomodación del cristalino permitiendo el enfoque correcto de los objetos.

Finalmente, la coroides, revestimiento que se extiende desde el extremo de los músculos ciliares hasta el nervio óptico, es una membrana profusamente irrigada por vasos sanguíneos y tejido conectivo. Su principal función radica en suministrar oxígeno y nutrientes a las partes internas del ojo. Situada en la zona más interna de esta túnica se encuentra la lámina basal de la coroides o *membrana de Bruch*, la cual separa la coroides del epitelio pigmentario de la retina (EPR).

Capa nerviosa

Se trata de la capa más interna del ojo cuya extensión abarca desde la cara posterior de la zona iridociliar hasta la cabeza del nervio óptico. Estructuralmente en la túnica nerviosa se diferencian dos regiones: el tercio anterior u *ora serrata* y los dos tercios posteriores o *retina neural*. La retina neural está adaptada para transformar la información lumínica en impulsos nerviosos, que son transportados al cerebro a través del nervio óptico. En la parte anterior u *ora serrata*, la túnica nerviosa se adelgaza y degenera perdiendo sus características de membrana sensorial (Richard L. Drake 2015).

1.2. Segmentos y cámaras del globo ocular

El cristalino y sus ligamentos suspensorios dividen el ojo en dos segmentos, el *segmento anterior*, por delante de la lente, y el *segmento posterior* detrás de ésta. A su vez, se pueden diferenciar de la lente tres cámaras: la *anterior*, la *posterior* y la *vítrea* (Hall 2011).

1. El segmento anterior: está parcialmente dividido en la *cámara anterior* (entre la córnea y el iris) y la *cámara posterior* (entre el iris y el cristalino). Este segmento, se encuentra bañado por un fluido transparente con una composición parecida al plasma sanguíneo denominado *humor acuoso*. El humor acuoso se produce en los procesos ciliares del cuerpo ciliar (ubicado en la cámara posterior) y circula a través de la abertura de la pupila a la cámara anterior. El humor acuoso se drena del ojo por tres vías. La vía trabecular (eliminación convencional) se encarga aproximadamente del drenaje del 90% del humor acuoso, atravesando la *malla trabecular* y el *canal de Schlemm* antes de drenar

a los sistemas venosos de la esclerótica, la epiesclerótica y la conjuntiva. La vía uveoescleral (no convencional) se ocupa del drenaje del 10% del humor acuoso restante, sale a través de la raíz del iris hacia el espacio subaracnoideo. Una pequeña cantidad también drena a través del iris. En condiciones no patológicas, el humor acuoso se produce y se drena al mismo ritmo, manteniendo una presión interna en el ojo de unos 15 - 16 mmHg que ayuda a sostener la forma apropiada del globo ocular. Además, suministra oxígeno y nutrientes al cristalino y la córnea, y retira los desechos del metabolismo.

2. El segmento o cavidad posterior: alberga la *cámara vítrea* (comprendida entre el cristalino y la retina). Se encuentra bañada por el *humor vítreo*, un gel transparente y avascular, el cual (i) transmite la luz, (ii) soporta la superficie posterior del cristalino, (iii) sostiene la capa neural de la retina, y (iv) contribuye a mantener una presión interna dentro del globo ocular que permite soportar las cargas de aplastamiento que se producen cuando funcionan los músculos extrínsecos.

1.3. Retina

La *retina* es una estructura altamente especializada encargada de recibir los estímulos lumínicos y transformarlos en estímulos nerviosos que serán finalmente interpretados en el cerebro. Macroscópicamente, se distinguen varias estructuras según se localicen en la parte central o periférica de la retina:

En el área central de la retina se encuentran la *mácula lútea*, la *fóvea central* y el *disco o papila óptica*. La zona anatómica más importante es la mácula lútea, de aspecto amarillento por su elevado contenido en pigmentos xantofílicos, se encuentra localizada en el polo posterior del eje óptico del globo ocular. En el centro de la misma, se encuentra una pequeña depresión, la fóvea central, considerada el centro óptico. A unos 3 mm hacia el lado interno del polo posterior del ojo, se encuentra la cabeza del nervio óptico (disco o papila óptica), zona constituida por fibras nerviosas sin poder visual, motivo por el cual se le llama también *punto ciego*. En el área periférica de la retina destaca la ora serrata, que conecta ésta con el cuerpo ciliar.

Los *fotorreceptores* son neuronas especializadas encargadas de la transducción de la energía luminosa en energía eléctrica. En la retina periférica los fotorreceptores predominantes son los *bastones*. La mácula lútea está constituida principalmente por el otro tipo de fotorreceptores, denominados *conos*. Los *conos* son células sensibles a la luz intensa y su riqueza en pigmentos fotosensibles les confiere la capacidad de discriminar los colores. Los *bastones* están dotados de un pigmento que les permite generar sensación visual en condiciones de baja iluminación y en la oscuridad. Si bien no pueden percibir los colores, están muy capacitados para percibir movimientos de los objetos dentro del espacio que puede ser captado por el ojo estático (denominado campo visual) en el que se originan dichos estímulos visuales. Por lo tanto, a los *conos* les concierne la agudeza visual y la discriminación del color con iluminación de gran intensidad, y a los *bastones* corresponde la visión con iluminación escasa (Figura 2).

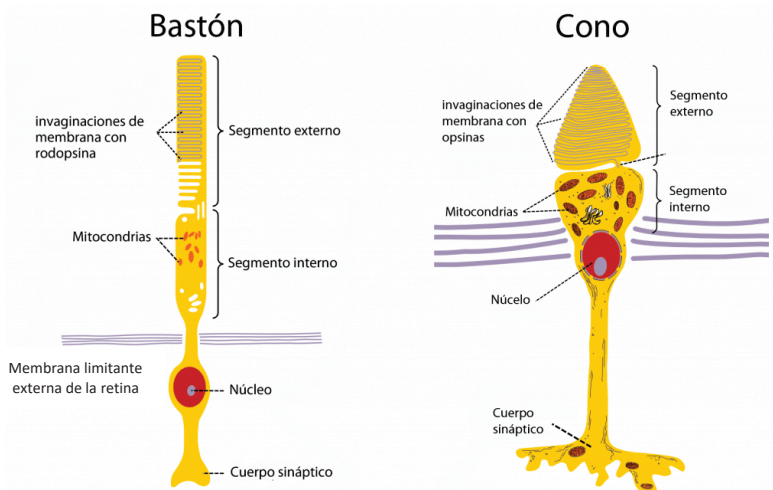


Figura 2. Estructura de las células fotorreceptoras: conos y bastones. Ilustración adaptada de [<https://curiosoando.com/conos-bastones-y-iprgcs-los-fotorreceptores-del-ojo-humano>]

La retina se nutre a través de un doble sistema de irrigación. Por un lado, los vasos de la coroides se encargan de nutrir y oxigenar el tercio exterior de la retina. Por otro lado, las dos terceras partes internas lo hacen a través de la *arteria retiniana central* y la *vena retiniana central*, las cuales tienen entrada y salida del globo ocular por el centro del nervio óptico y se divide radialmente produciendo una copiosa red vascular. Los capilares retinianos se detienen

alrededor de la fovea central en un área de unos 0,5 mm denominada zona avascular foveal, punto de máxima discriminación visual (Figura 3).

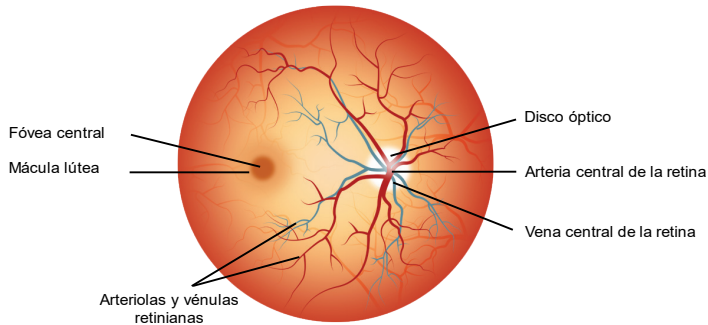


Figura 3. Fondo de ojo.

Microscópicamente, la retina está compuesta por numerosos tipos celulares y una disposición anatómica en diez estratos o capas. Desde la capa más externa a la más interna se encuentran (Figura 4):

- Epitelio pigmentario de la retina (EPR)
- Capa de segmentos externos de los fotorreceptores (CSE)
- Membrana limitante externa (MLE)
- Capa nuclear externa (CNE)
- Capa plexiforme externa (CPE)
- Capa nuclear interna (CNI)
- Capa plexiforme interna (CPI)
- Capa de células ganglionares (CCG)
- Capa de fibras nerviosas
- Membrana limitante interna (MLI)

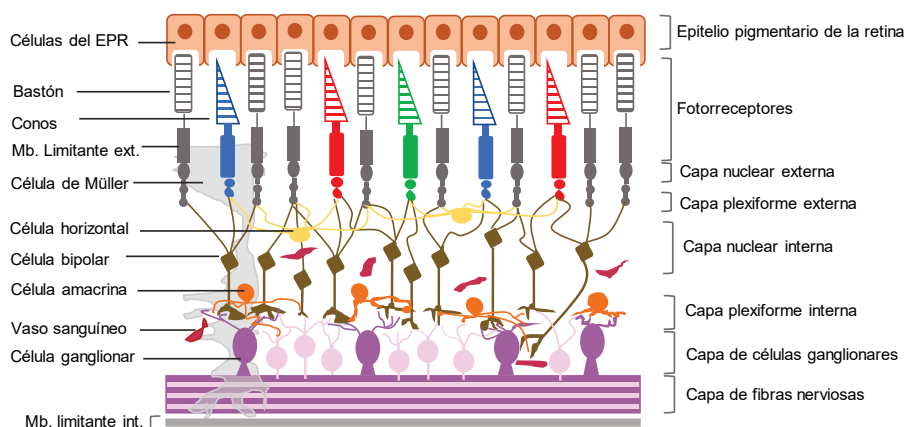


Figura 4. Organización celular de la retina.

La capa más externa (adyacente a la coroides) es el *epitelio pigmentario de la retina (EPR)*, una monocapa de células pigmentadas que como se ha comentado anteriormente limita por su parte externa con la membrana de Bruch. Si bien, esta capa no forma parte de la neuroretina es imprescindible para su correcto funcionamiento. Su límite interno se interdigita con los segmentos externos de los *fotorreceptores (CSE)*, que engloba los elementos de los fotorreceptores sensibles a la luz. La *membrana limitante externa (MLE)*, situada entre los segmentos externos y los núcleos de los fotorreceptores, está compuesta por uniones intercelulares entre las células de Müller y los fotorreceptores. La *capa nuclear externa (CNE)* contiene los núcleos celulares de los fotorreceptores. En la *capa plexiforme externa (CPE)* se produce el contacto entre los axones de los fotorreceptores con las dendritas de las células bipolares y horizontales. A continuación, se encuentra la *capa nuclear interna (CNI)* que contiene los cuerpos celulares de las células bipolares, amacrinas, horizontales y de las células de Müller. Le sigue la *capa plexiforme interna (CPI)* donde contactan los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares y amacrinas. Más internamente se continúa con la *capa de células ganglionares (CCG)* donde se localizan las células ganglionares. Finalmente, la *membrana limitante interna (MLI)* situada entre la retina y el humor vítreo, está compuesta por una lámina basal y las terminaciones de las células de Müller que se prolongan verticalmente a lo largo de las capas de la retina.

Las señales lumínicas son captadas y transducidas a estímulos

nerviosos por los fotorreceptores, cuyas terminaciones conectan con las células bipolares y estas, a su vez, con las células ganglionares de la retina, cuyos axones forman el nervio óptico, conduciendo el estímulo visual hacia el cerebro. Además, formando parte de este complejo entramado celular, se encuentran las células amacrinas y horizontales, encargadas de actuar como interneuronas moduladoras; así como la glía de Müller y los astrocitos, con funciones de soporte, nutrición e inmunidad (Netter 2015).

1.4. Anexos del globo ocular

Ente los anexos del globo ocular, se encuentran la *cápsula de Tenon* y la *conjuntiva*. La cápsula de Tenon es una cubierta de tejido conectivo, formado por fibras de colágeno dispuestas de manera compacta y algunos fibroblastos. Las conexiones entre la cápsula de Tenon y los tejidos periorbitarios ayudan a sostener el globo ocular en la órbita. La conjuntiva es una membrana mucosa delgada y trasparente que favorece la hidratación y lubricación de la superficie ocular. También sirve como defensa frente a patógenos. Puede dividirse en tres zonas geográficas: palpebral (recubre la superficie interna del párpado), de los fondos de saco y bulbar (recubre la esclera).

Por otro lado, 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. Existen cuatro músculos rectos: superior, inferior, medio y lateral y dos músculos oblicuos: superior e inferior (Figura 5). 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.

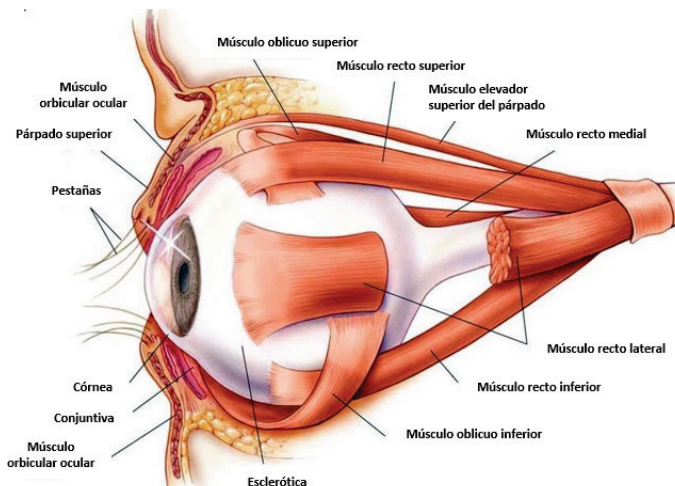


Figura 5. Músculos extraoculares. Ilustración adaptada de [<http://geoface.info/acbb/e5578a96c12a/sense-of-vision-accessory-organs-of-the-eye-67519d>].

2. PATOLOGÍAS DEGENERATIVAS QUE AFECTAN AL SEGMENTO POSTERIOR DEL OJO

La creciente prevalencia mundial de las patologías oftálmicas que afectan al segmento posterior del ojo ha generado un gran número de investigaciones, ya que se trata de enfermedades con necesidades médicas no cubiertas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2010 padecían discapacidad visual 285 millones de personas, de las cuales 39 millones eran ciegos.

Dentro de las patologías que afectan a la retina y estructuras adyacentes causando discapacidad visual se encuentran: la degeneración macular asociada a la edad, el glaucoma, la retinopatía diabética, la retinosis pigmentaria y la neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL).

2.1. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)

La degeneración macular cursa con lesiones degenerativas y progresivas del área de la retina responsable de la visión central y aguda (mácula) (Figura 6), dificultándose así procesos como la lectura o la visualización de detalles finos (Miller, Bagheri, and Vavvas 2017). Esta enfermedad afecta principalmente a la población de más de 55 años, razón por lo cual recibe el nombre de degeneración macular asociada a la edad (DMAE). En la actualidad, representa la principal causa de ceguera en el mundo desarrollado. Además, se estima como una de las patologías de mayor prevalencia en los próximos años debido al aumento en la esperanza de vida de la población (Taylor et al. 2016).

La DMAE es una enfermedad multifactorial, que resulta de una combinación de predisposición genética y factores de riesgo asociados como son el sexo femenino, la raza blanca, el tabaquismo, la baja ingesta de carotenoides, una mayor exposición a la luz solar y las enfermedades cardiovasculares. Su naturaleza, unida al complejo proceso de la visión y el aún no bien establecido mecanismo de envejecimiento, hacen de la DMAE una enfermedad en la que un rápido diagnóstico es vital (Pennington and DeAngelis 2016).

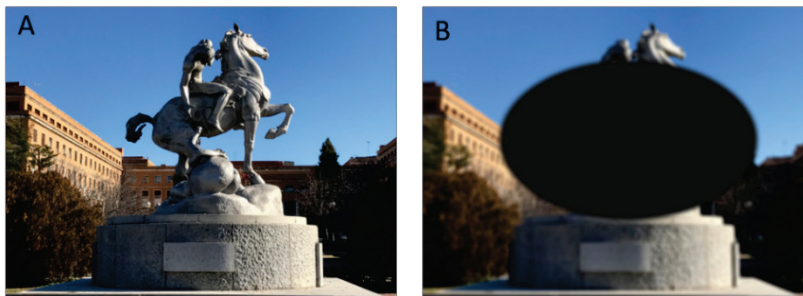


Figura 6. Visión normal (A) y visión de un paciente con DMAE (B). Imagen tomada del trabajo de revisión titulado: *Microspheres as intraocular therapeutic tools in chronic diseases of the optic nerve and retina* (Bravo-Osuna et al. 2018).

La enfermedad cursa con alteraciones en los capilares coroideos que irrigan la mácula, desencadenándose una neurodegeneración tardía del complejo que involucra los fotorreceptores retinianos, el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la membrana de Bruch. Las células del EPR juegan un papel central en

la patogénesis de la DMAE. Estas células son las responsables de la generación y mantenimiento de la matriz extracelular, la matriz de fotorreceptores y la membrana de Bruch, así como del transporte de iones y fluidos entre los fotorreceptores y la membrana coroidea, y de la fagocitosis en el segmento externo de los fotorreceptores. Por ello, la desregulación de estas células provoca el acúmulo de lípidos y proteínas en la zona de la membrana de Bruch. Estos acúmulos grandes y numerosos de material blanco-amarillento se denominan «drusas» (Lambert et al. 2016; Seddon 2017).

Pueden diferenciarse dos subgrupos de esta enfermedad: DMAE atrófica o seca y DMAE húmeda o exudativa.

- DMAE atrófica o seca: es la forma más frecuente de la enfermedad (90% de los casos). La progresión de la enfermedad es lenta, por lo que inicialmente puede ser asintomática, diagnosticándose gracias a controles oftalmológicos rutinarios. El adelgazamiento y la fragilidad de los vasos sanguíneos situados bajo la mácula originan una degeneración progresiva de las células de la mácula. La presencia de engrosamientos localizados (drusas) que se acumulan por debajo de la retina diferencia tres etapas de la enfermedad:
 - Degeneración macular temprana: aparecen drusas pequeñas o algunas medianas, se caracteriza por ser asintomática y sin pérdida de visión.
 - Degeneración macular intermedia: se produce acúmulo elevado de drusas de tamaño mediano, y/o diversas drusas grandes. En esta etapa puede comenzar a apreciarse un punto borroso en el centro de la visión.
 - Degeneración avanzada: existen abundantes drusas junto con deterioro de las células sensibles a la luz y del tejido de apoyo en el área central de la retina. Además aparece en la visión central un punto borroso que con el tiempo puede agrandarse y oscurecerse haciendo cada vez más opaca la visión central (Boyer et al. 2017).
- DMAE húmeda o exudativa: es la forma menos frecuente de la enfermedad (10% de los casos). Esta forma de DMAE cursa con la formación de vasos sanguíneos anormales (neovascularización) debajo

de la mácula (por encima o por debajo de la membrana de Bruch). Estos neovasos tienden a ser muy frágiles, produciendo exudados de sangre y líquido capaces de elevar la mácula por encima de su posición normal. La progresión de la enfermedad es muy rápida con una pérdida acelerada de la visión central. La DMAE húmeda se considera una forma avanzada de la degeneración macular siendo sustancialmente más severa que la forma seca. En esta forma de la enfermedad uno de los primeros signos en la visión es la ondulación de las líneas rectas (Agarwal et al. 2015).

La DMAE no exudativa se trata principalmente con suplementación dietética y cambios en los hábitos de vida como medidas preventivas contra la conversión a DMAE exudativa. No obstante, el avance en el conocimiento de los eventos moleculares con los que cursa la patología ha supuesto el impulso de nuevas terapias encaminadas a limitar y atenuar el avance de esta enfermedad (Carneiro and Andrade 2017). De hecho, se están investigando alternativas quirúrgicas, así como nuevas moléculas con potencial terapéutico, como es el caso del 4-hidroxi (fenil) retinamida, un retinoide sintético que se une fuertemente al exceso de vitamina A, inhibiendo la producción de metabolitos tóxicos en las células del EPR.

Dentro de los principales tratamientos frente a la DMAE exudativa se encuentra la fotocoagulación láser, la terapia fotodinámica, la cirugía macular y la terapia farmacológica anti-angiogénica. La fotocoagulación con láser de argón es beneficiosa exclusivamente para pacientes con neovascularización extrafoveal, la cual afecta sólo a un 5% de todos los enfermos. Este tratamiento produce una lesión a lo largo de todas las capas de la retina y se manifiesta clínicamente con defectos visuales. Por ellos, el uso de este tipo de terapia se encuentra restringido al área extrafoveal. Respecto a la terapia fotodinámica, en el año 2000 la United States Food and Drugs Administration (FDA) aprobó el uso de verteporfina (Visudyne®) para el tratamiento de la neovascularización coroidea. Este tratamiento consta de 2 fases, la primera consiste en la administración vía intravenosa del fármaco fotosensible (verteporfina), para posteriormente activarlo mediante luz de longitud de onda específica empleando un láser de diodo (Verteporfin Roundtable 2005).

La terapia anti-angiogénica es el tratamiento más utilizado para la DMAE exudativa. Esta terapia está destinada no solo a enlentecer la progresión de la enfermedad, sino también a mejorar la agudeza visual. Se sabe que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) actúa selectivamente favoreciendo el crecimiento de las células endoteliales, especialmente en respuesta a extravasaciones vasculares. De forma que la sobreexpresión de VEGF desencadena procesos de neovascularización. Entre 2004 y 2006, surgieron tres principales agentes anti-VEGF: pegaptanib sódico (Macugen®), ranibizumab (Lucentis®) y bevacizumab (Avastin®). El pegaptanib es un oligonucleótido modificado y pegilado que se une con una alta especificidad y afinidad al VEGF, inhibiendo su actividad. No obstante, sólo presenta inhibición para la isoforma VEGF 165. Si bien esta es la isoforma que está implicada de forma preferencial en la neovascularización ocular patológica, otras isoformas también contribuyen. Ranibizumab fue aprobado por la FDA en 2006 y por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en enero de 2007. Este fármaco es un pequeño fragmento de un anticuerpo monoclonal (fragmento Fab) que se une selectivamente a la isoforma VEGF-A, una sustancia denominada factor A de crecimiento endotelial vascular. Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado selectivo frente a VEGF-A, aprobado por la FDA en 2006 para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Dado su menor coste se emplea de manera “off-label” para el manejo de la DMAE exudativa, aunque hasta el momento no ha sido aprobado por la FDA ni por la EMA para el tratamiento de esta patología (Schmid et al. 2015; Bakall et al. 2013; Yazdi et al. 2015). En 2011 la FDA aprobó un nuevo anti-VEGF denominado aflibercept (Eylea®). Se trata de una proteína de fusión recombinante soluble, conocida como un “multiple angiogenic factor trap”, ya que es capaz de unirse a VEGF-A, VEGF-B, y al factor de crecimiento placentario (PlGF) (Sarwar et al. 2016).

En los últimos años han surgido nuevas moléculas anti-VEGF. Entre ellas se encuentran: el conbercept, el brolucizumab y el OPT-302. El conbercept (KH902) es una proteína de fusión recombinante con alta afinidad a todas las isoformas de VEGF y al PlGF, desarrollado y aprobado en China en 2013 para el tratamiento de la DMAE húmeda (Liu et al. 2018). El brolucizumab (RTH258) es una cadena simple del fragmento variable de un anticuerpo monoclonal humano frente al VEGF-A. En 2017, se llevaron a cabo dos estudios clínicos de

fase III (HAWK (NCT02307682) y HARRIER (NCT02434328)) que compararon la eficacia y la seguridad de inyecciones intravítreas de brolocizumab *versus* a aflibercept en pacientes con DMAE neovascular. En ellos, se demostró una duración del efecto prometedora y una eficacia similar al aflibercept (Kaplon and Reichert 2018). El agente OPT-302 (desarrollado por la compañía Opthea) es una forma soluble del receptor 3 del VEGF (VEGFR-3). Actúa capturando y, por lo tanto, bloqueando la actividad de las isoformas VEGF-C y VEGF-D. También se ha observado que puede reducir la expresión de genes implicados en el crecimiento de vasos sanguíneos y en la inflamación. En un modelo de ratón de DMAE húmeda, se ha demostrado que OPT-302 puede reducir el desarrollo de lesiones e inhibir procesos de extravasación en un grado comparable al aflibercept. Además, su administración conjunta en el mismo modelo conllevó un beneficio aditivo respecto a su empleo en monoterapia, con una inhibición más efectiva de las lesiones (Lashkari 9 May 2013, 6 May 2014). En la actualidad, existen dos ensayos clínicos en marcha en pacientes con DMAE húmeda. Un ensayo de fase 1/2 A (NCT03397264) sobre la terapia combinada basada en OPT-302 + aflibercept frente a la monoterapia con aflibercept (<https://clinicaltrials.gov>). Y un estudio de fase 2 (NCT03345082) para la evaluación de la administración combinada de OPT-302 + ranibizumab respecto al ranibizumab en monoterapia (<https://clinicaltrials.gov>).

Actualmente 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 (Li et al. 2017).

2.2. Glaucoma

El glaucoma engloba un grupo de neuropatías ópticas degenerativas caracterizadas por una pérdida progresiva de las células ganglionares de la retina (CGR), produciéndose una excavación de la papila óptica y un adelgazamiento del borde neuroretiniano. Este daño se inicia en la zona periférica y avanza hacia la zona central, llevando finalmente a la pérdida irreversible de la visión. El glaucoma representa la segunda causa de ceguera

en el mundo, según la Organización Mundial de la Salud (Mantravadi and Vadhar 2015).

Uno de los factores de riesgo más relevantes asociados al glaucoma es el aumento de la presión intraocular (PIO). Esta elevación de la PIO compromete el suministro sanguíneo de la retina, provocando una degeneración neuronal de las CGR y desencadenando finalmente la atrofia del nervio óptico. Este aumento de la presión sobre el tejido conectivo de la cabeza del nervio óptico interrumpe el flujo axo-plasmático, bloqueando la llegada de factores neurotróficos endógenos (proteínas especializadas en funciones de supervivencia, migración y diferenciación celular) al cuerpo neuronal desde su base axonal. No obstante, se ha comprobado que ni todos los pacientes con PIO elevada padecen glaucoma, ni la disminución de esta, asegura la protección frente a la progresión de la enfermedad (Cohen and Pasquale 2014) (Figura 7).

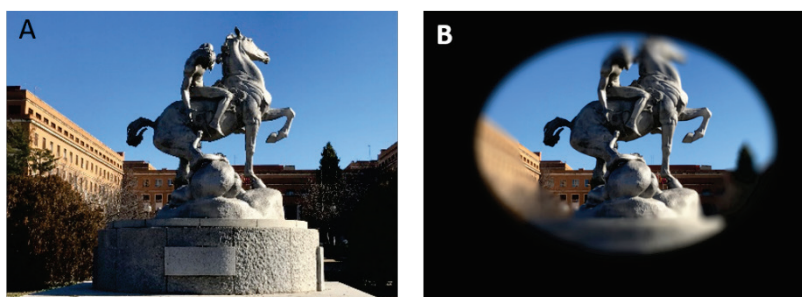


Figura 7. Visión normal (A) y visión de un paciente con Glaucoma (B). Imagen tomada del trabajo de revisión titulado: *Microspheres as intraocular therapeutic tools in chronic diseases of the optic nerve and retina* (Bravo-Osuna et al. 2018).

El complejo proceso de la neurodegeneración puede describirse, de forma cronológica, en tres pasos: (i) daño axonal primario; (ii) muerte de la neurona dañada, y (iii) daño y posterior muerte de neuronas adyacentes, en lo que se denomina “degeneración secundaria”. Esta degeneración secundaria tiene lugar en neuronas inicialmente no dañadas, pero que acaban muriendo por exposición a agentes citotóxicos liberados por la muerte de las neuronas con daño axonal primario (Weinreb, Aung, and Medeiros 2014).

Si bien no se conoce en su totalidad la patogénesis de esta enfermedad, se ha demostrado que la muerte de las CGR que conforman el nervio óptico

tiene lugar tras diferentes eventos que desembocan en la activación de procesos de apoptosis. Entre los principales mecanismos desencadenantes del proceso de apoptosis se encuentran: (i) la excitotoxicidad inducida por glutamato, (ii) los eventos isquémicos, (iii) el estrés oxidativo, (iv) la privación de factores neurotróficos, (v) el plegamiento incorrecto de proteínas, (vi) la disfunción mitocondrial, (vii) la inflamación, o (viii) la activación de la glía (Baltmr et al. 2010).

Existen diferentes tipos de glaucomas:

- Glaucoma de ángulo abierto (primario o crónico): es la forma más común de la enfermedad y cursa de manera pausada y progresiva. Se produce debido a la obstrucción lenta de los canales de drenaje, conllevando así a un incremento en la PIO. Presenta un ángulo amplio y abierto entre el iris y la córnea (Junemann et al. 2018). Cuando este tipo de glaucoma afecta a niños, adolescentes y jóvenes adultos puede denominarse como glaucoma juvenil (Park et al. 2017).
- Glaucoma de ángulo cerrado (agudo o de ángulo estrecho): es una forma menos frecuente de glaucoma, su desarrollo es rápido. Es provocado por el bloqueo repentino de los canales de drenaje, lo cual produce un rápido aumento de la presión intraocular. Presenta un ángulo cerrado y estrecho entre el iris y la córnea (Patel and Patel 2014).
- Glaucoma congénito: este tipo de glaucoma se presenta en recién nacidos cuando existe un desarrollo incorrecto o incompleto de los canales de drenaje del ojo durante el período prenatal. Como consecuencia, se produce un incremento de la presión intraocular derivando en un daño al nervio óptico.
- Glaucoma secundario: esta forma de la enfermedad puede ser de ángulo abierto o cerrado, siendo el resultado de alguna otra condición médica en el ojo o en el organismo. Entre otros estaría: glaucoma pigmentario (los gránulos de pigmento del iris se escaman dentro del humor acuoso y obstruyen la malla trabecular), síndrome de pseudoexfoliación (las capas exteriores del cristalino se descaman y bloquean el flujo normal del humor acuoso), síndrome iridocorneal

endotelial (grupo de endotelipatías proliferativas corneales progresivas que se caracterizan por agujeros en el iris y atrofia, distorsión papilar, sinequia anterior, edema corneal además de complicaciones como glaucoma secundario y descompensación corneal) (Barac et al. 2015).

- **Glaucoma Neovascular:** se produce cuando el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos del ojo bloquea los canales de drenaje del líquido generando un aumento de la presión ocular. Este crecimiento anormal puede ser causado cuando el suministro de sangre en los ojos es escaso debido a distintas causas (diabetes, bloqueo de las arterias en el cuello, o de los vasos sanguíneos en la parte posterior del ojo) (Konareva-Kostianeva 2005).
- **Glaucoma de tensión normal o de baja tensión:** en esta forma de glaucoma el nervio óptico se ve dañado a pesar de que la presión ocular permanece normal. Actualmente se desconoce la causa de este tipo de glaucoma (Mi, Yuan, and So 2014).

El tratamiento del glaucoma de ángulo cerrado depende del estadio de la enfermedad y de la correcta identificación de los mecanismos implicados. La línea principal de tratamiento es la iridotomía periférica con láser, un procedimiento mediante el cual se produce un pequeño orificio (0,5 a 1 mm de diámetro) en la periferia del iris para evitar que se abombe y ocluya la malla trabecular. Si la PIO continúa elevada tras el procedimiento, pueden emplearse diferentes tratamientos farmacológicos similares a los utilizados en el glaucoma de ángulo abierto (Le, Rouse, and Gazzard 2018).

En el caso del glaucoma de ángulo abierto, el tratamiento de elección es farmacológico mediante colirios, indicándose la cirugía solo en los casos de no respuesta a los medicamentos. La actuación farmacológica está dirigida a disminuir la producción de humor acuoso o aumentar su eliminación. Los principales fármacos son β -bloqueantes tópicos (disminuyen la producción de humor acuoso), α_2 -agonistas (disminuyen la producción de humor acuoso actuando sobre los cuerpos ciliares), inhibidores de la anhidrasa carbónica (disminuyen la secreción de humor acuoso, se usan en combinación con otros

fármacos), análogos de las prostaglandinas (facilitan la eliminación del humor acuoso) y pilocarpina (aumenta la salida del humor acuoso, actualmente casi no se emplea por sus efectos adversos a nivel ocular). Cuando estos tratamientos no son suficientes, se realiza el tratamiento quirúrgico que consiste en la apertura de una vía artificial de drenaje para favorecer la salida del humor acuoso (Marshall, Hayslett, and Stevens 2018).

2.3. Retinopatía Diabética (RD)

La retinopatía diabética (RD) es una complicación ocular de la diabetes que representa la principal causa de ceguera entre adultos en edad laboral, siendo más de 190 millones de personas las afectadas en todo el mundo. La prevalencia de RD está relacionada fundamentalmente con los años de evolución de la Diabetes Mellitus y con el control metabólico (Abbate et al. 2011) (Figura 8).

Esta enfermedad es una microangiopatía de la retina que implica cambios en la pared vascular y en las propiedades reológicas de la sangre. La combinación de estos factores conduce a la oclusión capilar y que genera isquemia retiniana y extravasaciones. Existen múltiples mecanismos bioquímicos asociados a esta patología, entre ellos, el aumento de la actividad de la proteína quinasa C y la glicosilación de proteínas que llevan a la formación de productos de la glicosilación avanzada (PGA). Esto da lugar a interacciones celulares que aumentan la formación de VEGF causando neovascularización, aumento de la permeabilidad vascular y colapso de la barrera hematorretiniana interna. Los PGA parecen estar implicados en casi todas las complicaciones de la diabetes, incluyendo la vasoconstricción y la inflamación asociadas a la formación de placas de ateroma (Hendrick, Gibson, and Kulshreshtha 2015; Frank 2015). La presencia y distribución de microaneurismas, hemorragias intrarretinales y neovascularización sirven para definir el estado de la enfermedad. A menudo en esta patología aparece edema macular debido al bloqueo de la barrera retiniana, pudiendo progresar a neovascularización (Osaadon et al. 2014).

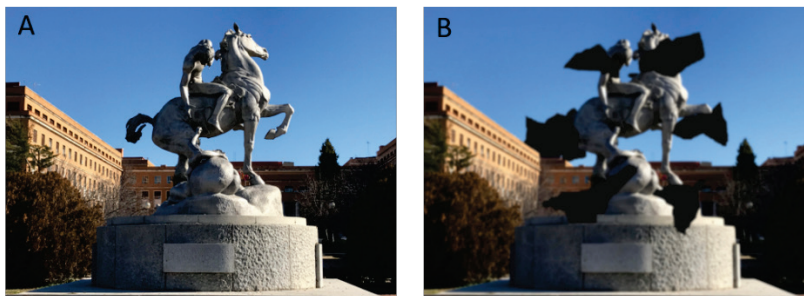


Figura 8. Visión normal (A) y visión de un paciente con RD (B). Imagen tomada del trabajo de revisión titulado: *Microspheres as intraocular therapeutic tools in chronic diseases of the optic nerve and retina* (Bravo-Osuna et al. 2018).

La retinopatía diabética se clasifica en dos tipos: la retinopatía diabética no proliferativa y la retinopatía diabética proliferativa.

- Retinopatía diabética no proliferativa: es la forma más frecuente en la Diabetes tipo 2 (no insulino dependiente). Se caracteriza por la formación de microaneurismas que son asintomáticos. A medida que aumenta la severidad de esta forma de RD, estas dilataciones de los capilares vasculares conllevan la formación de hemorragias intrarretinianas y pérdida de líquido hacia la retina, provocando el engrosamiento de la misma (edema). También pueden aparecer otros signos que incluyen exudados duros (agregados de proteínas y lípidos) y arrosariamiento venoso (Heng et al. 2013).
- Retinopatía diabética proliferativa: es la forma más frecuente de la Diabetes tipo I (insulino dependiente). Esta forma de RD se desarrolla como resultado de la hipoperfusión de los capilares de la retina debido a los daños vasculares obstructivos por trombosis. En respuesta a los eventos isquémicos que ocurren, se origina un proceso de crecimiento de nuevos vasos sobre la superficie de la retina. Estos neovasos, anómalos, frágiles y más permeables, pueden ocasionar hemorragias y/o formación de tejido cicatricial (fibrosis) dañando la retina y generando una pérdida irreversible de la visión. La última de las complicaciones de esta patología es la formación de nuevos vasos en el iris provocando la obstrucción de la salida del humor acuoso, dando

lugar a un aumento de la presión ocular (glaucoma neovascular) (Oli and Balakrishnan 2018).

El mejor tratamiento para la retinopatía diabética es la prevención mediante el control estricto de la glucemia y la presión arterial. Entre otros tratamientos indicados para esta patología se encuentran: la fotocoagulación láser, la vitrectomía y la farmacoterapia. La fotocoagulación láser reduce los nuevos vasos sanguíneos anormales y el edema macular. La vitrectomía se emplea para extraer el vítreo lleno de sangre y el tejido cicatrizado que acompañan a los vasos anormales en el ojo, reemplazándose con una solución transparente. Dentro de los fármacos empleados se encuentran los glucocorticoides, cuyos efectos antiangiogénicos y antiinflamatorios conducen a la estabilización de la barrera hematorretiniana. También se acude al empleo de agentes anti-VEGF administrados por vía intraocular. El efecto de la terapia antiangiogénica en la regresión parcial o completa de los neovasos en pacientes con retinopatía diabética proliferativa, ha sido descrito por distintos autores (Wilkinson-Berka and Miller 2008; Malek et al. 2012).

2.4. Retinosis pigmentaria (RP)

La retinosis pigmentaria (RP) engloba a un grupo heterogéneo de distrofias retinianas hereditarias que conduce a la pérdida progresiva de los fotorreceptores (primero bastones y seguidamente conos) mediante procesos de apoptosis. La prevalencia de la RP es de entre 1/3.000 y 1/5.000, aproximadamente. Se calcula que existen alrededor de 1,5 millones de personas afectadas por esta enfermedad en el mundo, siendo más frecuente en hombre que en mujeres, en su mayoría de forma bilateral y simétrica (Fahim 2018).

Si bien no es completamente conocido el mecanismo que desencadena la muerte de las células fotorreceptoras en este tipo de degeneraciones, esta se ha visto asociado a varias anomalías genéticas. Así, la RP puede cursar de manera aislada (RP no sindrómica o simple), en asociación con otros déficits neuro-sensoriales (RP sindrómica) o acompañada de defectos en múltiples tejidos (sistémica). La RP no sindrómica ha sido relacionada con un número

elevado de mutaciones (casi 1.300 mutaciones en más de 50 genes). Dentro de las formas sindrómicas, se encuentran el síndrome de Usher (RP asocia a mutaciones en 12 genes) y el de Bardet-Biedl (RP ligado a alteraciones en 17 genes), representando ambas en su conjunto 1.200 mutaciones patogénicas (Daiger, Sullivan, and Bowne 2013).

La RP se caracteriza por la degeneración progresiva desde la periferia media del fondo del ojo hacia la mácula y la fóvea. La forma más común de RP es una distrofia de los fotorreceptores en los que la ceguera nocturna (nictalopía) es el primer síntoma, seguido de la pérdida progresiva de campo visual periférico. La visión central se mantiene preservada hasta fases avanzadas de la enfermedad (Figura 9). Entre los principales signos clínicos de esta enfermedad se incluyen: alteraciones pigmentarias retinianas, formación de la membrana epirretiniana, atrofia del EPR y coriocalpilar (a partir de la periferia media de la retina con la preservación del EPR en la mácula hasta finales de la enfermedad), cataratas y edema macular quístico.

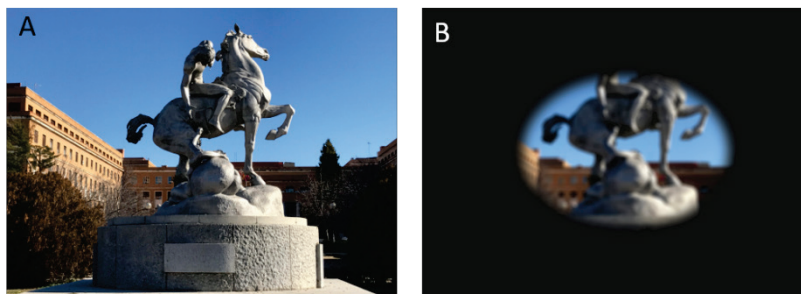


Figura 9. Visión normal (A) y visión de un paciente con RP (B). Imagen tomada del trabajo de revisión titulado: *Microspheres as intraocular therapeutic tools in chronic diseases of the optic nerve and retina* (Bravo-Osuna et al. 2018).

Aunque no existe tratamiento farmacológico de la enfermedad, si se realizan recomendaciones preventivas destinadas a retardar la pérdida de la visión. Entre otras se encuentran: la protección contra la luz solar, el ejercicio y la dieta equilibrada con un adecuado aporte de vitaminas, en especial la vitamina A (excepto en la enfermedad de Stargardt, un tipo concreto de RP, donde esta vitamina está desaconsejada). En los últimos años, gracias al avance en el conocimiento de los mecanismos implicados en esta enfermedad, se han

llevado a cabo diversas aproximaciones terapéuticas, como son: la terapia de trasplante celular, la terapia génica, la terapia farmacológica, la optogenética y la terapia de oxigenación hiperbárica (He, Zhang, and Su 2015).

El trasplante con células madre (*stem cells*) o células madre pluripotenciales inducidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) puede emplearse para el reemplazo de células degeneradas, ayudando además a mejorar la supervivencia celular de las demás células, mediante la liberación de factores de crecimiento. Algunos de los tipos celulares que han sido estudiados con este fin son: células del epitelio pigmentario de la retina, células de Schwann, células madre del sistema nervioso central, células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas y embrionarias. Sin embargo, el uso de esta terapia presenta algunos inconvenientes como por ejemplo el rechazo inmune, la migración al tejido diana, etc (Takahashi et al. 2018). Por su parte, la terapia génica está destinada a corregir la mutación genética causante de la enfermedad, mediante la integración de un vector ADN (ácido desoxirribonucleico) en células específicas de la retina o el reemplazo de genes mediante ARN (ácido ribonucleico) de interferencia (ARNi). No obstante, si bien ha resultado efectiva en algunos modelos murinos de RP (Chadderton et al. 2009; Pang et al. 2011; Petrs-Silva and Linden 2014), presenta algunos problemas que hacen difícil su aplicación en humanos como el uso de vectores virales o la disminución de la efectividad con el avance de la enfermedad (He, Zhang, and Su 2015).

Por otro lado, el uso de fármacos es una estrategia ampliamente estudiada tanto en modelos animales como en humanos. En este sentido, en RP se han probado distintas estrategias farmacológicas para disminuir la muerte celular (Doonan and Cotter 2004), prevenir el daño oxidativo en la retina (Komeima et al. 2006) o mejorar la supervivencia celular con la administración de factores neurotróficos (Lipinski, Singh, and MacLaren 2011).

Respecto a la terapia de oxigenación hiperbárica (*hyperbaric oxygen*, HBO), diversos estudios han postulado que la disponibilidad de oxígeno en la retina es un punto crítico para su degeneración. Por ello, la oxigenación hiperbárica parece modificar favorablemente el curso natural de la retinosis

pigmetaria (Vingolo et al. 2008). Esta terapia consiste en el uso médico de oxígeno puro al 100% en una cámara presurizada o cámara hiperbárica.

2.5. Neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL)

La neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) es una enfermedad genética mitocondrial de transmisión materna, causada por mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt). Más del 90% de esas mutaciones producen alteraciones en los genes MT-ND1, MT-ND4 y MT-ND6 del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta enfermedad afecta principalmente a varones de entre 20 y 30 años, resultando en pérdida total de visión antes de los 50 años en el 95% de los casos. No se conoce con exactitud su prevalencia, pero está estimada en torno a 1/15.000 - 1/50.000 en todo el mundo (Kim, Jurkute, and Yu-Wai-Man 2018; Carrasco Salas et al. 2016).

La principal manifestación con la que cursa esta patología es una pérdida de visión central aguda o subaguda, de forma brusca e indolora. Afecta a ambos ojos simultáneamente o de forma secuencial, con pérdida de visión en el segundo ojo en semanas o meses. También pueden darse otros signos neurológicos en lo que se conocen como "Leber plus", e incluyen trastornos motores, distonía, temblor postural y ataxia cerebelosa (Borrelli et al. 2018).

Dentro de las estrategias propuestas para el manejo de esta enfermedad están: las ayudas para la baja visión, la rehabilitación de la baja visión, las terapias mitocondriales y la terapia génica. Existen diferentes ayudas ópticas (anteojos de lupa, lupas de mano, amplificadores de video...) y dispositivos para baja visión (audiolibros, teléfonos inteligentes, dispositivos de habla...). Así mismo, la rehabilitación de la baja visión es especialmente beneficiosa para los pacientes con NOHL, ya que frecuentemente son jóvenes adultos que mantienen la visión periférica. Respecto a las terapias dirigidas frente a los desórdenes mitocondriales, son diversas las moléculas propuestas para el tratamiento de esta enfermedad, tales como: vitaminas y cofactores (vitamina B12, riboflavina, Coenzima Q10...), aceptores de electrones (menadiol), captadores de radicales libres (ácido α -lipóico, vitamina E...) o inhibidores de metabolitos tóxicos (dicloroacetato).

Por otro lado, dentro de las distintas estrategias de la terapia génica evaluadas se encuentran: la transfección con vectores que portan genes codificantes para proteínas involucradas en los mecanismos antioxidantes mitocondriales o las técnicas de transferencia nuclear. Mediante las técnicas de transferencia nuclear, se logra el reemplazo de todo el genoma mitocondrial del ovocito de una mujer con la mutación por ADN mitocondrial sano, para el normal desarrollo del embrión (Kousal et al. 2018; Ratican, Osborne, and Martin 2018).

3. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS ACTIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS PATOLOGÍAS QUE AFECTAN AL SEGMENTO POSTERIOR DEL OJO

Como se ha descrito, las patologías que afectan al segmento posterior del ojo se caracterizan por ser devastadoras y comprometer la visión de los pacientes afectados. Debido a esta gravedad y a la naturaleza crónica con la que cursan, resulta imprescindible la instauración rápida de un tratamiento y el mantenimiento de concentraciones eficaces de la sustancia activa en el tejido diana durante el mayor tiempo posible. En este sentido, el desarrollo de sistemas capaces de ejercer un control en la cesión de la sustancia activa en el propio lugar de acción (sistemas de liberación controlada) representa una excelente alternativa.

Si bien, en la última década se han llevado a cabo considerables avances en el entendimiento de los mecanismos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas, la eficacia de los tratamientos se encuentra limitada fundamentalmente por la dificultad de acceso de la sustancia activa al lugar de acción. Esto es debido a las diferentes barreras y mecanismos de defensa presentes a nivel ocular. Así, el interior del ojo está protegido frente a elementos extraños por la barrera acuo-lipídica de la córnea, la barrera hemato-ocular (compuesta por las barreras hematoacuosa y hematorretiniana), el reflejo lagrimal, el parpadeo y el mecanismo de aclaramiento. La barrera corneal epitelial está formada por uniones estrechas que limitan su permeabilidad. La barrera hemato-ocular anterior (barrera hematoacuosa) está compuesta por las

uniones estrechas de las células endoteliales de los vasos uveales. Por otro lado, las uniones estrechas tanto del EPR como del endotelio de los capilares retinianos constituyen la barrera hemato-ocular posterior (barrera hematorretiniana) (Velázquez. Farmacología Básica y Clínica).

El tratamiento de las patologías oftálmicas se puede llevar a cabo mediante administración sistémica o local. Existen cuatro vías principales de administración ocular para el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo: tópica, sistémica, intraocular y periocular (incluyendo la subconjuntival, sub-Tenon y retrobulbar).

3.1. Administración tópica

La administración tópica es la primera vía de elección en oftalmología debido a su carácter no invasivo y a su aceptación por parte del paciente. En esta vía, la sustancia activa es administrada sobre la superficie ocular. No obstante, el tiempo de permanencia del fármaco es corto, ya que el flujo lagrimal actúa eliminándolo hacia el conducto nasolagrimal. Además, el paso a través de los capilares sanguíneos del fondo del saco conjuntival y de la propia cavidad nasal favorece la absorción sistémica en detrimento de la ocular (Yamada and Olsen 2016).

La penetración de los fármacos por vía tópica ocular se puede llevar a cabo a través de la córnea (vía transcorneal) o a través de la conjuntiva y esclera (vía conjuntival/escleral). Se sabe que la mayoría de las sustancias activas que se emplean por vía tópica penetran al interior del ojo empleando la ruta transcorneal. La permeabilidad de fármacos a través de esta ruta está regulada por la anatomía y las propiedades fisicoquímicas de la córnea. La córnea es una capa avascular rodeada de fluidos y formada por cinco capas de naturaleza muy variada (desde la superficie anterior a la zona posterior): epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. El epitelio corneal es un epitelio estratificado, integrado por células superpuestas planas y escamosas hacia la superficie y células columnares muy unidas en la zona más interna. El epitelio de la córnea permite el paso de sustancias activas hidrofóbicas de pequeño tamaño a través de las células epiteliales por difusión (ruta

transcelular) y de sustancias hidrofílicas entre los espacios de las mismas en lo que se conoce como ruta paracelular. El estroma, constituye el 90% del espesor de la córnea y está formado principalmente por fibras de colágeno, queratocitos y matriz. Por otro lado, el endotelio presenta uniones celulares fuertes “tight junctions” que limitan el paso de las sustancias activas por difusión en función del tamaño de la molécula. Así, la córnea actúa tanto de barrera lipídica (epitelio y endotelio) como acuosa (estroma), condicionando el paso de fármacos en función de su coeficiente de reparto lipofilia/hidrofilia (Patel et al. 2013).

Todo ello hace que la administración tópica presente habitualmente una baja disponibilidad de la sustancia activa que logra alcanzar el interior del globo ocular (biodisponibilidad igual o inferior al 5%). Por ello, la administración tópica es frecuentemente empleada para el tratamiento de patologías que afectan a la superficie ocular o al segmento anterior del ojo (Kompella, Kadam, and Lee 2010). No obstante, de momento no resulta una vía útil para tratar patologías del segmento anterior.

3.2. Administración por vías que impliquen efecto sistémico

Si bien la vía oral es la más empleada en la práctica clínica, resulta poco empleada en oftalmología. Esto es debido, principalmente a las altas dosis del fármaco que son necesarias administrar de manera repetida para alcanzar niveles terapéuticos, así como a las bajas concentraciones de sustancia activa que logran alcanzar el lugar de acción. La administración repetida de dosis elevadas de fármaco desencadena efectos secundarios no deseados y efectos tóxicos potencialmente graves (Herrero-Vanrell and Refojo 2001; Geroski and Edelhauser 2001). La llegada de fármacos a nivel ocular, tras una administración que implique efecto de primer paso se encuentra condicionada por varios factores. Entre ellos, el gradiente de concentración entre el plasma y los tejidos oculares o las características de las dos principales barreras (hematoacuosa y hematorretiniana) que impiden la entrada de fármacos desde la circulación sistémica a los tejidos oculares (Vellonen et al. 2016).

En oftalmología, las vías de administración de efecto sistémico han sido empleadas para la administración de antibióticos en endoftalmitis, inhibidores de

la anhidrasa carbónica para el tratamiento de la presión intraocular elevada y metotrexato y antibióticos de uso parenteral para la uveítis.

3.3. Administración intraocular

El éxito en el tratamiento de las patologías oftálmicas que afectan a la retina requiere de concentraciones eficaces de la sustancia activa, mantenidas a lo largo del tiempo, en el lugar de acción. Así, todas las vías ya descritas presentan gran dificultad para este propósito. Por un lado, la pobre biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía tópica limita el acceso a los tejidos intraoculares. Por otro lado, las vías de administración de efecto sistémico suponen un riesgo de efectos secundarios sistémicos indeseados, debido a las elevadas dosis que son necesarias administrar para alcanzar concentraciones eficaces a nivel intraocular. Por esta razón se recurre a las inyecciones intraoculares y perioculares como alternativas eficaces.

La administración intraocular supone la administración del agente farmacológico directamente en el interior ocular con el fin de actuar en el segmento anterior o posterior del ojo. Este tipo de administración comprende la inyección intracameral (administración en la cámara anterior), intravítrea (en la cavidad vítrea) o sub-retinal (Yamada and Olsen 2016).

La administración de las sustancias activas en el lugar de acción o sus proximidades conlleva un aumento de la biodisponibilidad del fármaco. Sin embargo, debido a la dificultad en el mantenimiento de concentraciones terapéuticas en el tejido diana, a menudo son necesarias inyecciones repetidas, las cuales se asocian a efectos adversos no deseados tales como cataratas, desprendimientos de retina y hemorragias entre otros. Además, se ha comprobado que el riesgo de que se produzcan estos eventos se ve incrementado con el número de inyecciones.

La administración intracameral es exclusivamente usada para inyectar formulaciones destinadas a actuar en el segmento anterior del ojo, ya que esta ruta no permite alcanzar concentraciones significativas de fármaco en el segmento posterior. Se emplea con frecuencia para prevenir endoftalmitis con

la administración de antibióticos tras la cirugía de cataratas (Rush, Vu, and Rush 2015; Bravo-Osuna et al. 2016).

La ruta de administración sub-retinal implica la administración del fármaco entre el EPR y la retina neural. De esta manera se forma un depósito para posteriormente desaparecer. Esta vía es especialmente utilizada para alcanzar el EPR o los fotorreceptores (Arnold et al. 2016).

La vía de administración intravítrea, es decir, el depósito directo de la sustancia activa en el vítreo es la más eficiente para el tratamiento de patologías que afectan al segmento posterior del ojo (Figura 10). Sin embargo, se trata de una ruta invasiva que provoca la ruptura de los tejidos oculares comprometiendo su privilegio inmunológico. Además, dado que la sustancia activa es directamente depositada en el tejido diana (retina), las elevadas concentraciones iniciales que se alcanzan tras la inyección pueden producir toxicidad retiniana.

Por otro lado, tal y como se ha comentado anteriormente, otro de los retos presentes es la dificultad en el mantenimiento de concentraciones eficaces en el lugar de acción. La eliminación de fármacos de la cavidad vítrea puede ocurrir por: (I) aclaramiento anterior, a través de los canales de la malla trabecular tras procesos de difusión del fármaco desde el humor vítreo al humor acuoso, (II) aclaramiento posterior, mediante la eliminación del fármaco a través de la barrera hemato-ocular. Aunque estos procesos dependen de la lipofilia y del peso molecular de las sustancias activas, la eliminación de fármacos del vítreo ocurre generalmente de forma rápida, teniendo lugar en algunos casos a las pocas horas. La rápida eliminación, unida a la cronicidad con la que cursan las enfermedades que afectan al segmento posterior del ojo, conllevan la necesidad de realizar inyecciones repetidas incluso para aquellos fármacos de larga semivida. Esta frecuencia de inyecciones incrementa el riesgo de efectos no deseados (cataratas, endoftalmitis, desprendimiento de retina, etc) (Lai et al. 2015).

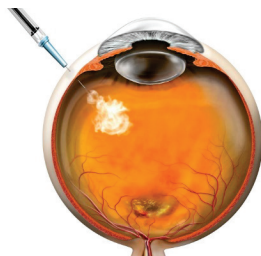


Figura 10. Inyección intravítrea. Imagen tomada de:
[<http://conceptnewscentral.com/index.php/2016/12/16/hydrogel-gold-cut-injections-macular-degeneration/>]

Por todo ello, dos de los retos actuales en el desarrollo de nuevas terapias intraoculares para patologías crónicas oftálmicas son (I) lograr el mantenimiento de concentraciones eficaces de fármaco en el tejido diana y (II) reducir la frecuencia de administración.

3.4. Administración periocular

La administración periocular es considerada una alternativa a las inyecciones intravítreas, ya que permite alcanzar concentraciones más elevadas de fármaco en el segmento posterior que las vías tópica y sistémica, pero minimizándose los efectos adversos asociados a la vía intraocular. La vía periocular implica la administración de la sustancia activa en la superficie externa de la esclera. Estas inyecciones difieren según la localización en la que se administren cercanas a la esclera englobando así a las inyecciones: subconjuntival, sub-Tenon, peribulbar, retrobulbar o posterior yuxtaescleral. Las inyecciones subconjuntivales, sub-Tenon y posterior yuxtaescleral son las más frecuentemente empleadas en la práctica clínica (Ranta et al. 2010; Raghava, Hammond, and Kompella 2004).

La esclera humana presenta una superficie aproximada de 16,3 cm² con un adelgazamiento cerca de la región ecuatorial (desde 0,53±0,14 mm a 0,39±0,17 mm) y una menor resistencia a la penetración de fármacos en comparación con la córnea. La permeabilidad de la esclera depende principalmente del peso molecular de los fármacos. En este sentido, se ha descrito que moléculas de hasta 70.000 g/mol pueden atravesar fácilmente la esclera (Geroski and Edelhauser 2001). Otros de los factores que influyen en la

permeabilidad a través de dicho tejido son la hidratación escleral y la presión intraocular, aunque ésta última tiene efectos menores o insignificantes en valores normales (15-20 mmHg) (Geroski and Edelhauser 2000).

Sin embargo, a pesar de la permeabilidad de la esclera, sólo una baja concentración del fármaco administrado por vía transescleral es capaz de llegar al vítreo. Esta baja biodisponibilidad puede atribuirse a diferentes factores como son: el reflujo de la formulación en el sitio de la inyección, la pérdida de la sustancia activa en el espacio periorcular a través de los vasos linfáticos y las venas episclerales de la conjuntiva, la circulación coroidea, la barrera hematorretiniana externa, así como la unión de la sustancia activa a las proteínas de los tejidos y a los transportadores.

4. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE SUSTANCIAS ACTIVAS POR VÍA OFTÁLMICA EN EL SEGMENTO POSTERIOR DEL OJO

Ya se ha comentado anteriormente, que el tratamiento de las patologías crónicas que afectan al segmento posterior del ojo precisa de concentraciones eficaces del fármaco mantenidas a lo largo del tiempo en los tejidos diana (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). Idealmente, los sistemas de liberación controlada más útiles para el tratamiento de estas patologías, deben permitir una liberación inicial de la sustancia activa en cantidad suficiente para producir un efecto (dosis de choque), seguida de una liberación lenta y gradual durante un periodo de tiempo determinado, disminuyendo así las fluctuaciones en sus niveles de concentración (Rincon Alarcon 2006).

Los sistemas de liberación controlada útiles para el tratamiento de patologías oculares se pueden clasificar de acuerdo con su tamaño en:

- Implantes (> 1mm): en función del material empleado en su obtención pueden ser biodegradables y no biodegradables. Su implantación suele realizarse mediante cirugía, así como su retirada en el caso de los no biodegradables. Debido a su tamaño, estos sistemas permiten la liberación de la sustancia activa

directamente en el lugar de acción durante largos periodos de tiempo, resultando así de gran interés para el tratamiento de patologías crónicas.

- Micro- y nanosistemas: Constituidos principalmente por liposomas (10-1000 nm), micropartículas (1-1000 μm) y nanopartículas (1-1000 nm). La principal ventaja de estos sistemas radica en que pueden ser administrados en forma de suspensión mediante una inyección convencional. Si bien las micropartículas ejercen un adecuado control de liberación del fármaco, la elevada superficie específica de los sistemas liposomales y las nanopartículas, hace que resulten más interesantes para la vectorización y protección de sustancias activas que como sistemas de liberación prolongada.

4.1. Implantes

Con estos sistemas se obtienen niveles terapéuticos de la sustancia activa directamente en el lugar de acción, mantenidos durante largos periodos de tiempo, pudiendo comprender desde meses hasta años, por lo que resultan muy útiles en el tratamiento de patologías crónicas (Thrimawithana et al. 2011). No obstante, también presentan inconvenientes, ya que, en muchos casos, debido al tamaño de estos dispositivos, la técnica empleada para su implantación es invasiva y en ocasiones también se requiere incisión quirúrgica para su retirada (Eljarrat-Binstock, Pe'er, and Domb 2010; Kang-Mieler, Osswald, and Mieler 2014).

Los implantes pueden ser depositados en distintas partes del ojo. En general la incorporación subconjuntival se utiliza para las patologías que afectan al segmento anterior, mientras que los implantes intravítreos y supracoroideos se utilizan normalmente para tratar enfermedades que afectan al segmento posterior (Short 2008). Los implantes oculares intravítreos se insertan a través de una esclerotomía o se inyectan mediante un aplicador. Así, la liberación del fármaco se realiza en una zona cercana a los tejidos diana. La cesión 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 tipo reservorio o a través del entramado polimérico si se trata de un sistema matricial. En el caso

de los implantes biodegradables, la degradación del polímero también contribuye a la liberación del fármaco.

En función de la naturaleza del polímero, los implantes pueden clasificarse en dos categorías (I) biodegradables y (II) no biodegradables. En ambos casos el material utilizado ha de ser biocompatible y bien tolerado.

IMPLANTES NO BIODEGRADABLES

Los implantes intraoculares no biodegradables comercializados liberan la sustancia activa de acuerdo con una cinética de orden cero durante periodos prolongados de tiempo, debido a que no sufren metabolismo ni erosión *in vivo*, deben ser eliminados y/o reemplazados cuando toda la carga es liberada. Su retirada puede asociarse a complicaciones graves tales como: hemorragias intravítreas, desprendimiento de retina, endoftalmitis, fibrosis y edema macular (Yasukawa and Ogura 2010). Entre los polímeros generalmente utilizados en la elaboración de estos implantes se encuentran la silicona, el alcohol polivinílico (PVA) o el acetato de etilvinilo (EVA) (Thrimawithana et al. 2011; Bourges et al. 2006). Los implantes tipo reservorio son los más comunes y generalmente se elaboran con pellets de fármaco rodeados de capas de mezclas poliméricas inertes. Así, la velocidad de liberación de la sustancia activa puede modularse mediante el control en la composición de las diversas capas (Gaudana et al. 2009). Dentro de los dispositivos no biodegradables comercializados para el tratamiento de patologías del segmento posterior del ojo se encuentran los implantes Vitrasert®, Retisert®, Iluvien®/ Medidur® e I-vation™ (Figura 11).

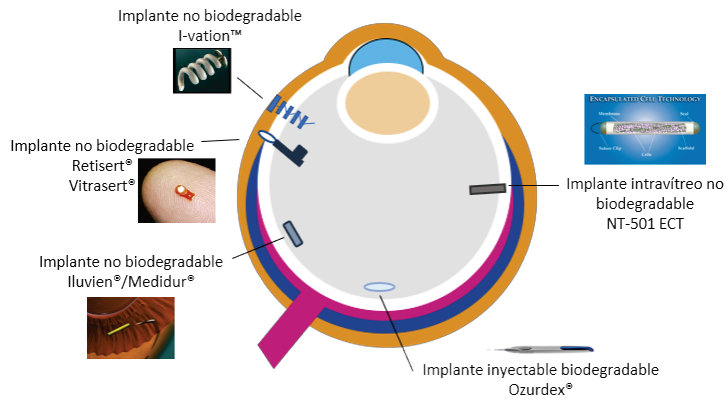


Figura 11. Ejemplos de implantes de liberación controlada

- Vitrasert® (Control Delivery Systems, Inc. (ahora pSivida): es un implante tipo reservorio de ganciclovir aprobado por la FDA en 1996 para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus (CMV). Este dispositivo contiene 4,5 mg de ganciclovir, cubierto por una capa interna de PVA y una capa externa de EVA. El fármaco es liberado lentamente durante un periodo de 5 a 8 meses a una velocidad constante de $0,24\mu\text{g}/\text{día}$, debido a la progresiva entrada de medio acuoso a través de la membrana de PVA y posterior disolución y difusión del fármaco al exterior (Lobo, Sobrin, and Papaliodis 2010; Choonara et al. 2010).

- Retisert® (pSivida): es un implante tipo reservorio de acetónido de fluocinolona que fue aprobado en 2005 por la FDA para el tratamiento de uveítis crónica no infecciosa. El dispositivo consta de un pellet que contiene 0,59 mg de sustancia activa (acetónido de fluocinolona) cubierto de PVA y silicona para lograr una cesión del fármaco a velocidad constante de $0,3\text{-}0,6\ \mu\text{g}/\text{día}$ en el segmento posterior durante 30 meses (Jaffe et al. 2006; Moisseiev and Loewenstein 2017b).

- Iluvien®/Medidur® (Alimera Sciences, Inc., Alpharetta, GA/pSivida Inc. Watertown, Mass., USA): es un implante de acetónido de fluocinolona indicado para el tratamiento de edema macular, aprobado por la FDA en 2014. Su forma cilíndrica y pequeño tamaño (longitud de 3,5 mm y diámetro de 0.37 mm) permite su administración intravítrea mediante un sistema inyector acoplado a una aguja de calibre 25G sin necesidad de cirugía (tecnología Medidur®). Su diseño

INTRODUCCIÓN

permite una liberación constante de dosis de 0,2 – 0,45 µg de acetónido de fluocinolona de 24 a 36 meses post-inyección (Kane et al. 2008; Campochiaro et al. 2010).

- I-vation™: es un implante intravítreo de titanio para la liberación de acetónido de triamcinolona en fase de ensayos clínicos para el tratamiento de edema macular diabético. La forma de este dispositivo es una estructura tridimensional formado por una mezcla de poli (butil metacrilato) y poli-EVA que permite la liberación de la sustancia activa durante 2 años. Su diseño en forma de hélice permite el anclaje del implante en la esclera mediante el empleo de una aguja de calibre 25G. En un ensayo clínico en fase II (NCT00692614), se evaluó el efecto del implante con tres dosis distintas de acetónido de triamcinolona (100 µg, 500 µg y 925 µg) para el tratamiento de edema macular diabético. (Choonara et al. 2010; Kuppermann and Loewenstein 2010; Boyer 2013; Moisseiev and Loewenstein 2017b).

Dentro de los implantes no biodegradables se encuentran los dispositivos de terapia celular encapsulada (*Encapsulated Cell Therapy* (ECT)). Esta tecnología está basada en la encapsulación de células humanas del RPE, modificadas genéticamente para secretar distintos factores. Estos dispositivos están siendo desarrollados por la compañía Neurotech Pharmaceuticals Inc. (Cumberland, RI, USA). El dispositivo ECT está fabricado con polímeros de grado médico (poliéter sulfona y tereftalato de polietileno) y consiste en una cápsula exterior semipermeable y un andamio de titanio interno, que permite el crecimiento celular controlado y la producción continua de proteínas dentro del cartucho. La semipermeabilidad de la cápsula ECT permite que el oxígeno y los nutrientes del humor vítreo difundan libremente hacia adentro, y la difusión del agente terapéutico hacia el exterior (Figura 12).

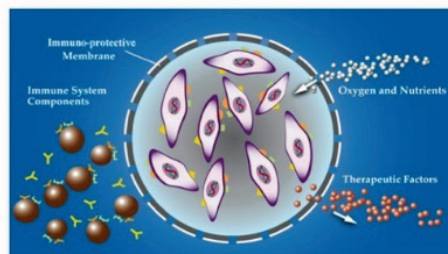


Figura 12. Tecnología ECT. Imagen obtenida de: [\[http://www.neurotechusa.com/ect-platform.html\]](http://www.neurotechusa.com/ect-platform.html)

Existen actualmente 3 variantes del dispositivo: (I) El NT-501 ECT para secretar factor neurotrófico ciliar humano (CNTF). En su fabricación, tras un proceso de esterilización, el dispositivo es cargado con 10 μ L de suspensión de células secretoras de CNTF (39.000 células/ μ L). Se administra en el vítreo a través de una pequeña incisión en la esclera posteriormente suturada, liberando cantidades eficaces de CNTF durante 18 meses. Este dispositivo se destina al tratamiento de DMAE seca, retinosis pigmentosa (fase II de ensayos clínicos; NCT00447993 y NCT00447980) y para el tratamiento del glaucoma (fase preclínica). Además, la compañía está llevando a cabo un estudio de fase 2 (NCT01949324) usando NT-501 ECT para el tratamiento de sujetos con telangiectasia macular, un trastorno idiopático que incluye disrupción vascular de la mácula, donde la angiogénesis yuxtafoveal conduce a la pérdida de la visión central. El CNTF está identificado como modulador potencial de la pérdida de la visión en esta enfermedad. (II) El NT-503 ECT encapsula células secretoras de un factor antiangiogénico (anti-VEGF). Si bien se encontraba en fase II (NCT02228304) de ensayo clínico para el tratamiento de la DMAE húmeda, este estudio fue suspendido debido a que un número de pacientes mayor de lo esperado requirió medicación de rescate (Eylea® (aflibercept)) a mitad del ensayo. No obstante, el dispositivo fue bien tolerado a lo largo de la duración del estudio. (III) 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 preclínica) (Kuno N. 2012; Sieving et al. 2006; Zhang et al. 2011; Birch et al. 2013).

IMPLANTES BIODEGRADABLES

Los implantes biodegradables presentan una ventaja significativa respecto a los anteriores, ya que son absorbidos o excretados, desapareciendo gradualmente del organismo, por lo que se evitan las complicaciones asociadas a la intervención quirúrgica para su retirada. El principal reto de este tipo de formulaciones reside en lograr el control deseado del perfil de liberación del fármaco ya que se trata, en su mayoría, de estructuras matriciales (Eljarrat-Binstock, Pe'er, and Domb 2010). De esta forma, la liberación del fármaco se lleva a cabo por una combinación de difusión y degradación polimérica. Este tipo de implantes están formulados como sólidos o semi-sólidos, por lo que su implantación es más sencilla que en el caso de los no biodegradables. En la

mayoría de los casos pueden ser administrados a través de una inyección convencional (Bourges et al. 2006). Los polímeros biodegradables empleados para la elaboración de implantes pueden ser hidrófilos o hidrófobos. Entre los polímeros hidrófilos empleados por vía ocular se encuentran: albúmina, gelatina, colágeno, quitosano y almidón. A pesar de que estas sustancias se caracterizan por no ser inmunogénicas, han sido menos investigadas *in vivo* para la liberación de fármacos en la retina, en comparación con los polímeros hidrófobos. Los polímeros hidrófobos generalmente empleados para la elaboración de implantes biodegradables son: ácido poliláctico (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), polianhídrido y poli(orto)éster (POE). (Yasukawa et al. 2005) Dentro de estos, los más frecuentemente utilizados son los copolímeros del PLA y/o el PLGA, los cuales 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 (Short 2008; Rong et al. 2014). Sus cadenas poliméricas presentan la gran ventaja de ser hidrolizadas progresivamente en sus monómeros (ácido láctico y ácido glicólico) que, a su vez, se convierten posteriormente en CO₂ y agua mediante el ciclo de Krebs. Este proceso de biodegradación mediante escisión hidrolítica conduce a una liberación sostenida de los compuestos activos incluidos en el dispositivo (Colthurst et al. 2000).

La velocidad y la duración de la cesión del fármaco a partir de estos implantes se puede modificar mediante varias estrategias entre las que se encuentran la proporción de ácido láctico y ácido glicólico, el peso molecular del polímero y la naturaleza del fármaco, pudiendo variar así el tiempo de cesión (Wang and Wu 1997; Herrero-Vanrell and Refojo 2001; Wu 2004). Los PCLs son poliésteres hidrofóbicos que se degradan mediante hidrólisis lenta permitiendo una liberación del fármaco durante mayor tiempo. Es combinado frecuentemente con PLGA para elaborar implantes menos inmunogénicos que los dispositivos de PLGA puros (Dong et al. 2006; Shi et al. 2005). Los implantes biodegradables se han investigado para la liberación controlada de una gran variedad de fármacos como antivirales, antifúngicos, inmunosupresores o esteroides (Hashizoe et al. 1997; Rodriguez-Agirretxe et al. 2013; Souza et al. 2014; Whitcup and Robinson 2015).

- Ozurdex® (Allergan Inc): El primer implante biodegradable de administración intravítrea (Ozurdex®) fue aprobado por la FDA en el año 2009 para el tratamiento del edema macular debido a oclusión venosa retiniana, siendo posteriormente aprobado para el tratamiento de uveítis no infecciosa (2010) y edema macular diabético (2014). Actualmente, también está aprobado su uso por la EMA. Este dispositivo es una matriz polimérica de PLGA basado en la tecnología Novadur™ que contiene 700 µg de dexametasona (antiinflamatorio esteroideo) que es capaz de ceder el fármaco durante aproximadamente 6 meses, y que, gracias a su tamaño, es inyectado con un aplicador desechable que lleva integrada una aguja calibre 22 G (Figura11) (Ngo and Tan 2017; Kuo et al. 2015; Dugel, Bandello, and Loewenstein 2015).

Existen también otros implantes intravítreos basados en la tecnología Novadur™ (Taskintuna, Elsayed, and Schatz 2016). Así, ha sido desarrollado un implante intravítreo con brimonidina, un agonista alfa-adrenérgico selectivo que ha demostrado inducir la liberación de varios factores neurotróficos como el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), el CNTF y la neurotrofina-3 (NT-3) (Lonngren et al. 2006; Lee et al. 2010). Este implante biodegradable ha sido evaluado para el tratamiento de la DMAE, la retinopatía óptica glaucomatosa y la retinosis pigmentaria, en ensayos clínicos en fase II (NCT00693485, NCT00972374, NCT00658619).

4.2. Micro- y Nanopartículas

Los sistemas de cesión controlada de fármacos basados en micro- y nanopartículas, representan en la actualidad sistemas innovadores y versátiles destinados al tratamiento de patologías oftálmicas. El desarrollo de estos sistemas de cesión controlada surge ante la necesidad de alcanzar concentraciones eficaces del fármaco en los tejidos diana mantenidas durante periodos prolongados de tiempo. Son sistemas capaces de personalizar la terapia. Desde el punto de vista estructural, los sistemas microparticulares pueden clasificarse en: micro-cápsulas o micro-esferas. Los sistemas reservorio se encuentran constituidos por una cavidad central de fármaco rodeada de una cápsula envolvente. Las micro- y nanoesferas son sistemas matriciales en los que el principio activo se encuentra disperso una matriz (Figura 13).

Independientemente del sistema, ambos pueden transportar sustancias activas de naturaleza tanto hidrofílicas como lipofílicas.

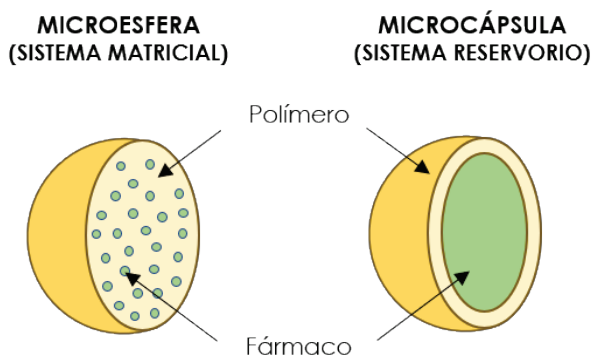


Figura 13. Representación esquemática de los dos tipos de estructura de las micro-partículas. (A) micro-esferas y (B) micro-cápsulas.

En cuanto a los sistemas nanométricos, la Plataforma Europea de Nanomedicina (www.etpn-nanomedicine.eu), les ha asignado la denominación de nanomedicamentos. Dentro de estos, además de las nanopartículas caben destacar las micelas poliméricas, los conjugados fármaco-polímero, y las nanoestructuras dendriméricas.

Los sistemas de tipo nanoparticular para el tratamiento de patologías oftálmicas surgen como una interesante herramienta para la direccionalización y entrega selectiva de la carga terapéutica en el lugar de acción (Diebold and Calonge 2010). Su reducido tamaño las hace adecuadas para ser internalizadas por las células. Este hecho revela la utilidad de las nanopartículas como sistemas portadores de material genético hacia el interior celular (Jiang et al. 2018). Diversos estudios preclínicos han postulado también el empleo de sistemas nanoparticulares para el transporte de sustancias activas de diversa naturaleza (Bourges et al. 2003; Bejjani et al. 2005; Farjo et al. 2006; Paasonen et al. 2007; Merodio et al. 2001).

Aunque el potencial de las nanopartículas de mayor tamaño para ejercer una liberación controlada de fármacos ha sido demostrado (Kompella et al. 2013), las micropartículas debido a su diferencia sustancial en tamaño, ofrecen un mejor resultado en el mantenimiento de liberaciones controladas de fármacos

durante periodos prologados de tiempo (Cardillo, Souza-Filho, and Oliveira 2006; R. Herrero-Vanrell 2013).

De modo general, los materiales capaces de constituirse en micropartículas se clasifican en tres categorías: polímeros, lípidos (ej: ceras, ácidos esteáricos, fosfolípido) y proteínas (ej: gelatina, caseína, protamina...) (Martínez Pacheco 2016). Dentro de las partículas poliméricas, dependiendo de la naturaleza del polímero empleado (biodegradable o no biodegradable), los sistemas microparticulares pueden o no desaparecer del lugar de acción después de la liberación del agente terapéutico. Generalmente, para la elaboración de micropartículas destinadas a la administración por vía intraocular, se prefiere el empleo de polímero biodegradables. Así, entre los más utilizados se encuentran los poliésteres, poliamidas, poliuretanos, polifosfazinas, poliortoésteres, polianhídridos y polialquil cianoacrilatos (V. Andrés-Guerrero 2017). Dentro de los polímeros biodegradables empleados por excelencia en el desarrollo de micro-partículas están el ácido poli(láctico-glicólico) (PLGA). Este polímero está aceptado por la FDA y por la EMA, para su utilización en dispositivos intraoculares. Como anteriormente se expuso, el PLGA se degrada progresivamente *in vivo* en subproductos biocompatibles (monómero de ácido láctico y glicólico) los cuales finalmente dan lugar a CO₂ y agua a través del ciclo de Krebs (Shive and Anderson 1997). La biodegradación de las microesferas de PLGA tiene lugar a través de un mecanismo de escisión de cadena hidrolítica homogéneo que conduce a una liberación sostenida de los compuestos activos incluidos en la matriz polimérica (Short 2008; Rong et al. 2014).

La principal ventaja de los sistemas microparticulares frente a los sistemas convencionales para la administración de fármacos es que son capaces de aumentar la eficacia terapéutica al mejorar el perfil de liberación del fármaco y minimizar el riesgo de toxicidad. Otra de las importantes ventajas de este tipo de formulaciones radica en su fácil administración, en forma de suspensión, a través de una aguja convencional (25-32G) o cánula cuyo diámetro se selecciona en función del tamaño de las partículas y la vía de administración empleada (Figura 14), por lo que no se precisa de cirugía (Herrero-Vanrell and Refojo 2001; Bravo-Osuna et al. 2018; Herrero-Vanrell et

INTRODUCCIÓN

al. 2014). Los vehículos utilizados para la preparación de la suspensión de las partículas son soluciones fisiológicas biocompatibles con el organismo (ej: tampones fosfato salinos o soluciones salinas balanceadas).

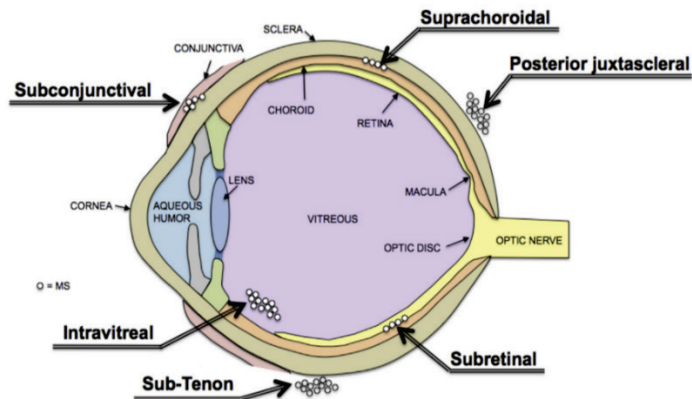


Figura 14. Vías de administración de microesferas para el tratamiento de patologías de la retina y otras enfermedades oculares. Imagen tomada del trabajo de revisión titulado: *The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases* (HerreroVanrell, Bravo-Osuna et al. 2014).

El éxito de los sistemas particulares para el tratamiento de patologías crónicas del segmento posterior del ojo depende de varios factores, entre ellos se encuentran los polímeros utilizados y el control sobre el tamaño de partícula, ya que de ellos dependerá en gran medida la velocidad de liberación del fármaco y por ende la duración del efecto terapéutico. Otros factores determinantes para lograr una formulación final adecuada radican en la obtención de una óptima eficacia de encapsulación, el mantenimiento de la bioactividad de las moléculas activas durante el proceso de elaboración, el escalado y el cumplimiento del requisito de esterilidad de los sistemas. Finalmente hay que añadir también la vía de administración seleccionada (Bravo-Osuna et al. 2016).

El comportamiento y la distribución de los sistemas nano- y microparticulares tras la inyección intravítrea varía en función del tamaño. Se ha demostrado que tras la administración intravítrea de micropartículas con un diámetro superior a 2 μm , estas tienden a sedimentar por acción de la gravedad

distribuyéndose principalmente en la cavidad vítrea y la malla trabecular. Por el contrario las nanopartículas con un diámetro de menos de 200 nm, además del vítreo y de la malla trabecular, se distribuyen también en la retina (Sakurai et al. 2001). Una vez inyectadas, las micropartículas tienden a agregarse formando un implante *in situ* en las proximidades del sitio de administración. De esta forma pueden liberar progresivamente los agentes activos portados en su interior durante periodos más prolongados de tiempo al disminuir su superficie específica (Herrero-Vanrell et al. 2014; Bravo-Osuna et al. 2018). Las nanopartículas, en cambio, son capaces de difundir rápidamente, localizándose en el interior de los tejidos oculares (Bourges et al. 2003; Amrite et al. 2008).

Dependiendo de la patología ocular objeto de tratamiento, han sido diversos los agentes terapéuticos encapsulados en sistemas microparticulares. Algunos ejemplos de sistemas microparticulares empleados como herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades vitreoretinianas se muestran en la Tabla 1.

PATOLOGÍA	SISTEMA DE LIBERACIÓN MODIFICADA	SUSTANCIA ACTIVA	RUTA DE ADMINISTRACIÓN	ESTUDIO IN VIVO	REF.
Vitreoretinopatía proliferativa	Microesferas PLA	Adriamicina	Intravítrea	Conejos	(Moritera et al. 1992)
	Microesferas PLGA	Ácido retinoico	Intravítrea	Conejos	(Giordano, Refojo, and Arroyo 1993)
Uveitis	Microesferas PLGA	Dexametasona	Intravítrea	Conejos	(Barcia et al. 2009)
	Microesferas PLGA	Ciclosporina	Intravítrea	Conejos	(He 2006)
Retinopatía diabética	Microesferas PLA	Budesonida	Periocular	Ratas	(Kompella, Bandi, and Ayalasoma yajula 2003)
Edema macular	Microesferas PLGA	Acetónido de triancinolona	Intravítrea	Humanos	(Cardillo, Souza-Filho, and Oliveira 2006)
Necrosis Retinal Aguda	Microesferas PLGA	Guanosina	Intravítrea	Conejos	(Chowdhury and Mitra 2000)
	Microesferas PLA	Aciclovir	Intravítrea	Conejos	(Conti 1997)
Retinitis por citomegalovirus	Microesferas dispersadas en una solución termogelificante PLGA-PEG-PLGA	Ganciclovir	Intravítrea	Conejos	(Duvvuri et al. 2007)
Neovascularización coroidea	Microesferas PLGA	PKC412 (inhibidor kinasa)	Periocular	Cerdos	(Saishin et al. 2003)
Glaucoma	Microesferas PLGA	GDNF	Intravítrea	Ratas	(Jiang et al. 2007)
	Microesferas PLGA	GDNF/VitE	Intravítrea	Ratas	(Checa-Casalengua, Jiang, Bravo-Osuna, Tucker, Molina-Martinez, et al. 2011)
	Microesferas PLGA	GDNF/VitE	Intravítrea	Conejos	(García-Caballero et al. 2017)
Retinosis pigmentaria / Degeneración de fotorreceptores	Microesferas PLGA	TUDCA	Intravítrea	Ratas	(Fernandez-Sanchez et al. 2017)
	Microesferas PLGA	GDNF/VitE	Intravítrea	Ratones	(García-Caballero C. 2018)
Degeneración macular asociada a la edad	Microesferas PLGA	Bevacizumab	Intravítrea	Conejos	(Ye et al. 2015)
Prevención de la inflamación ocular	Microesferas PLGA en solución de acetónido de triancinolona	Clorhidrato de ciprofloxacino	Periocular	Humanos	(Paganelli et al. 2009)
Medicina regenerativa	Microesferas PLGA	Co-trasplante de CPR y MMP2	Subretiniana y Co-trasplante	Ratones	(Yao et al. 2011)

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

Como se ha descrito anteriormente, las patologías crónicas que afectan al segmento posterior del ojo se caracterizan por ser enfermedades multifactoriales, donde los distintos mecanismos de daño actúan interaccionando entre sí y combinándose, lo que sugiere la necesidad de desarrollar terapias que combinen tratamientos frente a distintas dianas terapéuticas (Cuenca, Fernandez-Sanchez, Campello, et al. 2014). De hecho, es cada vez mayor el interés en el desarrollo de terapias combinadas basadas en la combinación de varias sustancias activas capaces de actuar frente a diferentes mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad presentando ventajas frente a la monoterapia. Por ejemplo, en el caso de pacientes con edema macular diabético (DME) refractarios a múltiples tratamientos anti-VEGF, la combinación del tratamiento con corticosteroides parece una alternativa prometedora (Hussain and Ciulla 2016). Esta estrategia terapéutica también se ha empleado en el tratamiento de la degeneración macular neovascular asociada a la edad. Gracias a la combinación de ranibizumab con corticoides, Villegas y colaboradores describieron una reducción en los retratamientos requeridos en comparación con ranibizumab en monoterapia (Villegas et al. 2017). El uso de la terapia combinada se ha extendido a medicamentos antiinflamatorios no esteroideos como bromfenaco. Este agente activo combinado con la terapia anti-VEGF en el tratamiento de la DMAE húmeda resultó más eficaz que la terapia única con aflibercept (Wygladowska-Promienska et al. 2015). La estrategia de la terapia combinada es además altamente interesante en el caso de pacientes glaucomatosos no respondedores a la monoterapia antihipertensiva o pacientes normotensos (Bravo-Osuna et al. 2018).

Por todo lo expuesto, una de las aproximaciones más interesantes en el uso de sistemas microparticulares para el tratamiento de enfermedades de la retina y el nervio óptico, es el empleo de mezclas físicas de micropartículas cargadas con diferentes agentes activos. Además, este tipo de sistemas permite el desarrollo de terapias personalizadas al poder ajustar la cantidad de microsistemas administrados a las necesidades individuales de cada paciente. Sin embargo, son varios los trabajos publicados acerca de los límites máximos tolerados de microesferas que pueden ser administrados por vía intravitreal (Zhao, Rodriguez-Villagra, et al. 2017). Por ello, los sistemas microparticulares

de carga múltiple representan una herramienta terapéutica sumamente prometedora para evitar estas complicaciones. Este tipo de formulaciones permiten la encapsulación de diversos fármacos dentro del mismo sistema microparticulado. Este enfoque multimodal de la terapéutica permite no sólo el tratamiento simultáneo de distintas dianas terapéuticas reduciendo la cantidad de material polimérico administrado, sino también una liberación prolongada de los agentes activos evitando sucesivas inyecciones y por tanto los efectos indeseados asociados a las mismas (Herrero-Vanrell et al. 2014; Bravo-Osuna et al. 2016). Así, la liberación controlada de varias combinaciones de productos biotecnológicos con sustancias activas de bajo peso molecular o incluso la combinación de varios fármacos de bajo peso molecular con diferentes mecanismos de acción resulta de gran interés en la terapéutica actual. Asimismo, el uso de una terapia combinada basada en el empleo de microesferas de carga múltiple podría resultar beneficioso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas hereditarias. Mediante estos sistemas, podría realizarse la administración conjunta de terapia génica combinada con fármacos neuroprotectores. Además, la combinación de varias estrategias tecnológicas en la misma formulación puede ser también una herramienta interesante para mejorar el beneficio de los compuestos activos (Bravo-Osuna et al. 2018). Por ejemplo, Osswald y Kang-Mieler elaboraron microesferas de PLGA cargadas con agentes anti-VEGF (ranibizumab o aflibercept) incluyéndolas en un hidrogel inyectable termo sensible. Esta combinación permitió la liberación *in vitro* de los compuestos bioactivos durante casi 200 días a velocidad constante después del *burst* inicial (Osswald and Kang-Mieler 2016). Por todo ello, las microesferas son herramientas emergentes en el desarrollo de nuevas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas crónicas que afectan al segmento posterior del ojo, permitiendo un enfoque más estratégico y personalizado de estas patologías.

Respecto a los sistemas nanoparticulares, como anteriormente se expuso, el reducido tamaño y por ende elevada superficie específica de las nanopartículas, dificulta el empleo de estos sistemas con el fin de lograr una liberación prolongada para el tratamiento de enfermedades que afectan al segmento posterior del ojo. No obstante, diversos trabajos han postulado el desarrollo de sistemas nanoparticulares capaces de ofrecer una liberación de

durante días. Dentro de estos trabajos se encuentran: nanopartículas de ganciclovir para la retinitis por citomegalovirus (Merodio et al. 2002), de dexametasona para el tratamiento de la neovascularización coroidea y de la uveítis (Xu et al. 2007) y de budesónida para el tratamiento de enfermedades inflamatorias oculares (Kompella, Bandi, and Ayalasomayajula 2003).

Sin duda uno de los enfoques más interesantes en el uso de nanopartículas reside en la capacidad de estos sistemas para la direccionalización de los fármacos al lugar de acción (Kaur and Kakkar 2014). Además, pueden lograr la internalización celular por endocitosis o fagocitosis del material encapsulado, que puede incluir proteínas, ADN, ARNip, lípidos y sustancias orgánicas/inorgánicas, proporcionando protección a la integridad molecular del agente terapéutico encapsulado, evitando así su rápida degradación *in vivo* (Janoria et al. 2007).

Otra aproximación sumamente interesante para el campo de la nanotecnología recombinante de ARN aplicada al tratamiento de enfermedades oculares es el empleo de nanopartículas elaboradas con lípidos. Estos sistemas permiten la administración de genes funcionales en la retina mediante vectores no virales. Ofrecen además varias ventajas sobre otros portadores coloidales, tales como el control sobre la liberación, la estabilidad y la ausencia de biotoxicidad debido a la utilización de lípidos fisiológicos (Seyfoddin, Shaw, and Al-Kassas 2010). Sin embargo, una de las limitaciones de este tipo de complejos, es la falta de especificidad celular dando lugar a efectos no deseados. Para solventar estos problemas, se ha planteado el empleo de promotores específicos de células que permitirían la entrega selectiva de los genes encapsulados en este tipo de formulaciones (Wang et al. 2016).

4.3. Liposomas

Los liposomas son sistemas vesiculares compuestos por una o más bicapas lipídicas concéntricas separadas por compartimentos acuosos (Bangham AD 1974; Bangham and Horne 1964; Bitounis et al. 2012). Estos sistemas están íntimamente relacionados con la estructura de las membranas celulares, ya que los lípidos que los constituyen se caracterizan por ser moléculas anfifílicas compuestas por una cabeza hidrofílica (parte polar) y dos

cadena hidrofóbica (parte apolar). Así, en solución acuosa, debido a su naturaleza anfipática, se favorece la formación de bicapas lipídicas. (Bozzuto and Molinari 2015). Las cabezas polares se disponen delimitando los extremos de la bicapa, mientras que las cadenas hidrofóbicas de cada capa se enfrentan entre sí y constituyen un compartimento interno lipofílico que actúa como barrera de permeabilidad, tanto hacia adentro como hacia afuera. Las interacciones de tipo hidrofóbico que se establecen entre las largas cadenas de hidrocarburos, así como las fuerzas de Van der Waals, son las principales responsables de la formación de las bicapas lipídicas. Además, las cabezas polares establecen enlaces de hidrógeno e interacciones polares con las moléculas de agua, fortaleciendo así la arquitectura de la bicapa (Papahadjopoulos D 1973). No obstante, la organización final de la bicapa lipídica depende, en gran medida, de la naturaleza, concentración, temperatura y forma geométrica de los lípidos que la constituyan. La parte polar puede ser no iónica o estar cargada positiva o negativamente. Suele ser un fosfo o glicogruo esterificado, 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. 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 otro parte, los derivados de la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico y fosfolípidos conjugados con polietilenglicol (PEG) son los fosfolípidos sintéticos más empleados (Gabizon et al. 2003).

Además de los fosfolípidos, los liposomas están constituidos por colesterol, agua y electrolitos. El colesterol se incluye para estabilizar la membrana liposomal y para reducir al mínimo la lixividación del principio activo solubilizado en los compartimentos acuosos. Además, el colesterol se puede usar para anclar otras moléculas, como ADN o PEG, a la estructura liposomal para su aplicación en terapia génica o como portadores “silencioso” de medicamentos, evitando la captación por parte de los macrófagos (Hosta-Rigau et al. 2013). La inclusión de electrolitos se utilizan para mejorar la formación de

la bicapa lipídica y además proporcionan la isotonicidad necesaria a la formulación (Meisner D 1995). La gran similitud de los liposomas con las membranas celulares hace que estos sistemas sean tanto biocompatibles como biodegradables (Cholkar et al. 2012).

La naturaleza de las partes hidrofílicas e hidrofóbicas de los liposomas juegan un papel importante en la estrategia de administración de fármacos. 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 vesícula a través de su resto lipófilo (Figura 15) (Joseph and Venkatraman 2017; Honda et al. 2013).

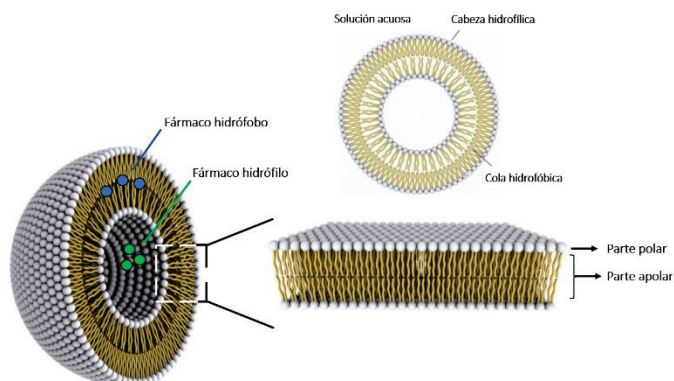


Figura 15. Representación esquemática de la estructura de un liposoma, la bicapa lipídica y la incorporación de fármacos en su interior. Ilustración adaptada del trabajo titulado "Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept" (Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. *ISRN Pharm.* 2012;2012:738432).

Los liposomas pueden clasificarse en función del tamaño (pequeño, intermedio o grande), número de capas (vesículas uni, oligo- y multilamelares) y método de preparación (extrusión, evaporación de fase inversa o congelación/descongelación).

De acuerdo con su tamaño y el número de bicapas que los conforman los liposomas se clasifican en (Figura 16):

-Vesículas unilaminares pequeñas (SUV) (20-200 nm de diámetro): Están formadas por una única bicapa.

INTRODUCCIÓN

-Vesículas unilaminares grandes (LUV) (>200 nm de diámetro): Están formadas por una única bicapa y dado su tamaño, presentan una elevada capacidad de encapsulación.

-Vesículas multilaminares (MLV) (>500 nm de diámetro, entre 5-25 bicapas lipídicas concéntricas): Están formadas por dos o más bicapas lipídicas concéntricas separadas por compartimentos acuosos. Este tipo de vesículas encapsulan preferentemente moléculas liposolubles.

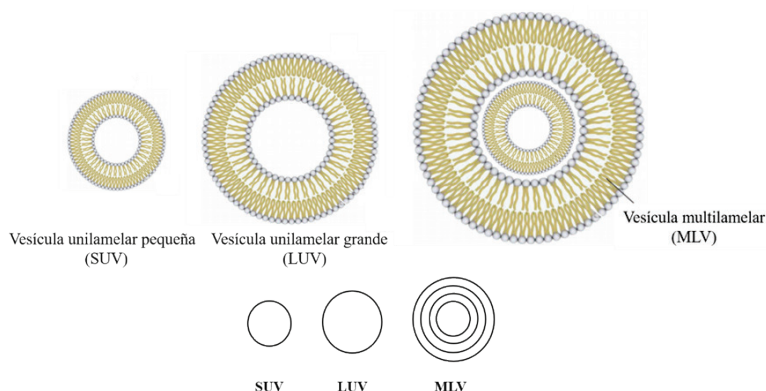


Figura 16. Representación esquemática de la estructura de los distintos tipos de liposomas. Ilustración adaptada del trabajo titulado "Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept" (Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. *ISRN Pharm.* 2012;2012:738432).

Una gran variedad de fármacos (antibióticos, antivirales y antifúngicos) han sido encapsulados en liposomas para administración intraocular (Koc et al. 2010; Janoria et al. 2007; Villegas et al. 2017). También, se han empleado liposomas para la administración intravítrea de oligonucleótidos en el tratamiento de infecciones virales oculares (Bochot et al. 2002; Bochot, Couvreur, and Fattal 2000).

Aunque los liposomas resulten sumamente ventajosos a la hora de proteger moléculas frágiles como anticuerpos u oligonucleótidos de su degradación, presentan inconvenientes que limitan su utilización terapéutica como son su período reducido de conservación y su baja estabilidad en fluidos acuosos (Bochot and Fattal 2012). A esto hay que añadir las dificultades que presenta la esterilización de estos sistemas (Sercombe et al. 2015).

5. TERAPIA FARMACOLÓGICA EN LA NEUROPROTECCIÓN OCULAR

Las neuronas de la retina son vulnerables a cualquier cambio patológico que ocurra en su proximidad, en el nervio óptico, en el cuerpo vítreo, en la matriz extracelular o en los vasos sanguíneos y capilares (Thanos et al. 2014). Son varios los mecanismos de daño implicados en el inicio de la cascada apoptótica en las patologías neurodegenerativas oculares. Entre estos eventos se encuentran la excitotoxicidad, el plegamiento anómalo de proteínas, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación y la privación de neurotrofinas (Baltmr et al. 2010). Además, todos estos mecanismos pueden interactuar y combinarse conduciendo finalmente a la muerte celular.

Dentro de las diferentes estrategias terapéuticas existentes para el tratamiento de las patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo se encuentra la neuroprotección. La neuroprotección puede definirse como el "enfoque terapéutico" destinado a prevenir, obstaculizar y, en algunos casos, revertir el daño de las células neuronales ('European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 3: Treatment principles and options Supported by the EGS Foundation: Part 1: Foreword; Introduction; Glossary; Chapter 3 Treatment principles and options' 2017).

La terapia farmacológica, como estrategia terapéutica en neuroprotección consiste en la administración de moléculas activas destinadas a aumentar la supervivencia celular actuando frente a alguno de los mecanismos desencadenantes de la muerte celular indicados anteriormente.

5.1. Prevención frente a la excitotoxicidad

El glutamato, es un aminoácido esencial que actúa como principal neurotransmisor excitador, mediando en la transmisión de señales desde los fotorreceptores a las células bipolares y las CGR (Beaudoin, Kupershtok, and Demb 2017). No obstante, cuando los niveles de glutamato están anormalmente elevados, se produce un fenómeno llamado excitotoxicidad desencadenando la

muerte de las células neuronales (Doble 1999; Mehta et al. 2013). Son varios los estudios que han confirmado el efecto neurotóxico del glutamato en la retina (Liu et al. 2013; Casson 2006; Delyfer et al. 2005; Guo et al. 2006). Además, se ha postulado que el glutamato liberado por las células apoptóticas puede desencadenar la muerte de las células colindantes no dañadas en origen, iniciando así una cascada de degeneración, lesiones celulares y muerte (Cheung, Guo, and Cordeiro 2008; Osborne et al. 1999).

Cuando las concentraciones de glutamato son muy elevadas, se produce una hiperestimulación de los receptores NMDA (N-metilD-aspartato) provocando un incremento anormal del calcio intracelular. Este aumento en los niveles intracelulares de Ca^{+2} provoca la liberación por parte de las mitocondrias del factor inductor de la apoptosis (*apoptotic inducing factor* (AIF)), el cual se transloca al núcleo e inicia la condensación de la cromatina nuclear y la fragmentación del ADN, desencadenando así la vía apoptótica independiente de caspasas. Así mismo, el incremento de calcio intracelular induce la liberación del citocromo C mitocondrial que produce a su vez la activación de la caspasa-9 y la caspasa-3. Esta última es un potente activador de la fragmentación del material genético nuclear y de las proteasas dependientes de calcio. Además, los altos niveles de Ca^{+2} en el medio intracelular también desencadenan la producción de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), la cual participa en la generación de radicales libres tales como el óxido nítrico.

Así, la búsqueda de moléculas capaces de ejercer una modulación del receptor NMDA ha constituido un área importante en la investigación de estrategias neuroprotectoras (Dong et al. 2008). Dentro de los antagonistas del receptor NMDA más estudiados se encuentran la molécula MK801 o maleato de dizocilpina (5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] cicloheptan-5,10-imina) y la memantina.

El MK801, es un antagonista no competitivo del receptor NMDA (el-Asrar 1992). Este compuesto ha demostrado efecto neuroprotector en el sistema nervioso central (SNC) (Tamura 1993; Gerriets et al. 2003) y sobre las CGR tanto *in vitro* (Tsuda 2004) como *in vivo* en modelos experimentales de daño del nervio óptico (Russelakis-Carneiro 1996), lesión retiniana inducida por láser

(Solberg 1997), hipertensión ocular (Guo et al. 2006) e isquemia retiniana inducida por elevación de la PIO (Russo 2008). Desafortunadamente, este compuesto no puede emplearse en la práctica clínica debido a su efecto neurotóxico (Fix 1993). La elevada afinidad a los receptores NMDA y su largo tiempo de permanencia en la unión, son los principales causantes de la citotoxicidad asociada a este compuesto (Lipton 1993).

La memantina, también conocida como 1-amino-3,5-dimetiladamantano, es una derivada estructural de la amantadina (Cheung, Guo, and Cordeiro 2008). Se trata de un antagonista no competitivo del receptor NMDA, constituido por tres anillos, dos grupos laterales metilo ($-\text{CH}_3$), responsables de su afinidad a los receptores NMDA, y un grupo amino (NH_2) (Figura 17) (Lipton 2006). 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+} en las células. Investigaciones llevadas a cabo con la memantina como agente neuroprotector para el tratamiento del glaucoma, han demostrado una reducción en la muerte neuronal inducida por glutamato tanto *in vitro* (Pellegrini 1993) como *in vivo* en modelos murinos de isquemia e hipertensión ocular (Kim 2002; Gabelt et al. 2012; Atorf et al. 2013). La memantina está aprobada por la FDA desde 2003 para el tratamiento del Alzheimer en sus estadios de moderado a grave (Reisberg et al. 2003). Así mismo ha mostrado ser eficaz para el tratamiento de la discinesia presente en la enfermedad de Parkinson (Victorin and Widner 2016). Sin embargo, este agente neuroprotector no logró demostrar un efecto superior al placebo en pacientes glaucomatosos (fase III de dos ensayos clínicos realizados en pacientes glaucomatosos (NCT00141882 y NCT00168350)). De acuerdo con los informes posteriores, esto pudo deberse a la densidad variable en el número de receptores NMDA presentes en las CGR, así como a la existencia de otros múltiples mecanismos de apoptosis presentes en la degeneración de las CGR (Weinreb et al. 2018).

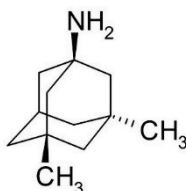


Figura 17. Estructura de la memantina

Otra posible ruta neuroprotectora es como mediador sobre los receptores de acetilcolina (ACh). En ese sentido, la galantamina, un inhibidor de la acetilcolin-esterasa, activa los subtipos M1 y M4 del receptor muscarínico de ACh, produciendo la protección de las CGR (Almasieh et al. 2010).

5.2. Prevención frente a la disfunción mitocondrial

En la membrana interna mitocondrial se aloja la cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria. Su misión es la de crear el gradiente electroquímico que se utiliza para la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa). Pero además de proveer de energía a toda la célula, las mitocondrias también median en su muerte a través de la apoptosis. Además, sintetizan proteínas e intervienen en el metabolismo de varias sustancias.

Se ha comprobado que tanto la disminución en el potencial de membrana mitocondrial, como el aumento de la permeabilidad de membrana son factores implicados en la apoptosis de las CGR en procesos neurodegenerativos (Tezel and Yang 2004; Tatton et al. 2001). Por otro lado, diversos estudios han confirmado que factores como la hipoxia, la presencia del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el estrés oxidativo pueden desencadenar la muerte celular mediada por las mitocondrias (McElroy and Chandel 2017; Galkin et al. 2014). En condiciones de estrés, el incremento de Ca^{2+} citosólico es almacenado en las mitocondrias conduciendo a una acumulación anormal del mismo que produce la despolarización de la membrana y la producción de especies reactivas de oxígeno (Finsterer et al. 2018). La pérdida del potencial de membrana conduce a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial permitiendo la liberación de proteínas inductoras de la apoptosis como el citocromo C y la CPP32 (proteína activadora de la caspasa-3) (Nickells 1999; Vercesi et al. 2018; Rasheed, Tabassum, and Parvez 2017).

Diversas moléculas han demostrado potencial para la mejora de la bioenergética celular y la prevención de la despolarización mitocondrial. Entre ellas se encuentran el ácido lipoico, la eritropoyetina, la ceramida o la coenzima Q10 (Chen et al. 2018; Kong et al. 2018; Millet et al. 2016; Nakajima et al. 2008). La coenzima Q10, que será descrita con más detalle en el siguiente capítulo, ha

demostrado tener un alto potencial neuroprotector para la regulación de la disfunción mitocondrial.

5.3. Prevención frente al plegamiento anómalo de proteínas

El plegamiento anómalo de proteínas (conocidos en inglés como *protein misfolding*) conduce a la formación de agregados proteicos en tejidos específicos y se ha asociado a enfermedades degenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington o el glaucoma, entre otras (Pepys 2006; Bayer et al. 2002). En este contexto se enmarca el plegamiento erróneo de la proteína precursora amiloide, que conduce a la formación de depósitos de proteína β -amiloide anómala, concretamente del tipo β -amiloide 42. Este tipo de proteína es más propensa a la autoagregación y su formación ha sido asociada a procesos neurodegenerativos (Zhou et al. 2018; Normando et al. 2009). Los depósitos amieloides han sido relacionados con la patogénesis del daño retinal (Shimazawa et al. 2008), de la DMAE (Johnson 2002) y del glaucoma (Goldblum 2007). Así, diversas sustancias que impiden los agregados β -amiloide, como anticuerpos anti- β A y el Rojo Congo (sal de sodio de 3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diyl)bis(4-aminonaftalen-1-ácido sulfónico) han demostrado reducir la apoptosis de las CGR tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Guo et al. 2007; Lorenzo and Yankner 1994).

Por otro lado, existen un grupo de chaperonas denominadas proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* - HSP), que median diversas funciones fisiológicas dentro de la célula. Los niveles de HSP se incrementan como mecanismo de respuesta celular en condiciones de estrés celular (Soti et al. 2005). La sobreexpresión de las HSP atenúa la respuesta inflamatoria y confiere protección a las células volviéndolas más resistentes a la apoptosis (Coronato et al. 1999). En este sentido, la administración sistémica de un agente antiulceroso, *geranylgeranylacetone*, demostró aumentar la expresión de la proteína HSP-72, generando una reducción significativa en la pérdida de CGR en un modelo murino de glaucoma (Ishii, Kwong, and Caprioli 2003).

5.4. Prevención frente al estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición patológica en la que la tasa de la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species* – ROS) excede la capacidad antioxidante del cuerpo (Baltmr et al. 2010). Estos metabolitos de oxígeno que incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, se genera principalmente en niveles relativamente bajos dentro de la cadena de transporte de electrones durante el metabolismo aeróbico, desempeñando papeles importantes en la transducción de señales. Sin embargo, bajo condiciones patológicas se produce un incremento anómalo en la producción de ROS, fruto del agotamiento energético y el fallo mitocondrial, participando en la activación de la apoptosis (Nita and Grzybowski 2016). El incremento de ROS también conduce a un incremento de la peroxidación lipídica y proteica, así como a la degradación de ácidos grasos monocatenarios (Finkel and Holbrook 2000; Siu and To 2002). Además, se ha comprobado que el estrés oxidativo induce la activación y disfunción de las células de Müller, generando a su vez más material oxidativo (Zhang, Gillies, et al. 2018; Tezel 2003).

La retina es particularmente susceptible de sufrir estos procesos de oxidación ya que presenta un ambiente pro-oxidativo: (I) la existencia de compuestos fotosensibilizadores estimula la generación de radicales libres; (II) las CGR y los fotorreceptores son células altamente susceptibles de sufrir peroxidación lipídica, ya que son ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Además, en dichas células, los procesos metabólicos como la síntesis de ATP y la degradación de oxígeno están aumentados, mientras que la velocidad de regeneración celular está disminuida; (III) la elevada vascularización de la coroides genera una alta concentración de oxígeno a nivel de la retina, pudiendo favorecer la generación de ROS cuando el flujo sanguíneo está mal regulado y la cantidad de antioxidantes en el organismo es bajo.

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) (Hammond and Fletcher 2012). No obstante, estos mecanismos se ven superados por los pro-oxidantes en condiciones patológicas. Así, el estrés oxidativo se ha encontrado implicado en trastornos neurodegenerativos oculares tales como el glaucoma, la DMAE y

la RD. Son múltiples los antioxidantes que han sido investigados como potenciales agentes neuroprotectores. Entre estos se encuentran: la melatonina, la vitamina E o el extracto procedente de las hojas de Ginkgo Biloba (EGb761). La melatonina y la vitamina E serán descritas con mayor detalle en esta memoria.

El extracto de Ginkgo biloba (EGb761) contiene dos compuestos principales: 24% de glucósidos de flavonas y 6% de terpenoides. Esta sustancia es un excelente antioxidante, inhibiendo la apoptosis inducida químicamente (Thiagarajan et al. 2002). Así mismo, también presenta actividad antiinflamatoria, antiplaquetaria y un efecto vasomodulador aumentando la velocidad del flujo sanguíneo ocular (Chung et al. 1999). Este extracto ha demostrado efectos neuroprotectores en el tratamiento del glaucoma y la DMAE (Hirooka et al. 2004; Evans 2013). Dentro de los mecanismos responsables del efecto neuroprotector del EGb 761 se han señalado: la capacidad antioxidante de los flavonoides, la inhibición de la forma patológica inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) (Bastianetto, Zheng, and Quirion 2000) y un posible efecto beneficioso sobre los depósitos β -amiloides (Augustin et al. 2009).

5.5. Estrategias antiinflamatorias e inmunológicas

Diversos estudios han puesto de manifiesto la participación del sistema inmune y los procesos inflamatorios en las patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo (Vohra, Tsai, and Kolko 2013). Además, el daño neuronal sostenido con el que cursan estas enfermedades provoca la activación de la microglía, la cual actúa desencadenando procesos inflamatorios (Cunningham 2013). Dentro de los mecanismos inflamatorios observados se encuentra la liberación de TNF- α , una potente citoquina proinflamatoria, cuya unión al receptor de muerte TNF-R1 desencadena el inicio de la apoptosis (Tezel and Yang 2004). Así, el GLC756, un fármaco antiglaucomatoso y dopaminérgico que ha demostrado inhibir la liberación de TNF- α , ha sido ampliamente estudiado dentro de la terapia antiinflamatoria e inmunomoduladora (Laengle et al. 2005; Laengle, Trendelenburg, et al. 2006; Laengle, Markstein, et al. 2006).

Dentro de los fármacos antiinflamatorios más empleados como agentes neuroprotectores en patologías oculares se encuentran: los corticoesteroides (dexametasona) y los antiinflamatorios no esteroideos (ketorolaco, diclofenaco, bronfenaco) (Shen et al. 2014; Nadal-Nicolas et al. 2016; Rodrigues et al. 2016).

Por otro lado, han surgido nuevas sustancias capaces de ejercer como agentes neuroprotectores frente a los procesos inflamatorios. Uno de los más prometedores es el copolímero-1, también conocido como acetato de glatiramer, el cual está aprobado por la FDA para el tratamiento de la 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, ha demostrado tener actividad neuroprotectora sobre las CGR en modelos animales (Bakalash et al. 2003; Kipnis et al. 2000; Schori et al. 2001). Así mismo, la curcumina (diferuloilmetano) el componente principal de la popular especia de la India cúrcuma (*Curcuma longa*), es otro compuesto sumamente interesante. La curcumina presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales (Pescosolido et al. 2014). Recientemente ha demostrado promover la supervivencia de las CGR en un modelo animal de glaucoma por hipertensión ocular (Davis et al. 2018).

5.6. Suplementación con factores neurotróficos exógenos

Los factores neurotróficos son una familia de proteínas ampliamente expresadas en la retina que tienen un papel indispensable en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular (Unsicker 2013). Dentro de estos se encuentran: el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Garcia, Hollborn, and Bringmann 2017), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Mysona et al. 2018), y las neurotrofinas NT3, NT4 y NT5 (Cui and Harvey 2000). Diversos estudios de investigación han demostrado que el flujo de factores neurotróficos entre el SNC y las CGR se reduce notablemente en los procesos patológicos, tanto el transporte axonal retrógrado como en anterógrado (Hayreh 1979; Anderson and Hendrickson 1974; Rudzinski, Wong, and Saragovi 2004). Esto lleva a una reducción en el soporte trófico neuronal, que a su vez compromete

la supervivencia de las neuronas desencadenando la apoptosis (Berkelaar et al. 1994).

A nivel ocular, el NGF ha demostrado ejercer efectos neuroprotectores tanto en modelos *in vivo* de glaucoma por hipertensión ocular (Colafrancesco 2010) como en pacientes glaucomatosos (Lambiase et al. 2009). El CNTF (factor neurotrófico 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. Esta neurotrofina ha demostrado proteger las CGR (Pease et al. 2009), así como los fotorreceptores (Rhee et al. 2013). Por otro lado, tanto el BDNF como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) son agentes neurotróficos que han sido ampliamente estudiados para la supervivencia de las CGR y de los fotorreceptores. Sus efectos neuroprotectores se han demostrado en diversas patologías neurodegenerativas (Nakazawa, Tamai, and Mori 2002; Kyhn et al. 2009). Sus estructuras, actividades y mecanismos de acción serán detallados a continuación.

6. AGENTES NEUROPROTECTORES PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS DEL SEGMENTO POSTERIOR DEL OJO SELECCIONADOS PARA LOS TRABAJOS EXPERIMENTALES

6.1. Factores neurotróficos

Como se acaba de comentar, los factores neurotróficos o neurotrofinas son una familia de biomoléculas, que actúan favoreciendo el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las neuronas maduras, así como su desarrollo. Por ellos, estas moléculas son capaces de atenuar o revertir la degeneración neuronal. Si bien son secretadas por tejidos de todo el cuerpo, se encuentran en mayor abundancia en el SNC. La presencia de neuronas asociadas al SNC en el entramado estructural de la retina, la convierte en una diana terapéutica potencial para la terapia con agentes neurotróficos. Así, la búsqueda de factores tróficos que detengan la degeneración y aumenten la supervivencia y la capacidad funcional de las neuronas remanentes en las

patologías degenerativas, ha despertado un gran interés. Se han propuesto varios factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o el factor neurotrófico ciliar (CNTF) como alternativas terapéuticas dirigidas al restablecimiento y protección de las células neuronales (Thanos and Emerich 2005).

6.1.1 Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (*Glial cell-derived neurotrophic factor* – GDNF)

El factor neurotrófico derivado de la glía (*Glial cell line-derived neurotrophic factor* - GDNF) fue identificado inicialmente como un factor de supervivencia para las neuronas dopaminérgicas en el sistema nervioso maduro, siendo la molécula fundadora de los ligandos de la Familia de GDNF (*GDNF Family of Ligands* – GFLs), la cual consta de 4 miembros: (I) GDNF, (II) neuroturtina (NRTN), (III) artemina (ARTN) y (IV) persepina (PSPN). El GDNF es un miembro lejano de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y fue encontrado por primera vez en el medio de cultivo de la línea celular B49 de rata, identificándose como un polipéptido homodimérico glicosilado de 211 aminoácidos (aa) altamente conservado (93% de homología entre el gen de la rata con el humano). El polipéptido activo resulta de la unión de dos monómeros idénticos de 134 aa cada uno. La estructura del monómero incluye dos regiones β -plegadas denominadas dedos y una cadena α -hélice (Figura 18). El homodímero sufre diferente grado de glucosilación que determina su peso molecular (40.000 – 45.000 g/mol) alcanzando la forma activa como dímeros a través de uniones disulfato. Estas uniones intramonoméricas corresponden a patrones conservados de cisteínas (Cys68-Cys131, Cys72-Cys133 y Cys41-Cys102) dando lugar a la conformación tridimensional de la proteína (Lin et al. 1993; Hui et al. 1999; Haniu et al. 1996). El GDNF ejerce sus efectos biológicos a través de la unión y activación al receptor GFR α 1, aunque también puede unirse con menor afinidad a los receptores GFR α 2 y GFR α 3 (Jing et al. 1997; Jing et al. 1996). La unión directa de GDNF a su receptor de superficie GFR α 1 e indirectamente al receptor transmembrana RET (Receptor tirosina Kinasa, TRK) induce la formación de un complejo (GDNF-GFR α 1-RET) que activa la señalización de dos vías intracelulares las cuales

actúan estimulando la supervivencia y la diferenciación neuronal (Kholodilov et al. 2011). La región β -plegada de la estructura proteica del GDNF participa en la unión al receptor, por lo que es esencial para la acción biológica. La región aminoacídica 76-91 de la α -hélice es fundamental para su actividad neurotrófica y los últimos 17 aa del extremo carboxi terminal intervienen en la estabilidad estructural (Eketjall et al. 1999).

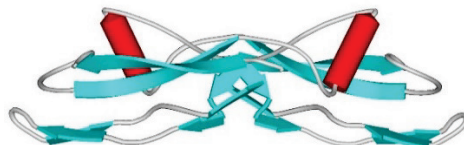


Figura 18. Estructura cuaternaria del GDNF. Imagen obtenida de [<http://www.creativebiolabs.com>].

El GDNF se expresa ampliamente en una gran variedad de neuronas centrales y periféricas. Las primeras evidencias de su actividad farmacológica fueron observadas para la enfermedad del Parkinson, donde se vio una clara supervivencia de neuronas dopaminérgicas y motoneuronas (Grondin and Gash 1998). El espectro de aplicación de esta macromolécula 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 inervación entérica, la modulación de la espermatogénesis o la formación de los riñones (Wordinger et al. 2003; Sariola and Saarma 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. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han evaluado la actividad promotora de la supervivencia del GDNF en las células ganglionares de la retina (CGR) durante la degeneración de la retina (Kyhn et al. 2009; Lindqvist et al. 2004). Asimismo, el GDNF ha manifestado una elevada eficacia neuroprotectora al producir una disminución de la degeneración de los fotorreceptores en modelos animales como el modelo de ratón rd1/rd1 de RP (Frasson et al. 1999) y en el modelo murino de ratones rd10 de RP (Ohnaka et al. 2012). El efecto

neuroprotector del GDNF relacionado con el rescate de los fotorreceptores ha sido atribuido a diversos mecanismos directos sobre ellos mismos e indirectos sobre la glía. Por un lado, se ha postulado que este factor neurotrófico ejerce un aumento de la expresión de opsina y una mejora del mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial en los fotorreceptores, que conllevan a su vez a una disminución de la muerte celular por apoptosis (Politi, Rotstein, and Carri 2001; Hauck et al. 2006). Por otro lado, el GDNF actúa activando las células gliales retinales de Müller, las cuales, a su vez, liberan moléculas como la osteopontina encargadas de la supervivencia de los fotorreceptores (Del Rio et al. 2011; Kimura et al. 2016). Además, se ha observado que el GDNF regula el transportador de glutamato/aspartato (GLAST) en la glía de Müller. La deficiencia en este transportador conduce a la muerte espontánea de las CGR y a la degeneración del nervio óptico sin que se produzca un aumento de la PIO, de forma similar a las características patológicas observadas en el glaucoma de tensión normal.

Por ello, el empleo de este factor neurotrófico se presenta como una estrategia terapéutica sumamente interesante para el glaucoma incluido el de tensión normal (Koeberle and Bahr 2008). Además, diversos autores han señalado un papel fundamental de este factor neurotrófico en la regulación de la permeabilidad vascular de la retina, ejerciendo una acción limitante de esta a través de las uniones existentes en las células capilares endoteliales que se encuentran en la barrera hematorretiniana. Así, el GDNF parece interferir en la disminución de la hiperpermeabilidad que se origina en algunas patologías retinianas como son la RD o la DMAE (Nishikiori et al. 2007).

Se ha demostrado en distintos trabajos que la administración exógena de la proteína GDNF recombinante humana produce efectos similares a la proteína nativa, incrementando la supervivencia de las CGR y ralentizando la muerte de los fotorreceptores. Así, la terapia neuroprotectora basada en el uso exógeno de GDNF ha demostrado eficacia en modelos animales de retinosis pigmentosa (Read, Cashman, and Kumar-Singh 2010), trasplantes de retina (Yang et al. 2010), glaucoma (Checa-Casalengua 2011; Jiang et al. 2007), retinopatía diabética (Osanai et al. 2010) e isquemia retiniana (Kyhn et al. 2009). Varios autores han explorado el desarrollo de sistemas de cesión controlada

empleando GDNF como agente activo para el tratamiento de enfermedades oculares. Ward et al. demostraron que la administración de microesferas cargadas con GDNF protegió a las CGR frente a la degeneración, tanto en estadios tempranos como avanzados, en un modelo de glaucoma en ratón (DBA/2J) (Ward et al. 2007). Un año después, Jiang et al. evaluaron la misma formulación en un modelo animal de glaucoma con aumento de la PIO mediante inyección hipersalina en rata. Este tratamiento condujo a un rescate significativo de las RGC, una reducción en la pérdida de la capa plexiforme interna de la retina y una disminución en la activación de la glía (Jiang et al. 2007). Igualmente, nuestro grupo de investigación demostró que tras la administración intravítrea de una formulación de microesferas biodegradables que contenían GDNF y Vitamina E en ese mismo modelo animal de glaucoma, se producía un incremento significativo en la supervivencia de las CGR (Checa-Casalengua, Jiang, Bravo-Osuna, Tucker, Molina-Martinez, et al. 2011).

Por todo lo anteriormente expuesto, el empleo de este factor neurotrófico se postula como una interesante estrategia terapéutica para el desarrollo de terapias neuroprotectoras en el tratamiento de patologías que afectan a la retina y al nervio óptico.

6.1.2 Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor* - BDNF)

El factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor* – BDNF) es un importante miembro de la familia del factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor* – NGF). Esta familia de neurotrofinas compuesta por al menos cuatro proteínas, incluyendo NGF (la cual da nombre a la familia), BDNF, NT3 y NT4/5, está relacionada con la diferenciación y supervivencia de subpoblaciones neuronales específicas tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. El BDNF se purificó por primera vez como un factor de crecimiento que promovía la supervivencia y el desarrollo de las neuritas de neuronas sensoriales embrionarias de pollo cultivadas en cerebro de cerdo (Barde, Edgar, and Thoenen 1982). El BDNF recombinante humano es un homodímero de 27.000 g/mol constituido por dos subunidades de 119 aminoácidos unidos por fuertes interacciones no covalentes. Presenta una estructura tridimensional, donde cada monómero consta de tres pares de

INTRODUCCIÓN

láminas β antiparalelas conectadas a cuatro bucles de cadenas β que contienen 3 enlaces disulfuro formando anillos cerrados denominados nudos de cisteína (Figura 19) (Binder and Scharfman 2004; Khalin et al. 2015). Este factor neurotrófico ejerce sus efectos pro-supervivencia uniéndose a un receptor de superficie celular de alta afinidad llamado receptor gp145/TrkB. Esta unión activa diferentes vías de señalización. Unas vías involucran a la fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K)/Akt, conduciendo a la desactivación de dianas proapoptóticas. Otras vías actúan sobre la proteína quinasa regulada por señalización extracelular (ERK), que da como resultado la fosforilación de la proteína CREB (*cAMP Response Element-Binding*) que actúa como factor de transcripción uniéndose a determinadas secuencias de ADN (elementos de respuesta a AMPc - *cAMP response element-binding*), induciendo la transcripción de diversos genes asociados con la supervivencia neuronal (Bonni et al. 1999; Brunet, Datta, and Greenberg 2001; Arthur et al. 2004).

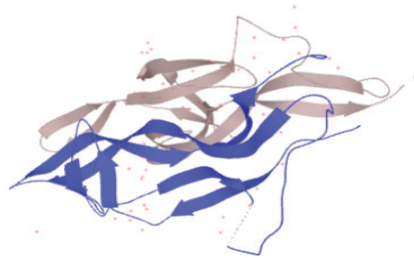


Figura 19. Estructura cuaternaria del BDNF. Imagen obtenida de [<https://www.uniprot.org/uniprot/P23560>].

El BDNF se encuentra ampliamente expresado en todo el sistema nervioso central y en los tejidos periféricos incluyendo el hígado, los músculos, el páncreas, el colon y el intestino delgado. Se han descrito altos niveles de expresión de esta neurotrofina en el cerebelo, el hipocampo, la placenta y el tejido ocular fetal (Li et al. 2015; Shojaei et al. 2015; Prince, Maloyan, and Myatt 2017). Como anteriormente se comentó, esta macromolécula está implicada en importantes eventos como son la regulación de la plasticidad neuronal, el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia celular y la memoria a largo plazo (Allen et al. 2013). Por ello, el empleo de BDNF ha sido investigado para el tratamiento del Alzheimer (Nagahara et al. 2009), Parkinson (Levivier et al. 1995), la enfermedad de Huntington (Bemelmans et al. 1999), los derrames

cerebrales (Schabitz et al. 1997), la depresión (Li et al. 2015), la esquizofrenia (Koeva et al. 2014) o la esclerosis múltiple (Makar et al. 2009).

En el ojo, los receptores de BDNF están ubicados en la capa nuclear interna de la retina, en la capa de CGR y en los axones del nervio óptico (Quigley et al. 2000). Se encuentra expresado en distintas células de la retina, incluidas las células gliales de Müller, las células amacrinas, los fotorreceptores y las CGR (Whitmire et al. 2011; Rohrer et al. 1999; Cellierino and Kohler 1997; Di Polo et al. 2000). Se ha sugerido que el bloqueo del transporte axonal que conduce a un déficit de BDNF en el cuerpo celular, podría estar relacionado con la muerte de las CGR en el glaucoma (Pease et al. 2000; Gupta et al. 2014). Así, Ghaffariyeh et al. describieron como niveles de BDNF en el suero de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y en las lágrimas de pacientes con glaucoma de tensión normal, que resultaron ser significativamente más bajos que los de los sujetos control (Ghaffariyeh et al. 2009; Ghaffariyeh et al. 2011). Recientemente, un estudio señaló la relación entre el déficit en esta neurotrofina y el adelgazamiento de la capa nuclear externa de la retina en pacientes con DMAE, sugiriendo que los niveles de BDNF detectados podrían ser insuficientes para proteger a los fotorreceptores de la degeneración (Afarid et al. 2015; Inanc Tekin et al. 2018).

En los últimos años, esta neurotrofina ha sido particularmente estudiada en la supervivencia de las CGR y de los fotorreceptores en diversas patologías neurodegenerativas oftálmicas (Caffe et al. 2001; Pernet and Di Polo 2006; Domenici et al. 2014). El BDNF ha demostrado una elevada eficacia terapéutica en modelos de glaucoma (Domenici et al. 2014), de RP (Zhang et al. 2009), de desprendimiento de retina (Lewis et al. 1999), así como de axotomía del nervio óptico (Galindo-Romero et al. 2013; Lee et al. 2005; Krueger-Naug et al. 2003; Nakazawa, Tamai, and Mori 2002).

Además, el BDNF parece ejercer una importante acción protectora neuronal frente al daño generado por excitotoxicidad y estrés oxidativo, dos mecanismos comunes en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Schizas et al. 2018; Valvassori et al. 2015).

6.2. Vitamina E

La vitamina E es una vitamina liposoluble perteneciente a la familia de compuestos poliprenoides. En estado natural presenta ocho formas isoméricas: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos ellos se caracterizan por presentar un anillo aromático, llamado cromano, con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide saturada. Si dicha cadena es saturada, los isómeros son tocoferoles y si es insaturada (tres residuos insaturados) son tocotrienoles. Para ambas familias, en función del número y la disposición de los sustituyentes metilo unidos al anillo aromático, se distinguen cuatro formas de compuestos: alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ). El isómero predominante que se encuentra en el cuerpo es el α -tocoferol, el cual tiene tres grupos metilo además del grupo hidroxilo unido al anillo cromano (Figura 20). Si bien todas las formas presentan su propia actividad biológica, el α -tocoferol ha demostrado ser la más activa (Wang and Quinn 1999; Niki and Traber 2012).

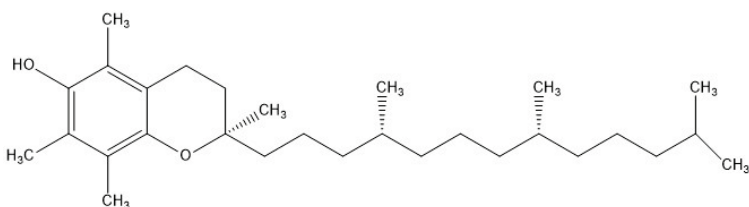


Figura 20. Estructura del α -tocoferol

Esta vitamina liposoluble se encuentra ampliamente distribuida en orgánulos de almacenamiento de lípidos y membranas celulares de todo el organismo. La distribución subcelular del α -tocoferol no es uniforme y los lisosomas están particularmente enriquecidos en él en comparación con otras membranas subcelulares.

Las funciones fisiológicas y bioquímicas en las que se ha descrito la participación de la vitamina E son numerosas (Azzi and Stocker 2000). El mecanismo molecular de estas funciones está mediado por su acción antioxidante, así como por su papel como estabilizador de la membrana. Dado que la vitamina E es uno de los principales secuestradores de radicales libres en la membrana celular de los mamíferos, su actividad como agente

antioxidante no enzimático ha sido ampliamente estudiado (Chow 1991; Arias-Alvarez et al. 2018). A nivel biológico, el α -tocoferol actúa protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares frente al daño inducido por estrés oxidativo e inhibiendo la peroxidación lipídica, manteniendo así la funcionalidad de la membrana celular. También se encarga de retrasar el envejecimiento celular ocasionado por la oxidación, protegiendo a las células de la acción de los radicales libres y previniendo las enfermedades crónicas (Tao et al. 2010; Carrion-Garcia et al. 2017).

Como ya se ha adelantado, la actividad antioxidante de la vitamina E tiene lugar mediante la eliminación de especies reactivas de oxígeno, siendo capaz de romper las reacciones de propagación de la cadena peroxílica. En este sentido, la vitamina E actúa como un agente reductor donando electrones a las especies oxidadas, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo destructor de estas (Figura 21). El electrón desapareado del radical de vitamina E así formado, tiende a deslocalizarse, haciendo que el radical sea más estable. Esto ocurre gracias a su estructura molecular, ya que su grupo fenólico es capaz de fijar radicales libres como $O^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$ y OH^{\cdot} . Finalmente, la regeneración de la vitamina E ocurre mediante reacciones de ciclo redox que involucran a la coenzima Q (Niki 1987; Cardenas and Ghosh 2013).

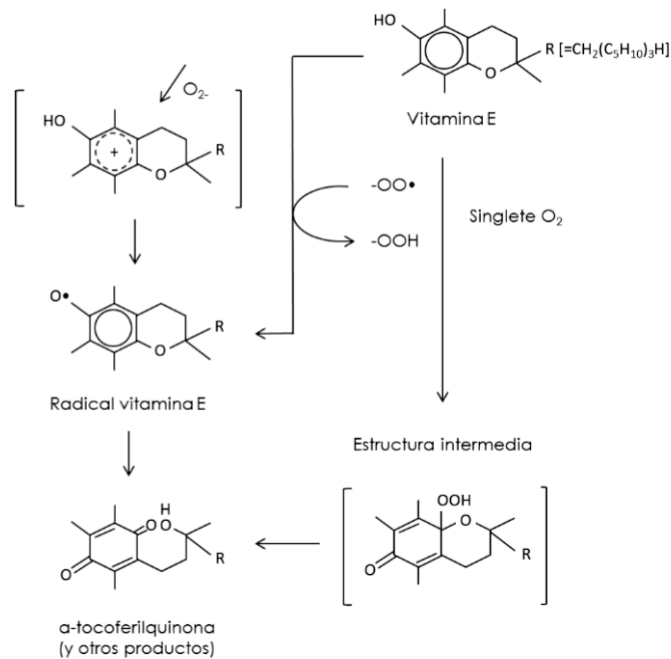


Figura 21. Mecanismo antioxidante de la vitamina E

Como se ha comentado anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los factores implicados en las enfermedades oculares. En la DMAE el exceso de radicales libres daña a los fotorreceptores de la retina, células que de por sí están sujetas al estrés oxidativo debido a la exposición combinada a la luz y el oxígeno. El resultado final es la incapacidad del epitelio pigmentario de la retina para prevenir estas moléculas dañadas, dando lugar a la acumulación de materiales de desecho en la porción basal del epitelio. Además, los tejidos oculares son sensibles a los efectos de los radicales libres oxigenados que causan el estrés oxidativo, sobre todo en el cristalino y la retina (Johnsen-Soriano et al. 2007).

Por su parte, en el glaucoma, los radicales libres producen un daño al ADN en la malla trabecular del ojo humano, pudiendo comprometer el flujo de salida del humor acuoso y, en consecuencia, aumentar la presión intraocular y dañar las células ganglionares de la retina (Ramdas et al. 2012). Por ello, el empleo de vitamina E ha sido investigado para el tratamiento de diversas patologías oculares que cursan con daño oxidativo (Fernandez-Araque et al.

2017). En la DMAE, Chew et al. confirmaron tras un seguimiento a largo plazo (entre 6 y 10 años) que la suplementación con antioxidantes (vitamina E, vitamina C, betacaroteno y zinc) disminuyó significativamente ($p > 0,001$) el desarrollo de DMAE avanzada (Chew et al. 2013). Igualmente, una formulación combinada de vitamina E/taurina/diltiazem demostró disminuir la progresión de la pérdida de campo visual en pacientes con RP (Pasantes-Morales, Quiroz, and Quesada 2002).

Por otro lado, se ha confirmado que la vitamina E ejercer una protección de las neuronas frente a la toxicidad inducida por glutamato no mediada por receptor. De acuerdo a la información previamente citada, la excitotoxicidad por glutamato es un importante contribuyente a la muerte celular patológica dentro del sistema nervioso (Sen, Khanna, and Roy 2004). Además, la vitamina E ejerce también una actividad antiproliferativa, por lo que su empleo en formulaciones destinadas a administración intraocular supondría un beneficio adicional, ya que podría disminuir los riesgos de desprendimiento de retina asociados a las inyecciones repetidas debido a la proliferación de fibroblastos (Alayoubi et al. 2013; Larrosa et al. 1997).

6.3. Dexametasona

La dexametasona (9-fluoro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona) (Figura 22) es un corticoide fluorado de larga duración, elevada potencia antiinflamatoria e inmunosupresora y baja actividad mineralocorticoide.

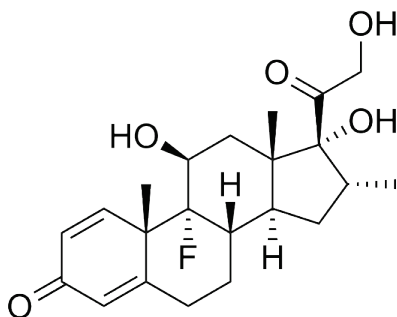


Figura 22. Estructura de la dexametasona

INTRODUCCIÓN

En base a sus propiedades fisicoquímicas, la dexametasona se presenta como un polvo cristalino, blanco o casi blanco, que funde aproximadamente a 255°C. Presenta un peso molecular de 392.467g/mol. Es prácticamente insoluble en agua, 10 mg/100 mL a 25 °C y 11,6 mg/100 mL a 37 °C, muy soluble en acetona, bastante soluble en etanol (1 en 42) y poco soluble en diclorometano (1 en 165). En estado sólido es estable frente al oxígeno y al aire, y bastante sensible a la luz, especialmente en solución. Por ello, debe ser almacenada en oscuridad, a una temperatura de 2-8 °C y en un ambiente seco (Ministerio de Sanidad 2015; E.M. 1973).

La dexametasona es uno de los corticoides más potentes usados en el tratamiento de procesos de inflamación y en enfermedades autoinmunes (ej: artritis reumatoide). Es unas 30 veces más potente que la hidrocortisona y unas 5 más que la prednisona (Hardy et al. 2001). Esta molécula ejerce una regulación a la baja de la expresión de citoquinas proinflamatorias (ej: IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-1RA), quimiocinas (ej: CCL-5 y CXCL-10), lipocortina, y metaloproteasas (ej: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 y MMP-13) (Bian et al. 2016; Coursey et al. 2015). Además, interviene en la reducción del edema, la deposición de fibrina, la oclusión venosa y la migración de células inflamatorias (Rodríguez Villanueva et al. 2016). La dexametasona, como otros glucocorticoides (GC) ejerce su acción mediante su unión a la isoforma α del receptor intracitoplasmático específico (RG). Esta unión promueve la disociación de sus interacciones con la proteína hsp90 e induce un cambio en la conformación del receptor que tiene como resultado la activación del mismo y su translocación al núcleo celular, donde se une a determinadas secuencias de ADN. Esto da lugar a la inducción o represión de la transcripción genética (Cosío B.G. 2004). Así mismo, existen evidencias de que el complejo GC-RG es capaz de actuar también regulando genes indirectamente, a través de la síntesis de proteínas antiinflamatorias o, lo que es más importante, por mecanismos de transrepresión. Un ejemplo es la inhibición directa de factores transcripcionales proinflamatorios como el factor nuclear kappa B (NK- κ B) o la proteína activadora 1 (AP-1). El complejo GC-RG es también capaz de reducir la estabilidad de enzimas relacionadas con la expresión genética y proliferación celular que tiene lugar en el proceso inflamatorio como las MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (Ito, Chung, and Adcock 2006; Adcock 2000).

Se trata de un fármaco de primera elección en el tratamiento de diversas enfermedades oculares que cursan con inflamación, edema y neovascularización. Este glucocorticoide es empleado tanto en afecciones inflamatorias del segmento anterior (queratitis, blefaritis, conjuntivitis alérgica, uveítis anterior y síndrome de ojo seco), como del segmento posterior (uveítis intermedia, coroiditis, panuveitis y edema macular). También es utilizada para la reducción de la inflamación postquirúrgica (Blizzard, Desai, and Driscoll 2016). Así mismo, la dexametasona es prescrita como agente inmunosupresor para el manejo postoperatorio y la prevención del rechazo de injertos corneales (Pan et al. 2015).

A pesar de su actividad a nivel ocular, su administración por vía sistémica no es ideal debido a que tras la administración oral de dosis elevadas de dexametasona (7,5 mg) los niveles del fármaco detectados en el humor vítreo durante las primeras 4 y 10 horas son bajos, además de los muchos efectos adversos derivados (Sherif and Pleyer 2002; Weijtens et al. 1998). Por otro lado, si bien las inyecciones intravítreas de dexametasona permiten alcanzar concentraciones terapéuticas en el segmento posterior, se han descrito efectos citotóxicos concentración/tiempo dependientes de los glucocorticoides en las células gliales, el epitelio pigmentario de la retina, las células endoteliales y las células de Müller (Kwak and D'Amico 1992; El Zaoui, Behar-Cohen, and Torriglia 2015). Así, el desarrollo de sistemas de liberación controlada de dexametasona ha sido ampliamente investigado dentro del campo de la tecnología farmacéutica, impulsando la aplicación de nuevos enfoques terapéuticos (Herrero-Vanrell, Cardillo, and Kuppermann 2011; Yang et al. 2013; Vaishya et al. 2014; Rodriguez Villanueva et al. 2016; Hadayer and Schaal 2016).

6.4. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 23) es una neurohormona secretada principalmente por la glándula pineal e implicada en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos. Presenta un papel destacado como sustancia reguladora de los ritmos circadianos e inductora del sueño. Así mismo, la melatonina es un poderoso antioxidante capaz de reducir el estrés oxidativo (Bonfont-Rousselot et al. 2011). Protege además el

INTRODUCCIÓN

sistema cardiovascular, estimula la producción de somatotropina (hormona del crecimiento) y actúa como un potente antidepresivo (Hansen et al. 2014; Paredes et al. 2014).

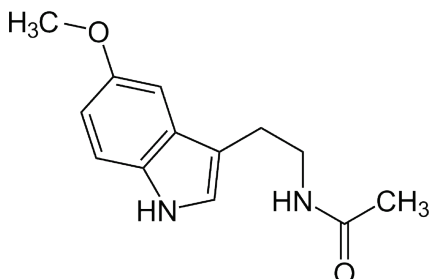


Figura 23. Estructura de la melatonina

De acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, la melatonina muestra un aspecto pulverulento cristalino de color amarillo-blanquecino, que funde aproximadamente a 117°C y cuyo peso molecular es de 232,283 g/mol. Su solubilidad en agua es de 2 g/L a 20 °C y 5 g/L a 50 °C, y en etanol de 50 mg/mL. Se trata de un producto fotosensible que debe ser almacenado a una temperatura de -30 °C y en ambiente seco (O'Neil 2013).

Esta neurohormona es también sintetizada en la retina en pequeñas cantidades (Lundmark et al. 2006), siendo producida casi exclusivamente por los fotorreceptores y bajo condiciones patológicas por otros tipos celulares (Cahill and Besharse 1993; Sakamoto, Liu, and Tosini 2004). La melatonina ejerce su acción mediante su interacción con una familia de receptores acoplados a la proteína G. Se han identificado tres subtipos de receptores de melatonina: MT1, MT2 y MT3 (Jumnongprakhon et al. 2017; Wiechmann and Summers 2008). Los primeros dos están negativamente acoplados a la enzima adenilato ciclasa, mientras que el MT3 parece estar ligado positivamente. Existe una controversia con respecto al subtipo MT3, ya que algunos autores afirman que estos receptores son enzimas quinona reductasa 2 (Nosjean et al. 2000), pero en los tejidos oculares esta identidad no ha sido demostrada (Martinez-Aguila et al. 2016). Las vías de señalización predominantes se activan a partir de la formación de complejos heteroméricos (MT1/MT2) y homoméricos. Curiosamente, la propensión de estos receptores a formar homo y heterómeros

no es idéntica, siendo más prevalente el heterómero MT1 / MT2 y la formación de homómeros de MT1 (Ayoub et al. 2004). El complejo heterómero formado por MT1/MT2 conforma la diana farmacológica específica para mejorar la función y viabilidad celular de los fotorreceptores (Jockers et al. 2008).

La melatonina y sus análogos (ej: 5-MCA-NAT (5-metilcarboxiaminoN-acetilo-triptamina)) son compuestos activos en la reducción de la PIO (Andres-Guerrero et al. 2009). Esta acción estaría mediada por el receptor MT2 y MT3, no estando totalmente comprendida en la actualidad. Se ha postulado que la melatonina produce una disminución en los valores de PIO ejerciendo una actividad a nivel del cuerpo ciliar, debido principalmente a la modificación en los valores intracelulares de AMPc (adenosin monofosfato cíclica). De esta manera, cuando la melatonina activa los receptores MT2 y MT3 a este nivel, se estimula la enzima adenilato ciclasa, con la concomitante activación del PKA (proteína Kinasa A). Esta cadena de activación produce una reducción en el flujo de iones cloruro, responsables del movimiento acuoso desde el epitelio ciliar hasta la cámara posterior en el ojo. Esta disminución en la formación de humor acuoso conlleva finalmente una reducción en la PIO (Huete-Toral et al. 2015). Además, el ciclo circadiano mediado por esta neurohormona parece estar implicado en la regulación de la producción de humor acuoso y por tanto en los valores de presión intraocular (Martinez-Aguila et al. 2016; Alkozi and Pintor 2015).

Por otro lado, la melatonina ha demostrado ser un potente antioxidante mediante mecanismo directos, que implican su actuación como secuestrador de radicales libres, e indirecto a través de la estimulación de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (Reiter et al. 2003; Reiter et al. 2001; Antolin et al. 1997). Además, su actividad neuroprotectora está mediada por otros múltiples mecanismos que incluyen la inhibición de la formación del poro de transición mitocondrial, la reducción de la apoptosis inducida por óxido nítrico (NO) o la reducción de la excitotoxicidad por sobrecarga de Ca^{2+} (Reiter et al. 2017; Wongprayoon and Govitrapong 2017; Andrabi et al. 2004; Siu et al. 2004; Lundmark et al. 2007). Esta neurohormona también promueve la síntesis de glutatión, un antioxidante intracelular esencial, y es capaz de aumentar la eficiencia de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, reduciendo la fuga de electrones y reduciendo la generación de radicales libres (Urata et al. 1999; Mayo et al. 2017).

La melatonina también ha demostrado disminuir el aumento de la permeabilidad vascular que se produce en la retina como consecuencia de una lesión hipóxica, mediante la supresión de la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), la inhibición de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α) y la inhibición de la producción de NO (Park et al. 2012; Kaur et al. 2013). También se ha demostrado que suprime la respuesta inflamatoria en condiciones isquémicas (Lee et al. 2007).

Así, son numerosos los estudios publicados sobre la eficacia terapéutica de la melatonina en el tratamiento de procesos patológicos a nivel ocular (Dehdashtian et al. 2018; Martínez-Aguila et al. 2016; Xu et al. 2017; Siu et al. 2006). Esta molécula ha manifestado favorecer la supervivencia e integridad estructural de las CGR y los fotorreceptores (Kilic et al. 2002; Park et al. 2012; Liang et al. 2001; García-Caballero C. 2018), así como ejercer un efecto protector sobre las células gliales de la retina (Tezel 2011).

6.5. Coenzima Q10

La coenzima Q10 (ubiquinona 10 o ubidecarenona) (Figura 24) es un cofactor esencial de la cadena respiratoria mitocondrial, ejerciendo un papel fundamental en la bioenergética mitocondrial al mantener el potencial de membrana, apoyar la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa e inhibir la generación de especies reactivas de oxígeno (Littarru and Tiano 2010).

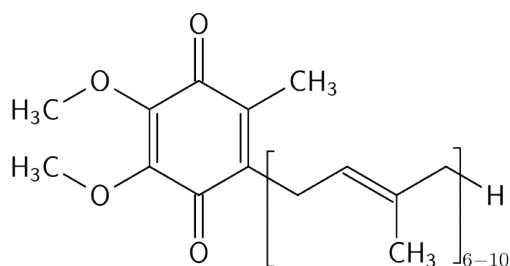


Figura 24. Estructura de la coenzima Q10

La coenzima Q10 es una benzoquinona liposoluble que se presenta, de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, como un polvo cristalino de color amarillo-anaranjado, que funde aproximadamente a 50-52°C y cuyo peso molecular es de 863,365 g/mol. Es escasamente soluble en agua y fotosensible, debiendo ser almacenada a una temperatura de -30 °C y en ambiente seco (O'Neil 2013).

En el cuerpo humano, la coenzima Q10 se encuentra ubicuamente distribuida por los tejidos, siendo mayor su concentración en corazón, riñones, hígado y tejido muscular (Turunen, Olsson, and Dallner 2004). A parte de en las mitocondrias, su presencia ha sido confirmada en otras fracciones subcelulares y en lipoproteínas plasmáticas (Littarru and Tiano 2010).

Junto con su papel estabilizador de la cadena de transporte de electrones, son diversas las funciones que han sido descritos para esta ubiquinona (Sandhu et al. 2003). Por un lado, la coenzima Q10 presenta un elevado poder antioxidante mediante mecanismos directos, actuando como secuestrador de especies reactivas de oxígeno (Hernandez-Camacho et al. 2018), e indirectos. Dentro de los estos últimos, este compuesto actúa evitando la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial la cual conduce a la activación de la apoptosis (Papucci et al. 2003), modulando la expresión de las proteínas Bax/Bad implicadas en la señalización de muerte celular (Cheung, Guo, and Cordeiro 2008), y disminuyendo significativamente la expresión de las enzimas oxidantes superóxido dismutasa y hemo oxidasa-1 (Noh et al. 2013). Por otro lado, la coenzima Q10 está implicada en otras funciones celulares como son: la reparación y conservación del ADN mitocondrial, y la regulación de las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares (Hargreaves 2014). Así, se ha demostrado que ejerce una acción protectora en la conservación de la expresión de la proteína Tfam (factor de transcripción mitocondrial A, *Mitochondrial transcription factor A-Tfam*), una proteína que ejerce un papel clave en la expresión génica y el mantenimiento del ADN mitocondrial (Lee, Shim, et al. 2014). Además, se ha postulado que la coenzima Q10 podría prevenir la excitotoxicidad por glutamato mediante la reducción de la expresión de las subunidades NR1/NR2A del receptor de glutamato NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*) (Lee, Shim, et al. 2014).

Dado el potencial terapéutico de este compuesto, la administración exógena de coenzima Q10 ha despertado mucho interés para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oftálmicas. Su aplicación a nivel ocular ha demostrado efectos protectores sobre las CGR en modelo animales de isquemia retiniana transitoria inducida por elevación de la PIO (Nucci et al. 2007; Lee, Kim, et al. 2014; Davis et al. 2017). Idéntica acción neuroprotectora ha sido descrita sobre un modelo transgénico de glaucoma (DBA/2J), en el cual se evidenció también la conservación de la integridad estructural de la cabeza del nervio óptico (Lee, Shim, et al. 2014). Además, se ha confirmado que la coenzima Q10 ejerce una prevención de la activación de los astrocitos en condiciones de estrés oxidativo (Noh et al. 2013).

Así, la coenzima Q10 se postula como una sustancia activa que puede proporcionar nuevas estrategias terapéuticas contra la alteración mitocondrial y la disfunción de las células gliales presentes en las neuropatías ópticas.

6.6. Ácido Tauroursodeoxicólico

El ácido tauroursodeoxicólico (*Tauroursodeoxycholic acid* - TUDCA) (Figura 25) es el conjugado de taurina del ácido ursodeoxicólico (UDCA). Se trata del ácido biliar más abundante en la bilis de oso (Boatright et al. 2006).

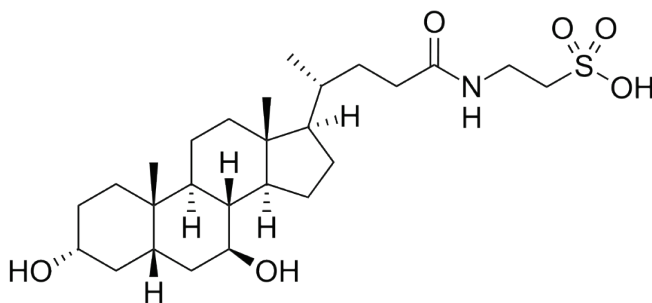


Figura 25. Estructura del ácido tauroursodeoxicólico

De acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, el TUDCA es un ácido biliar anfifílico que se presenta como un polvo de color blanco que funde

aproximadamente a 173-175°C y cuyo peso molecular es de 499.704 g/mol. Su solubilidad en agua es de 100 mg/mL y de 20 mg/mL en etanol. Su almacenamiento es a temperatura ambiente y al resguardo de la luz dada su fotosensibilidad (Miyake 1999; Eto and Tompkins 1985).

La bilis del oso ha sido utilizada durante siglos en la medicina tradicional china como remedio natural para el tratamiento de diversas afecciones. No obstante, ha sido a lo largo de las últimas décadas cuando se ha investigado en profundidad los mecanismos de acción de su componente mayoritario, el TUDCA. Varios estudios han demostrado que este compuesto actúa como un potente inhibidor de la apoptosis al interferir con la ruta mitocondrial de muerte celular, inhibiendo la producción de radicales de oxígeno y reduciendo el estrés del retículo endoplásmico (Amaral et al. 2009). El TUDCA inhibe la translocación de la proteína pro-apoptótica Bax del citosol a la membrana mitocondrial, impidiendo así la liberación de citocromo C y por tanto la activación de la vía de muerte por caspasas (Rodrigues et al. 2003). Además, este ácido biliar es capaz de prevenir el plegamiento erróneo de proteínas en el retículo endoplasmático, protegiendo de la “respuesta a proteínas desplegadas”, una importante respuesta de estrés celular (Vang et al. 2014).

La administración exógena de TUDCA ha sido estudiada por sus efectos de mejora en la inflamación, en enfermedades metabólicas, en la diabetes y en enfermedades renales (Cash et al. 2012). Además, ha demostrado actuar como un estabilizador mitocondrial y agente anti-apoptótico en varios modelos de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo Alzheimer, Parkinson y la enfermedad de Huntington (Vang et al. 2014).

A nivel ocular, varias investigaciones han documentado las propiedades neuroprotectoras del TUDCA. Se ha demostrado que la administración sistémica de este agente activo retrasa la degeneración retiniana en modelos de RP en ratones autosómicos recesivos rd10 (Phillips et al. 2008; Oveson et al. 2011) y en ratas albinas homocigóticas P23H (Fernandez-Sanchez et al. 2011; Fernandez-Sanchez et al. 2017). En estos dos modelos de degeneración, los animales tratados con TUDCA mostraron una mejora de la función visual, un mayor grosor de la capa nuclear externa de la retina y una elevada conservación de los segmentos externos en comparación con los animales no tratados

(Fernandez-Sanchez et al. 2015). Además de sus propiedades anti-apoptóticas, el TUDCA también ha demostrado ejercer actividad antiinflamatoria en la retina. En este contexto, la administración sistémica de esta sustancia activa suprimió la formación de neovascularización coroidea (NVC) inducida por láser en ratas. De acuerdo con los autores, este evento fue debido a la acción antiinflamatoria del TUDCA, la cual disminuyó los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la retina (Woo, Kim, and Yu 2010). Este resultado, pone de manifiesto el potencial terapéutico de este compuesto para el tratamiento de muchas enfermedades retinianas relacionadas con la NVC, incluida la DMAE. Así mismo, la administración sistémica de TUDCA evitó la muerte de los fotorreceptores después del desprendimiento de la retina provocado en ratas, preservando el grosor de la capa nuclear externa (Mantopoulos et al. 2011). Este ácido biliar también ha demostrado proteger a las células neuronales de la retina de la muerte inducida por concentraciones elevadas de glucosa, al disminuir la translocación mitocondrial-nuclear del factor inductor de la apoptosis (Gaspar et al. 2013). Estos hallazgos podrían tener relevancia para el tratamiento de la RD. Finalmente, se ha descrito que la inyección sistémica de TUDCA produce una reducción en la degeneración de los conos de la retina en un modelo murino de amaurosis congénita de Leber (Zhang, Baehr, and Fu 2012).

7. MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN DE SUSTANCIAS ACTIVAS PARA SU ADMINISTRACIÓN INTRAVITREA

La microencapsulación de fármacos es el proceso de recubrimiento de sustancias activas al estado sólido, líquido o gaseoso, con materiales dotados de propiedades específicas para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. Los materiales constituyentes de estas microestructuras pueden ser materiales poliméricos o grasos. Así, los productos resultantes reciben el nombre de sistemas microparticulares (microesferas y microcápsulas). El primer trabajo sobre microencapsulación fue publicado en 1931, en él se describía la formación de microcápsulas de gelatina mediante un proceso denominado coacervación (Bungenburg de Jong 1931). Desde entonces se han ido desarrollando distintos métodos de elaboración de micropartículas. El método de microencapsulación de fármacos viene principalmente determinado por las características

fisicoquímicas de la sustancia activa y por la naturaleza del material de recubrimiento, pudiéndose elegir en muchos casos entre varias opciones para un mismo fármaco y material. La elección de la técnica de microencapsulación, también se encuentra condicionada por las características de almacenamiento, la vía de administración y la finalidad para la que esté destinada la formulación microparticulada.

Las técnicas de microencapsulación generalmente utilizadas para la preparación de sistemas de liberación controlada pueden agruparse en las siguientes categorías (Martínez Pacheco 2016):

- 1- Coacervación o separación de fases
 - 1.1- Coacervación en fase acuosa
 - Coacervación simple
 - Coacervación compleja
 - 1.2 - Coacervación en fase orgánica (en medio no acuoso)
 - Coacervación inducida por un cambio de temperatura
 - Coacervación inducida por la adición de un “no solvente”
 - Coacervación inducida por la adición de un polímero incompatible
- 2 - Emulsificación y evaporación/extracción del disolvente
 - 2.1- Emulsificación y evaporación/extracción del disolvente en el seno de una emulsión O/A
 - 2.2- Emulsificación y evaporación/extracción del disolvente en el seno de una emulsión O/O
- 3 - Polimerización
- 4 - Atomización y atomización-congelación
 - 4.1- Atomización
 - 4.2 - Atomización-congelación
- 5 - Suspensión en aire o recubrimiento en lecho fluido
- 6 - Gelificación iónica
- 7- Microencapsulación mediante la utilización de fluidos supercríticos
- 8 - Microfluidos

Dentro de los métodos de elaboración de sistemas microparticulados destinados a la administración intraocular de fármacos cabe destacar la

evaporación/extracción del disolvente a partir de una emulsión (Herrero-Vanrell et al. 2014). El concepto de emulsificación y evaporación del disolvente aúna un conjunto de procedimientos en los que se da como circunstancia común la formación, mediante agitación, de una emulsión generalmente tipo aceite-en-agua (O/A) o aceite-en-aceite (O₁/O₂). Además, es fundamental la adición de un agente tensoactivo en la fase externa (p.ej. alcohol polivinílico). La formación de microesferas empleando el método de evaporación/extracción del disolvente a partir de una emulsión O/A es la más empleada y consta de diferentes etapas. (1) Inicialmente, el material constitutivo de la estructura microparticulada (polímero) se disuelve en un disolvente orgánico. (2) Seguidamente, la sustancia activa se disuelve o dispersa en esta disolución polimérica, permitiendo así la encapsulación de fármacos lipófilos e hidrófilos. (3) A continuación, se procede a la emulsificación de la fase orgánica (O) comprendida por el fármaco y el polímero, con la fase acuosa (A) que contiene el tensoactivo. (4) Finalmente, el sistema se mantiene bajo agitación en un medio que facilite la extracción del disolvente orgánico hacia la fase externa, consiguiendo la precipitación rápida del polímero y consecuentemente la formación de las microesferas (Figura 26). Tras la formación de las microesferas, se procede a la recogida y lavado de las microesferas por filtración. Por último, se realiza un proceso de secado de las microesferas con el fin de obtener un polvo fino (Martínez Pacheco 2016; Mateovic et al. 2005). Esta técnica de microencapsulación fue la seleccionada para la elaboración de las formulaciones de microesferas, cargadas con sustancias activas no proteicas, desarrolladas en el presente trabajo experimental.

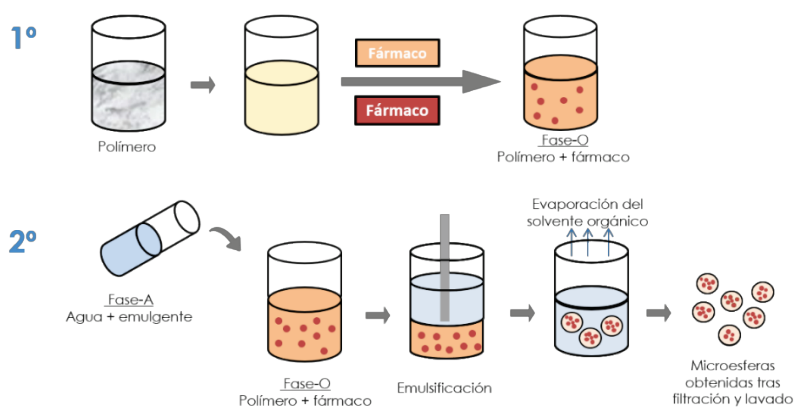


Figura 26. Esquema de elaboración de microesferas a través de la técnica de evaporación/extracción del disolvente a partir de una emulsión O/A.

Con respecto a la microencapsulación de proteínas, debido a la complejidad estructural que presentan estas macromoléculas, se han desarrollado metodologías específicas. Resulta sumamente importante emplear un método de microencapsulación que garantice la estabilidad e integridad estructural de las proteínas, manteniendo así la actividad biológica de las mismas (Ma 2014; Shah and Schwendeman 2014). El procedimiento denominado evaporación/extracción del disolvente en el seno de una emulsión $A_1/O/A_2$ ha sido ampliamente empleado para la encapsulación de agentes activos proteicos. En este método la proteína se incorpora disuelta en una fase interna acuosa. Esta fase interna acuosa se emulsifica en una fase orgánica que contiene el polímero y se obtiene una emulsión A_1/O , esta emulsión se incorpora a la fase acuosa que contiene el agente tensoactivo (A_2). Finalmente, se realiza la eliminación del disolvente orgánico y el lavado y secado de las microesferas cargadas con proteínas (Figura 27).

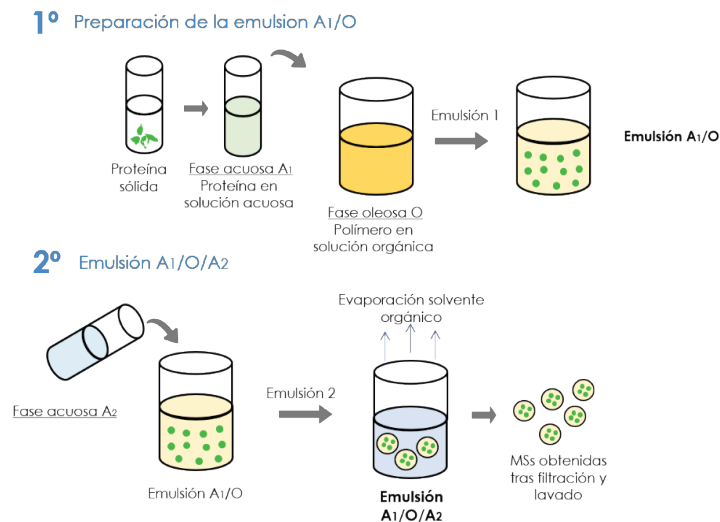


Figura 27. Esquema de elaboración de microesferas a través de la técnica de evaporación/ extracción del disolvente a partir de una emulsión $A_1/O/A_2$.

Alternativamente a esta metodología surge la microencapsulación de proteínas al estado sólido. Mediante este procedimiento se logra la encapsulación de la biomolécula en su conformación inicial, reduciendo así los cambios estructurales que pudiera sufrir la proteína, preservando su actividad biológica (Ma 2014). Pueden diferenciarse dos variantes de esta técnica:

-Método S/O/O (sólido-oleo-oleoso): en este proceso se adiciona la proteína a una solución orgánica polimérica, emulsionándose seguidamente con una fase externa orgánica. Si bien, la ausencia de medio acuoso en el procedimiento asegura el mantenimiento de la conformación estructural de la proteína, pueden existir otro tipo de problemas asociados a este método. Entre ellos, cabe destacar problemas de toxicidad y contaminación ambiental debido al uso de grandes volúmenes de solvente orgánicos y oleosos (Leach et al. 2005; Han et al. 2009).

-Método S/O/A (sólido-oleo-acuoso): mediante el desarrollo de esta técnica, se pretende evitar los inconvenientes derivados del método S/O/O. En esta técnica, se realiza la incorporación de la proteína al estado sólido en la solución orgánica polimérica para después proceder a la emulsificación con una fase externa acuosa (Figura 28). Debido a la ventaja que supone este procedimiento respecto a los métodos de microencapsulación de proteínas anteriormente descritos, esta técnica fue la seleccionada para el desarrollo de las formulaciones que contienen proteínas del presente trabajo de investigación. Como principal inconveniente de este método, puede señalarse la obtención de rendimientos de encapsulación moderados ya que, dada la naturaleza hidrosoluble de las proteínas, parte de ella se pierde en la fase externa (Marquette et al. 2014; Checa-Casalengua 2011).

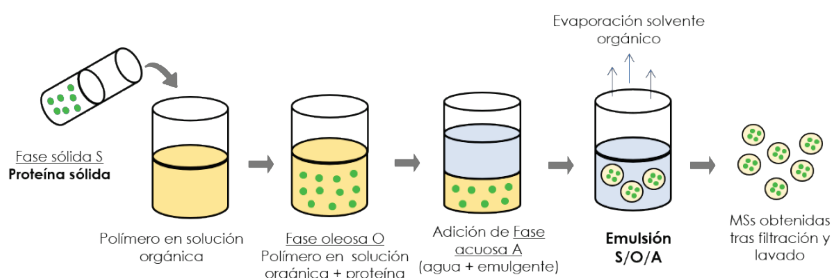


Figura 28. Esquema de elaboración de microesferas a través de la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El empleo de sistemas de cesión controlada capaces de liberar de forma sostenida pequeñas cantidades de la sustancia activa encapsulada, representan una estrategia que da respuesta a diferentes necesidades terapéuticas de las enfermedades degenerativas crónicas. Dentro de los sistemas de liberación controlada que se han desarrollado hasta el momento para el tratamiento de patologías neurodegenerativas oftálmicas, las microsferas (MSs) biodegradables de PLGA se presentan como sistemas de gran utilidad. Por otro lado, el avance en la comprensión de las vías fisiopatológicas que conducen a la muerte celular en estos trastornos neurodegenerativos oculares ha sido esencial para impulsar el desarrollo de nuevas terapias. Así, al tratarse de enfermedades de etiología multifactorial, la terapia combinada basada en la administración conjunta de diferentes agentes terapéuticos mediante sistemas de liberación controlada resultaría de gran interés.

Dentro de los eventos patológicos más importantes con los que cursan las distintas formas de la degeneración macular asociada a la edad, se encuentran el deterioro grave del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la neovascularización coroidea. Por ello, el desarrollo de una terapia dirigida a frenar dichos eventos resultaría especialmente útil en el tratamiento de esta patología. En este sentido, el empleo de sistemas microparticulares de cesión controlada basada en la administración conjunta de GDNF/BDNF para la reparación de EPR y la inhibición de la angiogénesis podría resultar una herramienta terapéutica prometedora.

A la hora de desarrollar nuevas formulaciones para el tratamiento de la neurodegeneración en el glaucoma, la terapia combinada mediante sistemas de cesión controlada resulta de gran interés. Sin embargo, la tolerancia de estos dispositivos resulta crítica pudiendo condicionar la eficacia terapéutica. En este contexto, el empleo de sistemas microparticulares de carga múltiple no solo posibilitaría la administración conjunta de varios agentes terapéuticos, sino también la reducción del biomaterial polimérico administrado. Por todo ello, la evaluación del efecto neuroprotector de una combinación de diferentes agentes

HIPÓTESIS DE TRABAJO

activos (dexametasona/melatonina/coenzima Q10) liberada a partir MSs de carga múltiple frente a una mezcla física equivalente (en dosis de sustancias activas) de MSs de cargada individual permitiría seleccionar la mejor línea de tratamiento.

Dada la complejidad de las patologías neurodegenerativas oculares, se hace necesario el desarrollo de nuevas terapias capaces administrar agentes activos de diferente naturaleza y entidad física, como el GDNF y el TUDCA, que actúen frente a distintas dianas terapéuticas. En las últimas décadas, la investigación en el campo de la microtecnología ha demostrado la versatilidad de dichos sistemas. Así, el empleo de diversos recursos tecnológicos en el proceso de microencapsulación podría permitir la obtención de formulaciones optimizadas de terapia combinada.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

OBJECTIVES AND APPROACH

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

El objetivo global del presente trabajo de investigación se ha centrado en el desarrollo y caracterización de microesferas (MSs) de ácido poli-láctico-coglicólico (PLGA) –un polímero biocompatible y biodegradable– como sistemas intraoculares de liberación controlada para la administración conjunta de agentes neuroprotectores. Con este fin, se han diseñado distintas formulaciones de microesferas de carga múltiple como una nueva aproximación terapéutica para el tratamiento de patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo, en lo que se conoce como terapia neuroprotectora de combinación.

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

Objetivo 1: Evaluación *in vitro* de la tolerancia y del efecto migratorio y antiangiogénico de unas microesferas de PLGA-VitE cargadas con GDNF o con una combinación de GDNF/BDNF.

Para la consecución de este objetivo, el planteamiento de 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 BDNF.
- ✓ Caracterización *in vitro* de las formulaciones mediante el estudio de su morfología, tamaño, eficacia de encapsulación y perfil de liberación.
- ✓ Evaluación *in vitro* de la tolerancia y la eficacia de las formulaciones desarrolladas empleando dos tipos celulares: células del epitelio pigmentario de la retina (*Human retinal pigment epithelial cells*, ARPE-19) y células endoteliales de la coroides (*primary primate endothelial choroidal cell line*, RF/6A).

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

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

“BDNF and GDNF/Vitamin E sustained delivery system improves migration in ARPE-19 cells: potential usefulness in degenerative retinal pathologies”.

Objetivo 2: Evaluación del potencial terapéutico de una combinación de tres agentes neuroprotectores (dexametasona/melatonina/coenzima Q10) encapsulados en una misma formulación de microesferas vs a la administración de las mismas dosis de los fármacos como mezcla de microesferas de carga individual, sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina en un modelo experimental de glaucoma.

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

- ✓ Desarrollo de formulaciones microparticulares de PLGA elaboradas mediante el método de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión O/A cargadas con (1) Dexametasona; (2) Melatonina; (3) Coenzima Q10; y (4) Combinación de Dexametasona/Melatonina/Coenzima Q10.
- ✓ Caracterización *in vitro* de las formulaciones mediante el estudio de su morfología, tamaño, eficacia de encapsulación, DSC y perfil de liberación.
- ✓ Evaluación *in vitro* de la actividad neuroprotectora de las microesferas de carga múltiple en un modelo de neurotoxicidad por glutamato en cultivos celulares de la línea celular inmortalizada de precursores neuronales R28.
- ✓ Estudio de la eficacia de la formulación de MSs multicargadas en un modelo animal de glaucoma (modelo de hipertensión ocular mediante inyección episcleral de una solución salina hipertónica), mediante la evaluación de la supervivencia de las células ganglionares de la retina.

- ✓ Inyección intravítrea de la formulación de carga múltiple y de una mezcla física de las formulaciones de carga individual equivalente en dosis de las sustancias activas, en un modelo experimental de glaucoma y posterior estudio de la supervivencia de las células ganglionares de la retina.

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

“Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma”.

Objetivo 3: Optimización de una formulación de microesferas de PLGA cargadas con dos agentes neuroprotectores de distinto peso molecular y entidad física (GDNF/TUDCA) destinada a la terapia combinada en patologías degenerativas de la retina.

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

- ✓ Desarrollo de una formulación microparticulada de PLGA cargada con dos agentes neuroprotectores (GDNF y TUDCA) empleando el método de extracción-evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A.
- ✓ Optimización de la formulación de terapia combinada mediante el empleo de diferentes estrategias tecnológicas durante el proceso de microencapsulación.
- ✓ Caracterización *in vitro* de las formulaciones desarrolladas mediante el estudio de su morfología, tamaño, eficacia de encapsulación y *burst* inicial.
- ✓ Selección de la formulación optimizada y evaluación de los perfiles de liberación *in vitro* a largo plazo (91 días).

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

- ✓ Estudios preliminares de eficacia *in vivo* con la formulación optimizada en dos modelos animales de retinosis pigmentaria (rd10 y P23H).

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

“Co-delivery of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) from PLGA microspheres. Potential combination therapy of retinal diseases”.

OBJECTIVES AND APPROACH

The overarching aim of this research is the development and characterization of poly-lactic-coglycolic acid (PLGA) microspheres -a biocompatible and biodegradable polymer- as a controlled release intraocular system for co-administration of neuroprotective agents. To this end, different formulations of multi-loaded microspheres were designed as a new therapeutic approach for the treatment of neurodegenerative pathologies affecting the posterior segment of the eye, in what is known as combination neuroprotective therapy.

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

Objective 1: *In vitro* evaluation of the effect of PLGA microspheres (MSs) loaded with GDNF or a combination of GDNF and BDNF on cell migration and angiogenesis.

To achieve this objective, the proposed work plan was the following:

- ✓ Development of two PLGA-VitE microparticulate formulations elaborated using the solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion solvent evaporation technique, including (1) GDNF; (2) GDNF and BDNF.
- ✓ *In vitro* characterization of the formulations by studying morphology, size, encapsulation efficacy and release profile of the neuroprotectants.
- ✓ *In vitro* viability and efficacy assessment (cell migration and angiogenesis) of the developed formulations on retinal pigment epithelium cells (Human retinal pigment epithelial cells, ARPE-19) and choroidal endothelial cells (primary primate endothelial choroidal cell line, RF / 6A) as.

Results obtained are provided in chapter I, entitled:

"BDNF and GDNF/Vitamin E sustained delivery system improves migration in ARPE-19 cells: potential usefulness in degenerative retinal pathologies".

Objective 2: Therapeutic potential evaluation of a combination of three neuroprotectants (dexamethasone/melatonin/coenzymeQ10) encapsulated in the same microcarrier vs the administration of the same doses of drugs as a mixture of single loaded microspheres, on the retinal ganglion cells survival in an experimental model of glaucoma.

To achieve this objective, the proposed work plan was the following:

- ✓ Development of PLGA microparticulate formulations incorporating (1) Dexamethasone; (2) Melatonin; (3) Coenzyme Q10; and (4) combination of Dexamethasone / Melatonin / Coenzyme Q10, prepared by the oil-in-water (OW) emulsion solvent evaporation technique
- ✓ *In vitro* characterization of the formulations by studying morphology, size, encapsulation efficiency, DSC and release profile of the neuroprotective agents.
- ✓ *In vitro* evaluation of the neuroprotective activity of the multi-loaded microspheres in a glutamate-induced cytotoxicity model in R28 cell line.
- ✓ *In vivo* efficacy studies by evaluating the survival of retinal ganglion cells in an experimental model of glaucoma (well-established rodent model of chronic ocular hypertension) after a single intravitreal injection of the multi-loaded MSs
- ✓ *In vivo* efficacy comparison of single intravitreal injections of microspheres of DMQ-MSs to their equivalent individual single-drug loaded MSs mixture in the experimental model of glaucoma

Results obtained are provided in chapter II, entitled:

"Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma".

Objective 3: Optimization of a PLGA microspheres' formulation loaded with two neuroprotective agents (GDNF/TUDCA) intended for combination therapy in retinal degenerative diseases.

To achieve this objective, the proposed work plan was the following:

- ✓ Development of a microparticulate PLGA formulation loaded with two neuroprotectants (GDNF and TUDCA) elaborated by the solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion solvent evaporation technique.
- ✓ Optimization of the combination therapy formulation using different technological strategies during the microencapsulation process.
- ✓ *In vitro* characterization of the developed formulations by studying morphology, size, encapsulation efficiency, *initial burst* of the neuroprotective agents.
- ✓ Selection of the optimized formulation and evaluation of long-term *in vitro* release profiles (91 days).
- ✓ Preliminary studies of *in vivo* efficacy with the optimized formulation in two animal models of retinitis pigmentosa (rd10 and P23H).

Results obtained are provided in chapter III, entitled:

"Co-delivery of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) from PLGA microspheres. Potential combination therapy of retinal diseases. "

CAPÍTULO I – CHAPTER I

BDNF and GDNF/Vitamin E sustained delivery system improves migration in ARPE-19 cells: potential usefulness in degenerative retinal pathologies

BDNF and GDNF/Vitamin E sustained delivery system improves migration in ARPE-19 cells: potential usefulness in degenerative retinal pathologies

A. Arranz Romera, M. Hernández, P. Checa-Casalengua, A. Garcia-Layana, I.T. Molina-Martínez, M. J. Young, R. Herrero-Vanrell, P. Fernandez-Robredo*, I. Bravo-Osuna*

ABSTRACT

Our aim was to assess the effect of PLGA microspheres (MSs) loaded with a combination of GDNF and Vitamin E (VitE) or a combination of GDNF, BDNF and VitE on migration in human retinal epithelial (ARPE-19) cells and angiogenesis primate choroidal endothelial (RF6A) cells. MSs were characterized and cell viability after 24 h of treatment was determined by MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Moreover functional migration and angiogenesis were evaluated by wound healing technique and quantified measuring the wound closure area. Finally, TUNEL assay (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling) was used to evaluate apoptosis in cells treated with MSs. The main result was that the BDNF and GDNF/VitE combination was effective increasing RPE cells migration. None of the MSs formulations affected the angiogenesis in endothelial cells. Cell viability was not altered by MSs and there was no evidence of increased apoptosis rates in any cell type treated with MSs. This study suggests that the combination of GDNF/VitE with BDNF released from sustained delivery systems could be useful as a potential therapy in combination with current anti-angiogenic therapies against retinal diseases by increasing migration of RPE cells in areas where RPE is damaged. This approach is in line of the future use of more personalized therapies for each patient. However, more studies are needed to confirm these results in more complex experimental models.

KEYWORDS: GDNF, BDNF, co-delivery, migration, PLGA microspheres.

1. INTRODUCTION

In the industrialized world, age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of severe vision loss in individuals over 55 years of age (Colijn et al. 2017; Flaxman et al. 2017; Li, Chintalapudi, and Jablonski 2017; Zarbin, Casaroli-Marano, and Rosenfeld 2014). Depending on histopathological features, AMD can be divided into early and advanced stages based on the presence of drusen, pigmentation changes and/or neovascularization that form within the macular region at the choroid-retinal pigmented epithelium (RPE) interface. Advanced AMD is characterized by geographic atrophy (GA) or choroidal neovascularization (CNV) both of which may lead to central visual impairment or irreversible blindness (Colijn et al. 2017; Li, Chintalapudi, and Jablonski 2017; Gass 1973; Evans and Lawrenson 2017) and evolving evidence shows that both types involve a common pathophysiologic background sharing similar initiating molecular and cellular alterations (Fritsche et al. 2013; Seddon et al. 2003). GA is reported to affect up to 90% of AMD patients and is characterized by severe visual impairment and scotomas due to loss of retinal photoreceptors, RPE cells, and choriocapillaris (van Lookeren Campagne et al. 2014). Cumulative damage to the RPE, Bruch's membrane, and choriocapillaris leads to dysfunction and loss of RPE cells producing degeneration of the overlying photoreceptors and consequential vision loss. While there is currently no effective treatment for atrophic AMD, cumulative oxidative damage has been suggested to be a contributing factor. Vitamin E (VitE) and C oral supplementation has shown to reduce atrophic alterations in the retina of pigs with high-fat diet (Fernandez-Robredo et al. 2005) and mice with spontaneous hypercholesterolemia (L.M. Sádaba 2008). Moreover, large clinical trials such as the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) demonstrated that oral antioxidant therapy reduced the risk of AMD development in 25 % (Age-Related Eye Disease Study Research 2001).

CNV is a complex process, that occurs in exudative or neovascular AMD (nvAMD) affecting approximately 10% of all AMD patients, where new capillaries sprout from the choroid through Bruch's membrane and enter the retina controlled by numerous angiogenic agents such as growth factors, cytokines and extracellular cell matrix components (Campochiaro 2000a; Dreyfuss et al. 2009). Therefore, inhibition of angiogenesis is critical in the prevention and treatment of

nvAMD (Bressler 2009). Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) therapy is now considered the gold standard for nvAMD (D.F. Martin 2012; Chakravarthy et al. 2013; Stewart 2012; Kwong and Mohamed 2014). Repeated doses of anti-VEGFs are usually needed for several years, as cessation may result in the recurrence of CNV (Klettner et al. 2014). Although VEGF antagonists have shown to be safe, side effects have been detected (Lois et al. 2013), probably because VEGF is an essential factor for cell survival (Carmeliet et al. 2009) and further researchers suggest that repeated exposure to these drugs may damage retinal neurons (Brar et al. 2010; Saint-Geniez et al. 2008). However, other studies suggest that those effects might occur as a consequence of the natural disease progression (Schutze et al. 2015). Independently to the disease etiology and treatment administered, the fact is that at the final stage the RPE is damaged.

Consequently, new targets and novel VEGF-independent pathways approaches are currently under investigation. However, large clinical phase III trials on combined anti-VEGF/PDGF inhibition (using Pegpleranib) in nvAMD, targeting the pericyte, have failed to provide improved visual acuity at 12 months as compared to anti-VEGF monotherapy (Jaffe et al. 2017; Sadiq et al. 2016; clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01944839).

The neuroprotective effect of factors such as Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or Ciliary neurotrophic factor (CNTF) has been extensively reported, with a recognized potential for the treatment of a wide variety of neurodegenerative diseases (Andrieu-Soler et al. 2005; Garbayo et al. 2009; Stahl et al. 2011; Harper et al. 2011; Nagahara and Tuszynski 2011; Pease et al. 2009). The advantage of using neuroprotective factors in AMD is not only limited to complementary therapy. This is the case of Pigment epithelium-derived factor (PEDF), presenting neuroprotective and anti-angiogenic properties (Garcia-Garcia et al. 2017). Also, some studies have demonstrated that GDNF showed some beneficial effects at vascular endothelium level (Nishikiori et al. 2007), suggesting an additional benefit in the maintenance of the blood-retinal barrier in diseases such as AMD or diabetic macular edema. Administration of GDNF/VitE microspheres have recently been shown to lead to functional and structural rescue of photoreceptors in a well-characterized model of inherited photoreceptor degeneration: the rhodopsin knockout mouse ($\rho^{-/-}$) (García-Caballero C. 2018) and GDNF-BDNF

combination therapy is well-documented to increase ganglion cell survival (G. de Rezende Corrêa 2015) and to increase phagocytosis in RPE cells from AMD patients (Inana et al. 2018).

From a therapeutic perspective, the treatment of chronic diseases, such as AMD, requires an effective concentration of the active agents in the target side for prolonged periods of time. However, it is difficult to achieve this purpose via topical or systemic administration. The intravitreal injection of drugs is the most accepted method to treat vitreoretinal disorders, nevertheless a high dose and repeated injections are necessary to maintain drug levels in the therapeutic range (Herrero-Vanrell and Refojo 2001; Herrero-Vanrell et al. 2014; Kuno and Fujii 2010; Moritera et al. 1991). Biodegradable microparticulate systems possess several characteristics that make them interesting as drug delivery vehicles. First, microspheres provide an alternative to multiple injections, controlling the release of the active substances over time and consequently, reducing the frequency of intraocular injections a patient must endure each year and the associated risks as retinal detachment, endophthalmitis, vitreous hemorrhage and cataract (Jager et al. 2004; Bravo-Osuna et al. 2018). Furthermore, they are biocompatible, practically inert into the vitreous cavity, showing good tolerability (G.G. Giordano 1995; Veloso et al. 1997) and can be easily eliminated from the body (Herrero-Vanrell and Refojo 2001; Rong et al. 2014). According to that, the use of microspheres made with poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and loaded with neurotrophic factors and antioxidants emerges as a promising strategy in the treatment of retinal chronic diseases (Bravo-Osuna et al. 2016).

Therefore, ideally, one therapeutic approach for retinal diseases should be one sustained-delivery that simultaneously mitigates choroidal angiogenesis, helps in RPE restoration and protects retinal neurons. As the neuroprotective effects of GDNF and BDNF are well established, the aim of the present work was to evaluate the potential usefulness of GDNF/VitE and GDNF/VitE with BDNF, released from sustained delivery systems as a coadjuvant therapy against retinal diseases.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Microspheres elaboration: Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) PLGA ratio 50:50 (Resomer® 503) was purchased from Boehringer Ingelheim (Pharma Co., Germany) and α -tocopherol acetate (VitE) was obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). GDNF/VitE(20)-loaded PLGA microspheres (MSs-GE) and GDNF/BDNF/VitE(40)-loaded PLGA microspheres (MSs-GBE) were prepared using the S/O/W emulsion-solvent evaporation technique previously described (Checa-Casalengua 2011). The first formulation was performed suspending 20 μ g of recombinant human GDNF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in 20 μ L of VitE. In the second one, 36 μ g of recombinant human GDNF and 20 μ g of recombinant human BDNF (R&D Systems) were suspended in 40 μ L of VitE. In both cases, the suspensions were carried out throughout gentle sonication at low temperature (Sonicator XL, Head Systems, Iowa, USA) for 30 sec in order to reduce the risk of proteins alteration (Al Haushey et al. 2007). The formed suspensions were mixed with 1 mL of PLGA solution in methylene chloride (20 % w/v). The S/O-prepared organic phases were emulsified with 5 mL of Polyvinyl alcohol (PVA, 72,000 g/mol; Merck KgaA, Darmstadt, Germany). MilliQ® water solution (2% w/v). Both emulsifications were performed in a homogenizer (Polytron® RECO, Kinematica GmbH PT 3000, Lucerna, Switzerland) at 5,000 rpm for 1 min. The resulting S/O/W emulsions were subsequently poured onto 100 mL of an aqueous PVA solution (0.1%) and continuously stirred for 3 hours at room temperature, to allow complete evaporation of the organic solvent. Once formed, microspheres were washed with MilliQ® water to eliminate the PVA and separated according to their particle size by filtration under vacuum conditions using different sieves sizes (>53, 38, 20, 1 μ m). Solid particles were rapidly frozen (methanol/ice mixture) and freeze-dried to obtain a free-flowing powder. The dried microspheres were kept at -20 °C under dry conditions until use.

VitE microspheres were prepared using the same protocol explained before except that no neurotrophic factor was included, two bathes containing 20 μ L and 40 μ L of VitE respectively were elaborated: VitE(20)-loaded PLGA microspheres (MSs-E20) and VitE(40)-loaded PLGA microspheres (MSs-E40).

Additionally, blank PLGA microspheres without neurotrophic factors and VitE were fabricated (MSs).

2.2 Microspheres characterization:

The *Production yield percentage (PY%)* of each batch was calculated according to the following equation (1):

$$PY \% = \frac{\text{Weight of MSs (W}_1\text{)}}{\text{Total weight of active substances and polymer (W}_2\text{)}} \times 100 \text{ (1)}$$

2.2.1 Morphological evaluation: The morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (SEM; Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Microspheres were gold sputter-coated before observation.

2.2.2 Mean particle size and particle size distribution were measured by light scattering in a Microtrac® S3500 Series Particle Size Analyzer (Montgomeryville, PA, USA). A suitable amount of freeze-dried microspheres was suspended in deionized water. The average particle size was expressed as the volume mean diameter in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$ for 3 measurements per batch.

2.2.3 Encapsulation efficiency of neurotrophic factors: The content of encapsulated proteins in PLGA microspheres was determined by a liquid/liquid extraction method. Briefly, 5 mg of microspheres were placed in 0.7 mL of methylene chloride. Once the polymer was completely dissolved, 0.7 mL of PBS 7.4 and BSA 1% (diluent reactive provided in the ELISA kit) was added and the mixture was shaken in order to extract the proteins from the organic solution. After centrifugation at 7,880 g for 15 min, the aqueous phase was collected and the GDNF and BDNF content in the solution was quantified using Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) technique. The liquid/liquid extraction was repeated four times to recuperate the totally of the entrapped proteins and the assays were performed in duplicate. The amount of proteins recovered in each formulation was divided by the total mass added in the formulations to calculate proteins loading efficiency.

2.2.4 In vitro release studies of neurotrophic factors: For determination of proteins release profiles, 5 mg of microspheres were suspended in 1.5 mL of PBS pH 7.4 containing 1.0% BSA and microbiologically preserved with 0.02% Sodium Azide. Incubation took place in “Low binding” Eppendorf® vials

maintained at 37°C in a shaker with a constant agitation of 100 rpm (Memmert Shaking Bath, Memmert, Schwabach, Germany). At defined time intervals (1h, 24h and one at week until the end of the assay) the microspheres suspensions were centrifuged at 490 g for 5 min and the supernatants were removed and replaced by an equal volume of fresh medium to continue the release test. The released proteins were analysed by ELISA (R&D Systems) after dilution with the diluent reactive provided in the ELISA kit to obtain a protein concentration in the suitable ranges (15-1,000 pg/mL for GDNF and 24-1,500 pg/mL for BDNF).

2.3 Cell culture

Human retinal pigment epithelial cells, ARPE-19 (ATCC® CRL-2302) and a primary primate endothelial choroidal cell line, RF/6A (ATCC® CRL-1780) were used in this study. ARPE-19 cells were grown to confluence in a standard incubator at 37°C under humidified 5% CO₂ conditions in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 1% fungizone, and L-glutamine penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich). RF6A cells were grown to confluence in a standard incubator at 37°C under humidified 5% CO₂ conditions in Eagle’s Minimum Essential Medium (ATCC, 30-2003) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich) 1% fungizone, and L-glutamine penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich).

2.3.1 Treatments: Then, cells were treated with treatments according Table 1 for 24h. The amount of MSs of each treatment was calculated to administer the same doses of vitamin E. Sodium Iodate (NaIO₃) 1500 µg/ml for ARPE-19 cells and 500 µg/ml for RF/6A were used as positive control for apoptosis.

Table 1. Microspheres (MSs) formulations and amount of tested MSs

FORMULATION	GDNF (µg)	BDNF (µg)	VitE (µL)	TOXICITY ASSAY		WOUND CLOSURE ASSAY	
				Amount of MSs (µg)	NAMING	Amount of MSs (µg)	NAMING
MSs-GE20	20	-	20	20/40	MSs-GE20_40 / MSs-GE20_20	40	MSs-GE20_40
MSs-GBE40	36	20	40	20/40	MSs-GBE40_20 / MSs-GBE40_20	20	MSs-GBE40_20
MSs	-	-	-	20/40	MSs_20 / MSs_40	-	-
MSs-E20	-	-	20	20/40	MSs-E20_20 / MSs-E20_40	40	MSs-E20_40
MSs-E40	-	-	40	20/40	MSs-E40_20 / MSs-E40_40	20	MSs-E40_20

2.4 Retinal pigment epithelium and endothelial cell characterization

To verify that ARPE-19 and RF6A cells preserved their phenotype, RPE65 and isolectin staining was performed. Briefly, 10,000 ARPE-19 and 90,000 RF/6A cells were seeded on a 10 mm dish (Menzel-Glaser, Waltham, Massachusetts). Methanol was used for cellular fixing. Afterward, cells were washed with 1x phosphate buffered saline (PBS) and permeabilized with 3% TritonX100, 0.5% Tween20. PBS-1% fetal serum bovine serum (FBS) was used for blocking nonspecific unions. Cells were incubated with the primary anti-RPE65 antibody for ARPE-19 cells (1:100; AB78036, Abcam, Cambridge, USA) and isolectin (1:240; B-1205, Vector laboratories) for RF/6A cells diluted in 1% PBS-BSA at 4 °C for 24 h and washed once more with 1x PBS and then incubated with the secondary fluorescent antibodies goat anti-mouse 488 (A11029, Carlsbad, Life technologies, California, USA) for RPE65 antibody and streptoavidin Alexa Fluor 594 (S32356, Life technologies Carlsbad, Life technologies, California, USA) for isolectin marker during 1 h. Nuclei were labelled with DAPI (40, 6- diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, San Louis, Missouri, USA) and images were obtained using a confocal microscope (LSM800, Zeiss, Oberkochen, Germany) (Fig. S1).

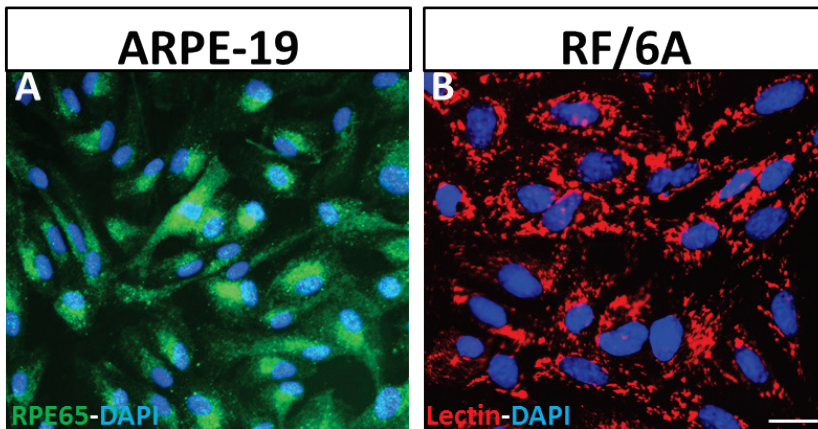


Figure S1. ARPE-19 and RF/6A cells phenotype in culture. ARPE-19 cells were positive for RPE65 (A, green) and RF/6A cells were positive for lectin (B, red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar 20 μm .

2.5 Cellular viability assay MTT

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay was used to determine cellular viability. Ten-thousand ARPE-19 and RF/6A cells were grown onto 96-well plates in DMEM with 10% FBS until confluence. Then, cells were cultivated for 1 additional week in 1% FBS–DMEM. Microspheres were added to the culture medium over 24 h at doses specified above and cellular viability was analysed using the CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA), following the manufacturer's instructions.

2.6 Cell migration assays on ARPE-19 cells and angiogenesis assays on RF/6A cells assessed by wound healing

Wound healing assay was used to evaluate the effect of microspheres in ARPE-19 cell migration and on RF/6A cells for angiogenesis assessment. For these experiments, 150,000 cells were seeded onto 24-well culture plates until confluence. Then, a linear wound was created in the middle of each well using a 10- μ l micropipette tip. After culture media replacement, microspheres were added. Photographs of 2 areas on each well were obtained at 0, 7, 24, 30, 48 and 54 hours for ARPE-19 cells and for RF/6A cells one additional measurement at 72 h was taken. Photographs were taken using a phase contrast inverted microscope equipped with a digital camera (Zeiss, Oberkochen, Germany). Every set of images was analyzed using Fiji software (a distribution of ImageJ) V1.48q to quantify the area closed for each group.

2.7 TUNEL assay to detect cell apoptosis

Apoptosis was performed in coverslips using *In situ cell death detection kit* with TMR Red according to the manufacturer instructions (Roche, West Sussex, UK) (Roche #12 156 792 910) and stored at 4°C until analysis. Nuclei were labelled with DAPI (40, 6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, San Louis, Missouri, USA) and images were obtained using a confocal microscope (LSM800, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.8 Statistical analysis

Differences between study groups after a statistically significant analysis of variance (ANOVA) or Kruskal–Wallis tests were performed using a post-hoc Bonferroni’s correction or Mann–Whitney U test for multiple comparisons. A p value <0.05 was considered to be statistically significant. Graphics and statistical analysis were performed using GraphPad software 5.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Data are reported as mean ± standard error of the mean (SEM).

3. RESULTS

3.1 Microspheres characterization

The encapsulation method proposed in this work led to a high production yield in both formulations 83.7% for MSs-GE and 84.1% for MSs-GBE. Similar values were obtained for control microspheres (MSs): MSs 88.4%, MSs-E20 88.1% and MSs-E40 83.5%. The morphology of microspheres was evaluated by scanning electron microscopy (Figure 1). In all cases spherical particles were obtained showing some porous on the surface. Microspheres were performed in the micro-range 20-40 μm . The particle size distribution evaluation, observed in Figure 1, denoted a mean particle size of $24.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$ for MSs-GE, and $23.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ for MSs-GBE. Control MSs ranged into: $24.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ for MSs, $25.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ for MSs-E20 and $23.9 \pm 1.4 \mu\text{m}$ for MSs-E40 (Table 2).

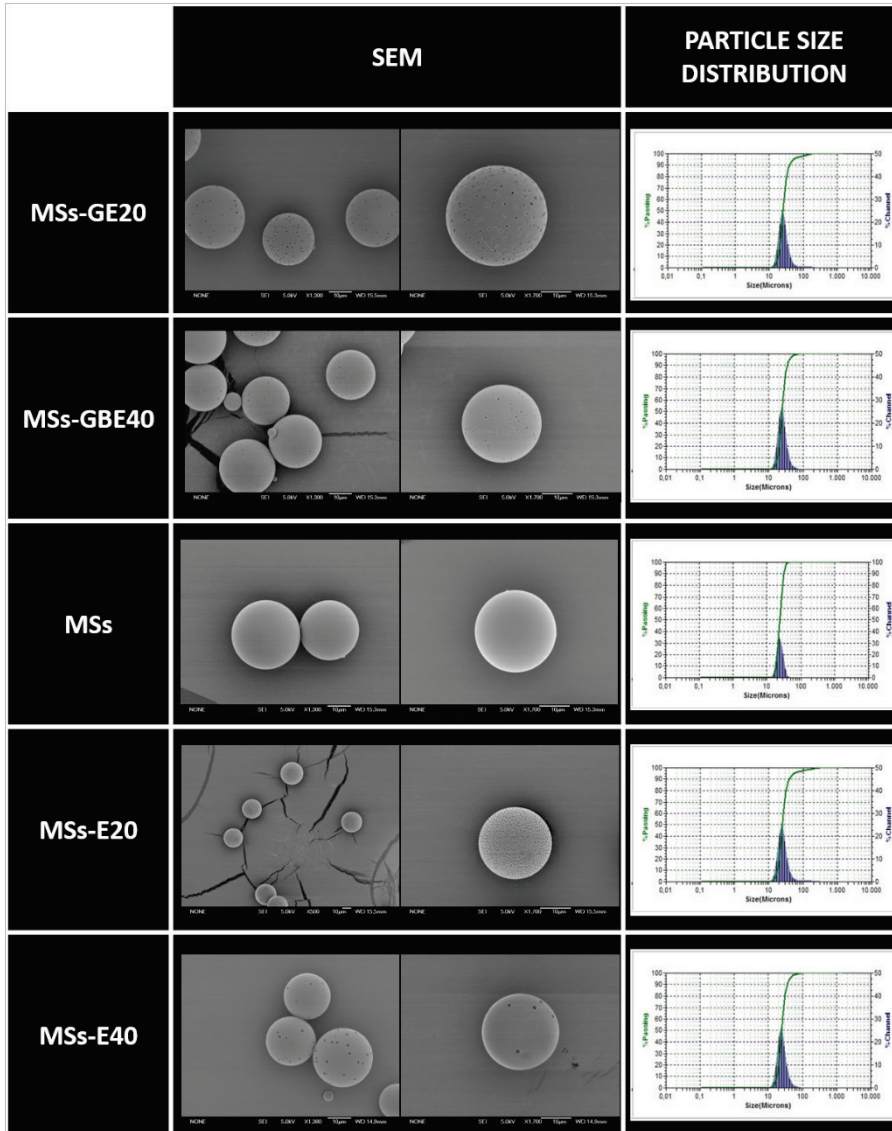


Figure 1. Morphological evaluation (Scanning electron microscopy) and particle size distribution from the top to the bottom: GDNF/VitE(20/20)-MSs, GDNF/BDNF/VitE(36/20/40)-MSs, PLGA-MSs, VitE(20)-MSs, VitE(40)-MSs. SEM investigation showed the presence of spherical particles with comparable and regular size distributions, which were confirmed by particle size evaluation.

Table 2. Production yield, mean particle size and encapsulation efficiency data for each formulation. Data are shown as mean \pm SD.

FORMULATION	PRODUCTION YIELD (%)	MEAN SIZE (μm)	ENCAPSULATION EFFICIENCY			
			ng GDNF/mg MSs	ng BDNF/mg MSs	EE GDNF (%)	EE BDNF (%)
MSs-GE20	83.7	24.7 \pm 0.3	19.2 \pm 2.9	-	21.02 \pm 3.17	-
MSs-GBE40	84.1	23.9 \pm 0.2	27.6 \pm 0.7	12.9 \pm 0.8	17.80 \pm 0.20	15.41 \pm 0.98
MSs	88.4	27.4 \pm 0.8	-	-	-	-
MSs-E20	88.1	25.5 \pm 0.6	-	-	-	-
MSs-E40	83.5	23.9 \pm 1.4	-	-	-	-

3.2 *In vitro* release studies

The protein loading for neurotrophic factors in both formulations (Table 2) was 19.2 \pm 2.9 ng GDNF/mg MSs (21.02 \pm 3.17%) for MSs-GE and 27.6 \pm 0.7 ng GDNF/mg MSs (17.80 \pm 0.20%) and 12.9 \pm 0.8 ng BDNF/mg MSs (15.41 \pm 0.98%) for MSs-GBE.

According to Figure 2, during the first 24 h, 61.02 \pm 4.56% (11.64 \pm 0.89 ng GDNF/mg MSs) of GDNF incorporated in the MSs was delivered from the MSs-GE formulation. After this initial GDNF burst, there was a sequence of fast and slow release steps. First, there was a fast protein delivery for 14 days (63.32 pg GDNF/mgMSs/day). Subsequently, the release rate was 21.41 pg GDNF/mg MSs/day during the next 35 days (from 14th to 49nd day). After a fast delivery within 8 week (76.27 pg GDNF/mgMSs/day), the MSs-GE formulation released the GDNF in a sustained fashion (37.47 pg GDNF/mgMSs/day) until the end of the assay (Figure 2A).

Regarding MSs-GBE formulation, the initial burst effect of GDNF released in the first 24h were 22.86 \pm 1.44 ng GDNF/mg MSs corresponding to 84.95 \pm 4.39%. After a fast release during the first 14 days (102.78 pg GDNF/mgMSs/day), a slow release step occurred from day 14 to day 42 (27.31 pg GDNF/mgMSs/day). Subsequently, a fast delivery within 7 week (184.55 pg GDNF/mgMSs/day) was observed. Finally, GDNF was released from MSs-GE in a controlled manner until day 77 (13.44 pg GDNF/mgMSs/day). The initial burst effect of BDNF released in the first 24h was 10.96 \pm 1.02 ng BDNF/mg MSs corresponding to 84.61 \pm

2.49% of BDNF encapsulated in MSs-GBE. After that, a sustained release of BDNF was observed until the end of the study (day 77) (Figure 2B).

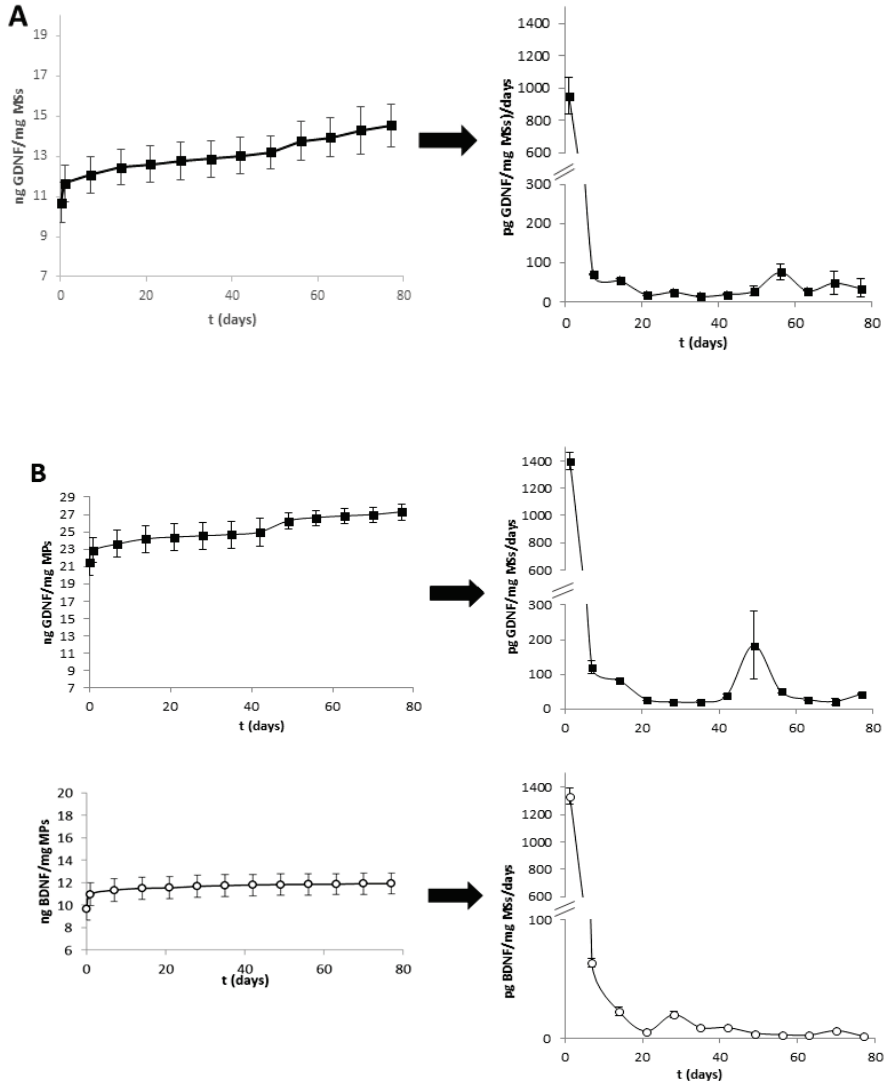


Figure 2. (A) Cumulative GDNF release profile (ng GDNF/mg MSs) and release rate of GDNF (pg GDNF/mg MSs/day) from GDNF/Vit E microspheres. **(B)** Cumulative GDNF and BDNF release profile (ng GDNF or BDNF/mg MSs) and release rate of GDNF and BDNF (pg GDNF or BDNF/mg MSs/day) from GDNF/BDNF/Vit E microspheres. GDNF (■) and BDNF (o). Release media: PBS (pH 7.4) with 1.0% of BSA and 0.02% Sodium Azide.

3.3 GDNF and BDNF MSs are safe for ARPE-19 and RF/6A cells

Neither MSs-GE nor MSs-GBE groups showed any sign of toxicity with regards to MTT measurement in ARPE-19 and RF/6A cells compared to saline group

after 24 hours (Figure 3A and 3C, respectively). MSs groups carrying VitE as controls for the microspheres did not exhibit cytotoxicity in ARPE-19 or RF/6A cells (Figure 3B and 3D, respectively).

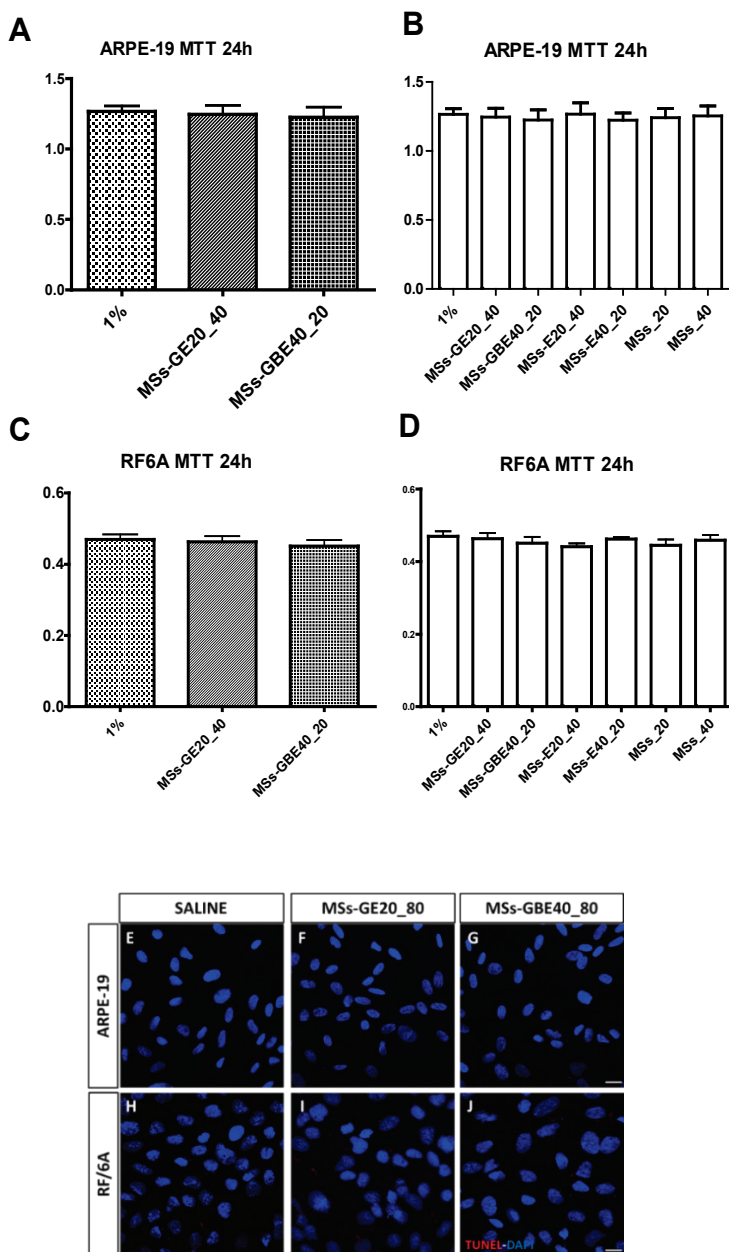


Figure 3. Safety of the delivery of neurotrophins by microspheres. MSs-GE and MSs-GBE showed no alterations in ARPE-19 (A) and RF/6A (C) cell viability measured by MTT. Also, controls showed similar cell viability values in ARPE-19 (B) and RF/6A cells (D). No TUNEL (red) positive cells were detected in ARPE-19 (E-G) and RF/6A (H-J) after MSs-GE20-80 (F and I) and MSs-GBE40-80 (G and J) treatments compared to saline (E and H). DAPI (blue). Scale bar 20 μ m.

Moreover, TUNEL assay demonstrated that GDNF and/or BDNF, even at higher doses than those used for functional (migration and angiogenesis) studies did not induce apoptosis to ARPE-19 (Figure 3E-G) and RF/6A cells (Figure 3H-J). This result is in agreement with the results obtained in cell viability assays. Similar results were found in ARPE-19 and RF/6A cells incubated with MSs controls for 24h. Apoptotic cells were only detected in NaIO₃ (positive control) treated cells (Figure S2).

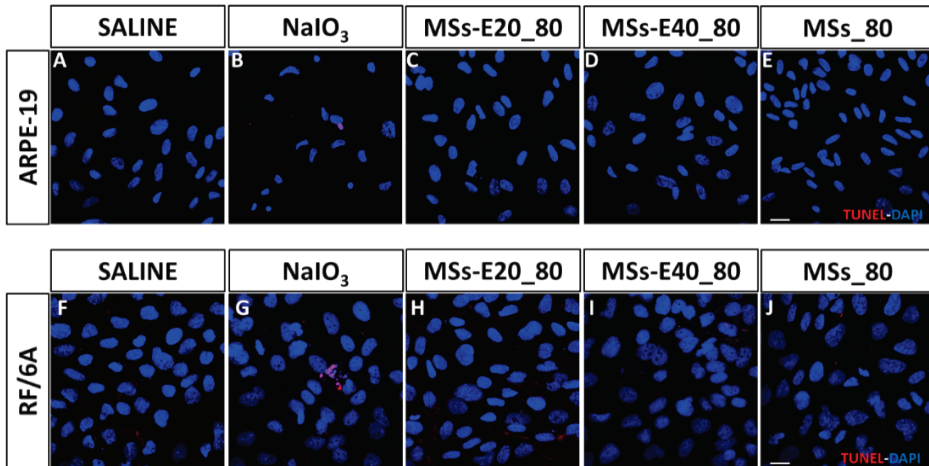


Figure S2. TUNEL detection in ARPE-19 (C-E) and RF/6A (H-J) cells after treatment with MSs-E20_80, MSs-E40_80 and MSs_80. Apoptosis was detected by TUNEL (red) and nuclei were stained with DAPI (blue). ARPE-19 cells were incubated with MSs for 24h (A-E), RF/6A cells was treated with MSs for 24h (F-J). No TUNEL positive cells were found after treatments in ARPE-19 and RF/6A cells. NaIO₃ was used as a positive control for inflammation in ARPE-19 (B) and RF/6A cells (G). Scale bar 20 μ m.

3.4 Wound closure analysis: migration in ARPE-19 and angiogenesis in RF/6A cells

After wound healing analysis in ARPE-19 cells, differences in wound closure time-lapse were observed in MSs-GBE group compared to MSs-GE and to controls (Figure 4). In this sense, wound closure was significantly higher in MSs-GBE compared to GE after 24 hours (Figure 4A) and after 30 hours (Figure 4B) from scratch ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively; Figure 4A and 4B). Moreover, wound closure in MSs-GBE treatment was similar than control whereas MSs-GE

treatment showed significantly reduced wound closure compared to control at 30 hours ($p < 0.05$, Figure 4B). There was no statistically significant difference in wound closure at 7, 48 and 54 hours but the progress in migration between MSs-GBE and MSs-GE treated groups was different (Figure 4C and 4D). MSs controls loaded only with VitE did not differ in migration at 24 and 30 h compared with saline (E and F, respectively).

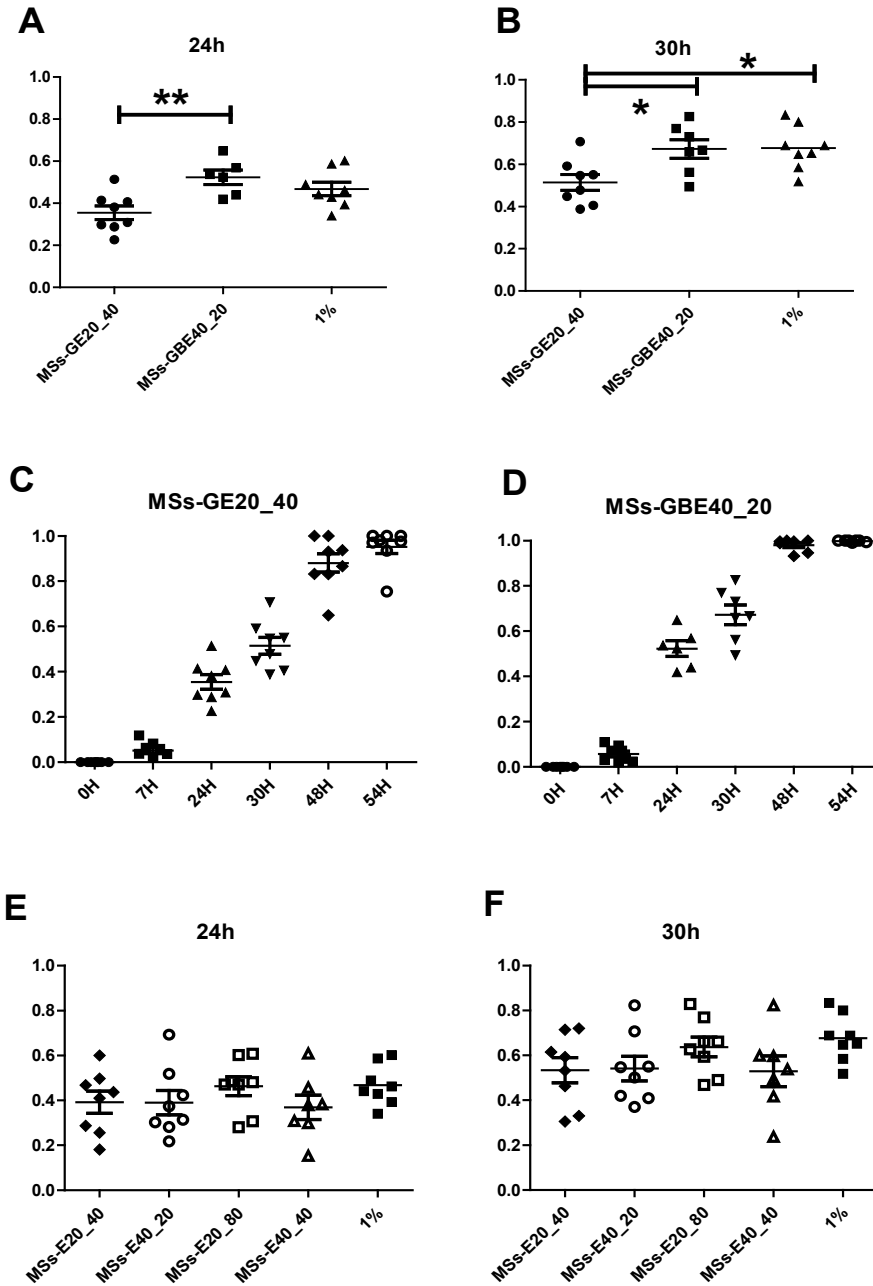


Figure 4. Wound closure in ARPE-19 cells represented by scatter plot. MSs-GBE treated cells migrated more rapidly than MSs-GE treated cells both at 24 h (A) and 30 h (B) from scratch ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). MSs-GBE cells migrated similarly than controls; however, MSs-GE migrated significantly slowly than controls at 30 h (B). There is a different pattern in timeline migration between MSs-GBE and MSs-GE treated groups (C and D, respectively). MSs controls did not differ in migration at 24 and 30 h compared with saline (E and F, respectively). $n = 7-9$

In contrast, wound closure was similar for all groups of study in RF/6A endothelial cells and we did not find any statistically significance between any of them at any time point (Figure 5A-F).

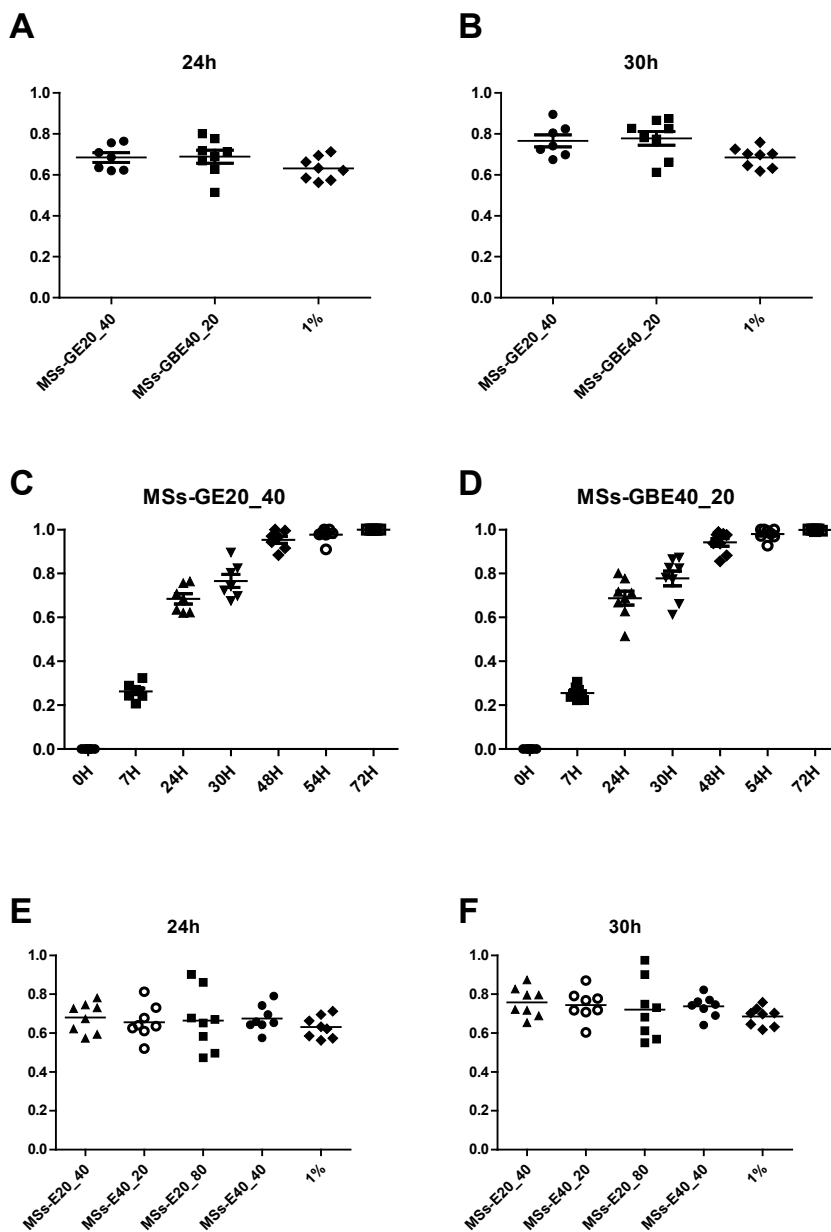


Figure 5. Wound closure in RF/6A cells represented by scatter plot. No differences were found between MSs-GBE and MSs-GE groups at 24 (A) and 30 h (B) in angiogenesis assessment. Moreover, wound closure patterns were similar for both treatments, MSs-GBE and MSs-GE. n=7-9

4. DISCUSSION

The present work suggests for the first time a beneficial role of a combination of BDNF and GDNF/VitE in RPE migration improvement using a long-lasting delivery system. Hence, this therapeutic approach could be useful as coadjuvant with the current antiangiogenic therapy in a more personalised strategy for chronic retinal pathologies such as AMD. Importantly, we have confirmed the safety for epithelial and endothelial cells.

The neuroprotective properties of neurotrophic factors make them a useful therapeutic approach for the treatment of retinal degenerative diseases (P.D. Koeberle 2002; Peinado-Ramon et al. 1996). Among them, GDNF has demonstrated to have strong neurotrophic properties in the retina by preserving photoreceptor cells functionality in animal models of retinal degeneration (*rd* mouse), enhancing rod outer segment maintenance and increasing the number of photoreceptors expressing opsin (Carwile et al. 1998; Frasson et al. 1999; Politi, Rotstein, and Carri 2001). BDNF has been found to be downregulated in oxidative stress-related environment (high glucose) in ARPE-19 cells (Li et al. 2018).

Treatment of ocular multifactorial diseases with a combination of active substances is currently in the research pipeline. In some cases, the combination of two or more active substances has demonstrated positive effects as different pathways of the diseases at multiple levels are blockaded. This is the case of administering GDNF with docosahexaenoic acid presenting an additive effect both on photoreceptor survival and on opsin expression (Politi, Rotstein, and Carri 2001). Another example is the co-administration of both neurotrophic factors (GDNF and BDNF) in an animal model of optic nerve axotomy, enhancing the survival of retinal ganglion cells (RGC) compared with the injection of either, GDNF or BDNF, alone (P.D. Koeberle 2002; Yan et al. 1999). However, combination therapy by simultaneous administration of free active compounds is limited due to such events as short-half lives, adverse effects or unpredictable *in vivo* distributions (He et al. 2016). Therefore, the applicability of a synergetic therapy in chronic retinal diseases is totally linked to the development of devices able to sustain therapeutic drug concentrations in target tissues for extended periods of time (Garcia-Caballero et al. 2017). Consequently, considerable

efforts have been made to co-incorporate and control the release of several neuroprotectants from a single carrier system. Thus, one of the formulations tested in the present work, combining GDNF/VitE, has demonstrated to be effective in retinal ganglion cells rescue for at least eleven weeks after a single intravitreal injection in an animal model of glaucoma (Checa-Casalengua 2011).

Mature RPE cells retain an ability to divide throughout life. In particular, proliferating peripheral RPE cells migrate into central senescent regions of the retina to complete age-related central RPE loss (Kokkinopoulos et al. 2011). Interestingly, the mature RPE is held in a state of quiescence by the adjacent neural retina, and RPE cells begin to proliferate in response to retinal degeneration (Al-Hussaini et al. 2008). In this sense, Machalinska et al. confirmed that the repairing mechanisms within injured retinas involve a significant glial cell reaction marked by glial cell proliferation, migration from their original location toward the injury site, followed by a significant overproduction of neurotrophins such as BDNF, GDNF and NT-3 (Machalinska et al. 2013). Also, in the retina, BDNF was discovered to promote cell differentiation and inhibit inflammation under pathological conditions in the cell population of RPE (Kaviarasan et al. 2015; Hackett et al. 1998). This result agrees with our observations, where RPE migration is improved by the releasing of the combination of BDNF and GDNF/VitE.

Some studies reported RPE tears and intraocular inflammation after anti-VEGF therapy (Nagiel et al. 2013; Miura, Klettner, and Roider 2010; Ford et al. 2011) and others showed an increased progression of GA (Kwong and Mohamed 2014; Lois et al. 2013; Schutze et al. 2015; Young et al. 2014). Moreover, the number of injections received has been found to be significantly related to the progression of atrophy (Lois et al. 2013). However, it is impossible to distinguish if these effects are a consequence of the natural course of the disease or are caused by the anti-VEGF therapy (Schutze et al. 2015). GA could be a complication of VEGF inhibition at the RPE level, in addition to being attributable to the natural course of AMD causing RPE damage (Schutze et al. 2015). It has been demonstrated in mice that the absence of soluble VEGF can lead to the development of focal choroidal atrophy and RPE loss (Lois et al. 2013). On the contrary, in large controlled trials of anti-VEGF drugs in diabetic macular edema and retinal vein occlusion, macular atrophy attributable to these drugs has not

been detected (Heier et al. 2012; Schmidt-Erfurth et al. 2014; Brown et al. 2013; Bhisitkul et al. 2015; Campochiaro et al. 2014; Do et al. 2012). Further, in treated AMD, RPE atrophy spares the retinal regions beyond the arcades, which are also exposed to VEGF inhibition (Bhisitkul et al. 2015). In spite of the initial trigger, the consequence is that RPE is damaged, and our combination of BDNF and GDNF/VitE microspheres could contribute to prevent or restore that damage.

Clinical observations have shown that in vivo the RPE has very limited ability to regenerate and consequently degeneration of these cells leads to photoreceptor death and irreversible blindness (Chichagova et al. 2018). A possible solution to this problem is by increasing intraocular neurotrophins levels (Machalinska et al. 2013). Thus, cells have been injected intravitreally, both in capsulated form and in a suspension. Neurotech (Cumberland, RI, USA) have used a cell capsule implanted into the vitreous cavity and anchored at the pars plana containing human RPE cells genetically modified to overexpress CNTF and encapsulated in a polyethylene terephthalate scaffold. Phase I and II trials in patients with AMD (and RP) have shown the device is well tolerated but evidence of efficacy was less clear, and the technology is now being considered for other applications, including to deliver anti-angiogenic agents in AMD (NCT02228304).

Moreover, recent studies have pointed out the possibility of using neurotrophic factors as anti-angiogenic agents (C.J. Barnstable 2004; Fan, Crawford, and Xiao 2011). PEDF has demonstrated to inhibit the migration of endothelial cells in a dose-dependent manner and reduce pathological blood vessel formation in the eye (Tombran-Tink 2010). Recently, it has been published by some authors of this consortium that sustained non-viral PEDF released is able to reduce CNV area in a laser-induced CNV rat model (Garcia-Garcia et al. 2017). Therefore, the possibility of using neurotrophic factors as anti-angiogenic agents constitutes an interesting platform for the treatment of vascular retinal pathologies. However, in our study, neither the GDNF/VitE alone and combined with BDNF was able to reduce the endothelial cell migration in the wound healing assay simulating angiogenesis.

Therapeutically, investigation for a combination of several active substances in drug delivery systems is of high interest. To our knowledge, this is the first study demonstrating that GDNF in association with BDNF in a novel microsphere slow-

delivery system may contribute to the improvement of RPE migration. This finding may have therapeutic relevance for chronic diseases in which RPE degeneration is present and sustained amounts of active substances are required. Although there are some evidences showing a possible role of GDNF and BDNF in reducing angiogenesis, our results could not demonstrate differences in the area of wound closure covered; however, further studies are needed to test different technical approaches such as tube formation on matrigel base or choroid explants, to better confirm this point. Nevertheless, the therapeutic approach described herein warrants further analysis in combination with anti-VEGF therapy.

Hence, the development of biodegradable microspheres including neurotrophic factors as GDNF and BDNF, which could be injected into the vitreous cavity to treat chronic vascular retinal pathologies, reducing choroidal angiogenesis and simultaneously protecting retinal neurons results of great interest. The microspheres developed in the present experimental work were optimized to obtain spherical particles in the micro-range 20-40 μm , suitable for injection them as an aqueous suspension into the vitreous using standard needles (27-34G) and adequately to control the drugs release during weeks. The GDNF and BDNF release profiles from these microspheres were characterized by a high initial burst followed by a sustained release for 77 days in amounts of pg/mg MS. Such small amounts of neurotrophic factors have been demonstrated to be neuroprotective in the retina (Checa-Casalengua 2011).

However, the microencapsulation of neurotrophic factors jeopardizes their biological activity due to the easy degradation and instability of the proteins (Sinha and Trehan 2003; Pisal, Kosloski, and Balu-Iyer 2010; Jiskoot et al. 2012) For this reason, the employment of an appropriate method to encapsulate these biotechnological products is extremely important. A successful approach has been achieved in a previous work carried out by the authors in which a new microencapsulation method based on the S/O/W emulsion solvent evaporation technique was proposed (Checa-Casalengua 2011). For this purpose, the neurotrophic factor was incorporated in its solid state in PLGA microspheres. Moreover, vitamin E was also included in the formulation. The inclusion of the protein in its solid state reduces the risk of alteration during manipulation and the addition of VitE offered additional protection to protein due to its antioxidant nature (Engin 2009). The so prepared GDNF/VitE loaded PLGA microspheres

were able to promote the survival of RGC and their axons for at least eleven weeks in a glaucoma animal model (rats) (Checa-Casalengua 2011). In the reported work, microspheres loaded with VitE alone did not produce survival of RGC (anti-NeuN positive cells). One of the limitations of this study is that the observed migratory RPE effects occurred during the initial burst release of proteins from the MSs (Yeo and Park 2004). While a high initial release is generally associated with proteins delivery systems, slow and maintained proteins releases have demonstrated long-lasting therapeutic effects (Checa-Casalengua 2011; Ward et al. 2007). Thus, further studies can be designed to test the effect of a long-term delivery of these formulations. Moreover, these results must be confirmed in experimental models of higher complexity, preferably animal models of disease.

In conclusion, we have reported a novel beneficial role of a safe sustained delivery system containing the combination of BDNF and GDNF/VitE for the RPE regeneration making this strategy as the ideal to be further tested with anti-VEGFs. Therefore, our approach is in the line of new strategies combining anti-VEGF therapies with other molecules to improve the quality and duration of responses while reducing frequency of treatments and diminishing side effects (Rodrigues et al. 2009). This is highly important in chronic retinal diseases involving degeneration of the RPE monolayer, such as AMD.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (FEDER-MAT 2013–43127R), Instituto de Salud Carlos III (RETICS-FEDER RD12/0034 and RD 16/0008), and Complutense Research Group UCM 920415 for financial support. Authors are grateful to the technical SEM assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI, UCM) and to Jaione Bezunartea Bezunartea and Idoia Belza Zuazu for their outstanding technical contribution in cell culture and wound healing studies.

CAPÍTULO II – CHAPTER II

Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma

**SIMULTANEOUS CO-DELIVERY OF NEUROPROTECTIVE DRUGS
FROM MULTI-LOADED PLGA MICROSPHERES FOR THE
TREATMENT OF GLAUCOMA**

Arranz-Romera A, Davis BM, Bravo-Osuna I, Esteban-Pérez S, Molina-Martínez I.T, Shamsheer E, Ravindran N, Guo L, Cordeiro MF*, Herrero-Vanrell R*

Journal of Controlled Release 297 (2019) 26-38

ABSTRACT

Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative disorder and one of the leading causes of irreversible blindness globally and for which intraocular pressure is the only modifiable risk factor. Although neuroprotective therapies have been suggested to have therapeutic potential, drug delivery for the treatment of ocular disorders such as glaucoma remains an unmet clinical need, further complicated by poor patient compliance with topically applied treatments. In the present study we describe the development of multi-loaded PLGA-microspheres (MSs) incorporating three recognised neuroprotective agents (dexamethasone (DX), melatonin (MEL) and coenzyme Q10 (CoQ10)) in a single formulation (DMQ-MSs) to create a novel sustained-release intraocular drug delivery system (IODDS) for the treatment of glaucoma. MSs were spherical, with a mean particle size of $29.04 \pm 1.89 \mu\text{m}$ rendering them suitable for intravitreal injection using conventional 25G-32G needles. Greater than 62% incorporation efficiency was achieved for the three drug cargo and MSs were able to co-deliver the encapsulated active compounds in a sustained manner over 30-days with low burst release. *In vitro* studies showed DMQ-MSs to be neuroprotective in a glutamate-induced cytotoxicity model (IC_{50} $10.00 \pm 0.94 \text{ mM}$ versus $6.89 \pm 0.82 \text{ mM}$ in absence of DMQ-MSs) in R28 cell line. *In vivo* efficacy studies were performed using a well-established rodent model of chronic ocular hypertension (OHT), comparing single intravitreal injections of microspheres of DMQ-MSs to their equivalent individual single-drug loaded MSs mixture (MSsmix), empty MSs, no-treatment OHT only and naïve groups. Twenty one days after OHT induction, DMQ-MSs showed a significantly neuroprotective effect on RGCs compared to OHT only controls. No such protective effect was observed in empty MSs and single-drug MSs treated groups. This work suggests that multi-loaded PLGA MSs present a novel therapeutic approach in the management of retinal neurodegeneration conditions such as glaucoma.

Keywords: Intraocular Drug Delivery, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), Neuroprotection, *In vivo* efficacy, Glaucoma, Co-delivery, Combination therapy

1. Introduction

Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative disorder and one of the leading causes of irreversible blindness worldwide (Flaxman et al. 2017). While this condition is primarily characterised by the loss of retinal ganglion cells (RGCs) and the gradual degeneration of RGC axons in the optic nerve (Lawlor et al. 2017), recent morphological and functional studies have suggested the involvement of other retinal cell types, including atrophic changes in the photoreceptor layer and microglia activation (Asaoka et al. 2017; Ashimatey, King, and Swanson 2018; Ramirez et al. 2017). At present, intraocular pressure (IOP) is the major clinically modifiable risk factor for glaucoma progression (vision loss) and current therapies seek to modulate IOP via reducing aqueous production or increasing outflow (Qu, Wang, and Grosskreutz 2010). With the recognition that glaucoma patients can continue to progress despite well controlled IOP, new therapeutic paradigms for the treatment of this condition are being sought (Pascale, Drago, and Govoni 2012; Anderson and Normal Tension Glaucoma 2003). One such approach is neuroprotection which is defined as a “therapeutic approach” aiming to directly prevent, hinder and, in some cases, reverse neuronal cell damage. (European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 3: Treatment principles and options Supported by the EGS Foundation: Part 1: Foreword; Introduction; Glossary; Chapter 3 Treatment principles and options' 2017) In glaucoma, this translates to non-IOP-dependent treatments that reduce the rate of RGCs loss and therefore preserve vision (Pardue and Allen 2018; Nucci et al. 2016). To date, multiple neurodegenerative processes have been implicated in glaucomatous RGC loss, including: glutamate excitotoxicity, inflammation, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, aggregation of misfolded proteins, neurotrophic deprivation, ischemia and axonal transport dysregulation (Baltmr et al. 2010; Russo et al. 2016; McMonnies 2018). Moreover, it is becoming clear that these events can interact and compound, suggesting that effective treatment of glaucoma may require a multi-modal approach (Tezel 2006; Cuenca, Fernandez-Sanchez, Campello, et al. 2014).

At present, the majority of glaucoma therapies are administered topically as eye drops; however, poor ocular penetration of topically applied drugs to the posterior

ocular segment combined with variable patient compliance limit the utility of this approach (Short 2008). Intraocular injection overcomes both these aspects, but this method of administration is invasive, expensive, burdensome to deliver and associated with small though significant risks of complications (Mitchell 2011). Moreover, the short half-life values of the active substances in the vitreous makes necessary the use of repeated intravitreal injections (V. Andrés-Guerrero 2017). Depending on the size, intraocular drug delivery system (IODDS) are classified as nanocarriers (1–1000 nm), microcarriers (1–1000 μ m), and implants (>1 mm). The choice of the most convenient IODDS depends on the target site, the ophthalmic disease and the duration of the treatment. While implants and microcarriers have received a lot of interest because they can provide long-term delivery of the active substance, nanocarriers have the advantage to be internalised by cells being highly useful for gene therapy (Bravo-Osuna et al. 2018). IODDS based on biodegradable particulate carrier systems have been extensively investigated for the sustained release of therapies to address these problems. Poly(lactide-co-glycolide) acid (PLGA) is approved by the FDA and European Medical Agency for use in intraocular devices (Rong et al. 2014; Short 2008). Among the different IODDS, microspheres (MSs) have recently gained considerable attention for ocular applications (Bravo-Osuna et al. 2016). These controlled-release drug microsystems can be administered as suspensions using conventional 25G-32G needles. Moreover, repeated administration is reduced as IODSS can sustain therapeutic drug concentrations in target tissues for extended periods (Bravo-Osuna et al. 2018). IODDS can additionally be used to personalize therapy by titrating the amount of administered MSs with individual need. The authors postulate that the employment of physical mixtures of different drug loaded-MSs would enable the treatment of more than one therapeutic target simultaneously. A recent published study from our group, however, reported that there is an upper limit to the amount of MSs that can be injected intravitreally; 0.5 mg of PLGA-MSs was found to induce retinal stress and photoreceptor dysfunction in rodents, a phenomenon not observed on administration of 0.1 mg of MSs (Zhao, Rodriguez-Villagra, et al. 2017). To reduce the amount of carrier administered, we have since developed MSs co-delivery systems able to incorporate and control the release of multiple active substances from a single carrier (García-Caballero C. 2018).

The present study describes a MSs formulation incorporating three established therapies with anti-inflammatory and neuroprotective activity; dexamethasone, melatonin and coenzyme Q10. The corticosteroid dexamethasone (DX) is commonly used in the treatment of ocular inflammation in conditions such as diabetic macular edema, central retinal vein occlusion, and uveitis (Saraiya and Goldstein 2011; Zhang, Liu, et al. 2018; Brady et al. 2016). Melatonin (MEL) is an antioxidant with free radical scavenging and neuroprotective activity mediated via multiple mechanisms including the inhibition of the mitochondrial transition pore, reducing NO-induced apoptosis or reducing excitotoxicity Ca^{2+} overload (Lundmark et al. 2007; Wongprayoon and Govitrapong 2017; Siu et al. 2004; Andrabi et al. 2004). Coenzyme Q10 (ubiquinone, CoQ10), an essential cofactor of the electron transport chain, is known for its key role in mitochondrial bioenergetics by maintaining the membrane potential, supporting ATP synthesis and inhibiting reactive oxygen species generation (Littarru and Tiano 2010; Forsmark-Andree et al. 1997; Virmani, Gaetani, and Binienda 2005; Hernandez-Camacho et al. 2018; Davis et al. 2017).

In the present work, we sought to evaluate the effect of a MSs drug co-delivery system (DX, MEL and CoQ10) vs an equivalent physical mixture of single drug loaded MSs on RGC survival using the well-established Morrison's rodent model of ocular hypertension. *In vivo* study sought to produce, characterise and evaluate the ability of novel combinations of established neuroprotective therapies to preserve RGC populations. Endpoints in this study included *in vitro* cell viability and whole-retinal histological assessments of RGC population. The *in vitro* neuroprotective activity of DMQ-MSs formulations were assessed using an *in vitro* glutamate-mediated neurotoxicity model in an immortalised and rat derived neuronal cell line (R28) (Seigel 2014).

While induction of the Morrison's rodent model requires advanced microsurgical skills, it yields the following advantages compared to episcleral vein ligation models, including: (i) the establishment of anterior chamber deepening consistent with aqueous humor outflow obstruction, something not observed in episcleral vein ligation models.(Morrison, Cepurna, and Johnson 2015), (ii) reduced rate of IOP elevation (Morrison 1987), and (iii) reduced risk of ischemic injury (Morrison, Cepurna, and Johnson 2015).

To the authors knowledge, this is the first co-delivery study of three neuroprotective active substances in an IOdds administered to the posterior ocular segment.

2. Materials and methods

Dexamethasone, melatonin and coenzyme Q10 were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis Mo., USA) at the highest available purity. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) 50:50 (Mwt 35,000 g/mol) was purchased from Evonik España (Granollers, Spain). Polyvinyl alcohol 67,000 g/mol (PVA) was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Isopropyl alcohol, methanol and acetonitrile, HPLC grade (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain) were used to prepare the mobile phases in HPLC determinations. All other chemicals were reagent grade and used as received.

2.1 Manufacture of PLGA Microspheres

PLGA microspheres (MSs) containing three neuroprotective agents (dexamethasone (DX), melatonin (MEL) and coenzyme Q10(CoQ10), 2/1/0.5:10) (DMQ-MSs) were prepared by the Oil/Water emulsion solvent extraction-evaporation technique (Fig.1). Briefly, CoQ10 (20 mg) and PLGA (400mg) were first dissolved in 0.7 mL of methylene chloride. 80 mg DX and 40 mg MEL were then ground in a pestle and mortar before dispersing in the organic PLGA solution by ultrasonication in an ice-water bath (Ultrasons; J.P. Selecta, Barcelona, Spain) for 5 minutes, followed by sonication (Sonicator XL; Heat Systems, Inc., Farmingdale, NY, USA) for 1 minute at 4 °C. Finally, the resulting organic phase was emulsified with 5 mL of polyvinyl alcohol (PVA) MiliQ water solution (1% w/v) in a homogenizer (Polytron®RECO, Kinematica, GmbH PT3000, Lucerna, Switzerland, 8,500rpm for 2 min). The first emulsion was then combined with 100 mL of an aqueous PVA solution (0.1%w/v) with magnetic stirred for 3 hours at room temperature to facilitate organic solvent evaporation. After maturation, the formed MSs were washed in distilled water to remove PVA and separated according to their particle size (38-20 µm) by filtration using two sieves (mesh size: 38 and 20 µm). Finally, MSs were lyophilised (Freezing: -

60°C /15 min, Primary drying: -40 °C/12h/0.1 mBar, Secondary drying: 20 °C/2h/0.1 mBar) and resulting cakes stored at -20 °C under dry conditions until required. In addition, MSs loaded with each single drug DX: PLGA (2:10), MEL:PLGA (1:10) and CoQ10:PLGA (0.5:10) and empty MSs in the absence of drug cargo were prepared using the same protocol.

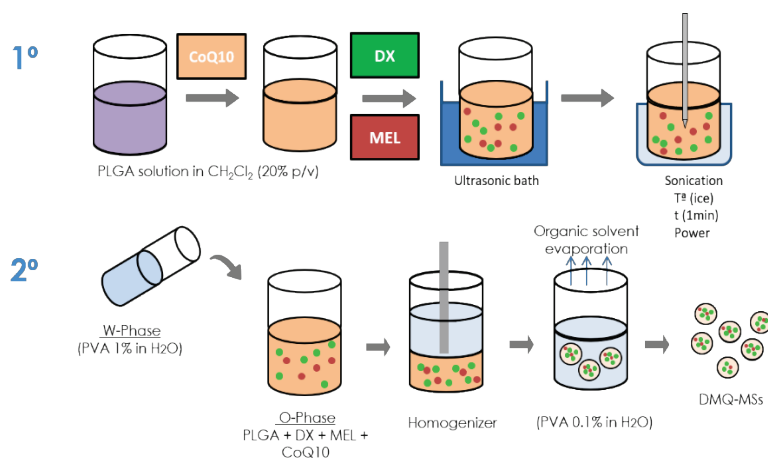


Figure 1. Elaboration process of the multi-loaded MSs.

2.2. Dexamethasone/melatonin/coenzyme Q10 quantification by LC/MS

The LC/MS system comprised a Waters LC instrument (Waters 2707 autosampler and Waters 1525 binary HPLC pump) with a Nova-Pak C18 column (4 μ m, ID 2.1 mm \times 150 mm) with a C18 guard column (3.9 mm \times 20 mm), connected to a Waters 3100 single quadrupole mass spectrometer via Empower 2 (Waters, Milford, USA). The analytical column temperature was maintained at 45 °C. For MSs detection, the ESI source was operated in the positive ion mode (ESI (+)). Selected ion recordings (SIR) CoQ10 mass (m/z) 197, MEL mass (m/z) 174.2 and DX masses (m/z) 393.40 and 147.10 were obtained with the following mass spectrometer source conditions of 3.5 kV electrospray voltage and 130 °C heated capillary temperature. Nitrogen gas (>99.999%) was used for nebulization (100 L/h flow rate, 130 °C source temperature, 5 V extractor voltage) and desolvation (400 L/h flow rate, 300 °C desolvation temperature).

Two different isocratic HPLC methods were developed to quantify drug entrapment efficiencies (method A) and drug release from MSs (method B).

Method A was composed of 50% of 10 mM ammonium acetate/1mL formic acid in methanol and 50% of 10 mM ammonium acetate/1mL formic acid in isopropyl alcohol (flow rate, 0.3 mL/min) and method B 60% of 10 mM ammonium acetate/1mL formic acid in water and 40% of acetonitrile (flow rate, 0.3 mL/min).

2.3. Microspheres characterization

MSs were characterised in terms of production yield (%), mean particle size and size distribution, morphological evaluation, encapsulation efficiency, *in vitro* release studies and DSC Analysis.

2.3.1. Production yield percentage

The yield percentage (PY%) of each batch was calculated according to the following equation (1):

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

[Eq.1]

2.3.2. Mean particle size and particle size distribution

Particle size and the particle size distribution was measured by light scattering Microtrac® S3500 Series Particle Size Analyzer, Montgomeryville, PA, USA). The mean particle sizes, expressed as volume mean diameters, and standard deviation were determined. Each sample was run in triplicate.

2.3.3. Morphological evaluation

The external morphology of the freeze-dried microspheres was observed by scanning electron microscopy (SEM, Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were gold sputter-coated prior to observation. The internal morphology of MSs was examined using thickness slides (70 nm) of cross-section by transmission electron microscopy (TEM, Jeol, JEM-1010, MA, USA). A Leica Cryostat CM

1900 was employed to create the cross-sections of microspheres at -20 °C placed into a synthetic resin medium (Spurr Low Viscosity Embedding Kit).

2.3.4. Encapsulation efficiency

The determination of the drug entrapment efficiencies was quantified as follows: 1 mg of MSs was dissolved in 2.5 mL of methylene chloride, following which drugs were extracted with methanol (6 mL), which also promoted polymer precipitation. After vortex mixing, the samples were centrifuged (5,000rpm for 5 minutes at 20°C) and the methanolic supernatant was recuperated and filtered (0.22µm). High-Performance Liquid Chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) was employed for active substance quantifications according to the method described previously (Method A).

2.3.5. In vitro release studies

5 mg of MSs (DX-loaded MSs, MEL-loaded MSs and DMQ (Dexamethasone/Melatonin/Coenzyme Q10)-loaded MSs) were suspended in 2 mL of release medium (phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) with sodium azide (0.02%)) in duplicate and placed in a water shaker bath under constant agitation (100 rpm) at 37°C (Memmert Shaking Bath, Memmert, Schwabach, Germany). At specified timepoints (1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28 and 30 days) samples were centrifuged (5,000 rpm for 5 min, 20°C) and the supernatants removed and replaced by the same volume of fresh media. After filtration (0.22µm), drug concentrations in the release media were measured by LC/MS, according to the aforementioned method.

Due to the poor aqueous solubility of CoQ10, the release profile of this drug was determined as the difference between initial encapsulation efficiency and the concentration remaining incorporated within the MSs at each sampling time. Here, 22 samples of CoQ10-loaded MSs and DMQ-loaded MSs (4mg) were suspended in 2 mL of release medium and kept under a constant agitation at 37°C. At the specified time points MSs suspensions were centrifuged (8,500 rpm; 3 min; 20 °C) and the supernatants removed, and particles freeze-dried.

Subsequently, the amount of CoQ10 was quantified according to the aforementioned encapsulation efficiency method.

2.3.6. DSC Analysis

Thermal analysis of starting materials, empty and drug loaded MSs were carried out by means of a Mettler differential scanning calorimeter (DSC820, Toledo Mettler Laboratory & Weighing Tech., Greifensee, Suiza) equipped with a TAC 7/DX instrument controller. A STAR^e SW9.10 system software was used for the data acquisition. A heating rate of 10 °C/min in heating-cooling-heating cycle (25-100°C/100-25°C/25-280°C temperature ranges) was employed and an empty aluminium pan (Mettler) was used as a reference standard. Analysis were performed on 5 mg samples under nitrogen purge.

2.4. Cell culture

R28 cell line (Kerafast, Boston, MA) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 5% heat-inactivated foetal bovine serum (Invitrogen, UK), 100 U/ml penicillin, 100µg/ml of streptomycin and 0.292 mg/mL glutamine (Gibco, UK), 7.5% sterile dH₂O and 1.5 mM KCl (Sigma-Aldrich, UK). Cells were maintained under standard conditions: 37°C, 5% CO₂, 100% humidity, medium was changed completely every other day and cultures were passaged at 90% confluence.

2.4.1. Cell viability assessment

R28 cells were seeded at 4,000 cells/well in 96-well plates for 24 h before treatment with varying concentrations of the three active substances (DX, MEL, CoQ10), individually or in the form of a multiloaded MSs formulation and appropriate vehicle controls for a second 24h period. During this second 24h period, cells were additionally exposed to varying concentrations of the cytotoxic insult Glutamate (Sigma-Aldrich, UK). After this time, cell viability in the presence/absence of each therapy and insult was assessed by Alamarblue (Invitrogen, UK) assay according to manufacturer's instructions. Briefly, the Alamarblue solution (10% v/v) was added to each well and incubated for 4 h at

37 °C. A Safire plate reader (excitation of 530 nm and emission of 590 nm) was used for the fluorescence measurement and determination of percentage cell viability as previously described (Davis et al. 2017). All experiments were completed in triplicate.

2.5. *Animals*

Adult male Dark Agouti (150-200g, Harlan Laboratories, UK) rats were housed in a temperature (21°C) and humidity-controlled environment with a 12 h light-dark cycle (140–260 lux). Water and food were available *ad libitum*. All procedures described were performed in agreement with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and under protocols approved by the U.K. Home Office.

2.5.1. *Ocular hypertension model*

IOP elevation was performed in the left eyes of twenty-five Dark Agouti rats by episcleral injection of hypersaline solution as previously described (Morrison's ocular hypertension model)(Morrison et al. 1997). On the day of glaucoma induction, IOP measurements were performed in both eyes with a TonoLab tonometer (Tiolat Oy, Helsinki, Finland). Subsequently, the animals received general anesthesia using a mixture of 37.5% Ketamine (Pfizer Animal Health, Exton, PA), 25% Dormitol (Pfizer Animal Health, Exton, PA) and 37.5% sterile water, at 2 mL/kg administered intraperitoneally. To elevate the IOP, a syringe pump (50µL/min; UMP2; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) was used to inject 50 µL of hypertonic saline solution (1.85 M) into the two episcleral veins. A propylene ring with a 1 mm gap cut from the circumference was placed around the equator to prevent injected saline outflow from other aqueous veins. Once a week, the IOP from both eyes of each rat was measured at regular intervals using a TonoLab tonometer (Tiolat Oy, Helsinki, Finland) under inhalational anaesthesia (0.4% isoflurane in oxygen) until 21 days post unilateral IOP elevation. For each animal, cumulative IOP exposure, defined as the integral of IOP elevation over time (mm Hg/day), was calculated from the area under the curve, as previously described(Davis, Guo, et al. 2016).

2.5.2. Microspheres administration

Animals were randomized into 5 treatment groups (n = 5 each): non-loaded PLGA MSs (Empty-MSs, 5.825% w/v), multiloading MSs (DMQ-loaded MSs, 2.5% w/v), the physical mixture of each single drug loaded MSs (DX-loaded MSs, MEL-loaded MSs and CoQ10-loaded MSs, MSsmix, 5.825% w/v), OHT-untreated and naïve controls (Table 1).

Table 1. Suspensions of administered MSs

	DMQ-loaded MSs	Physical Mixture of MSs			Empty-MSs
		DX-MSs	MEL-MSs	CoQ10-MSs	
AMOUNT OF MSs (mg)	0.1	0.071	0.082	0.08	0.233
		0.233			
DOSES (µg drug)	DX / MEL /CoQ10 11.5 / 4.6 / 3.6	DX 11.5	MEL 4.6	CoQ10 3.6	-
VOL. INJECTED (µL)	4	4			4
MSs suspension (w/v) %	2.5	5.825			5.825

The amount of MSs loaded with each single drug injected in the physical mixture was calculated in order to administer the same dose of the active substances (DX, MEL and CoQ10) included in the multiloading formulation. Similarly, the amount of MSs in the Empty-MSs was equivalent to the highest dose of MSs injected.

Homogeneous suspensions of MSs were prepared in PBS and briefly vortexed immediately prior to each injection. Intravitreal injections of microspheres were administered under general anaesthesia and aseptic conditions before IOP elevation surgery in left eyes of 15 rats, with no treatment given to 5 OHT-only and 5 bilaterally naïve animals.

A 30-gauge hypodermic needle was used to perforate the sclera 1.5 mm behind the limbus. Four microliters of sample were then injected into the vitreous using a 5 µL Hamilton Syringe (Hamilton Co, Reno, NV). To prevent backflow of MSs,

the needle was left in place for a short while and withdrawn slowly. Animals were euthanized 23 days post-surgery.

2.5.3 *Brn3a immunohistochemistry and confocal microscopy*

After animals were sacrificed, enucleated eyes were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C overnight before dissecting retinal whole mounts. Brn3a+ RGCs were labelled as previously described (Davis, Guo, et al. 2016). Briefly, RGCs were labelled using an anti-mouse mAb (1:750; Merk Milipore, Darmstadt, Germany) and as secondary detection donkey anti-mouse IgG(HbL)-Alexa 647 (1:200; Merk Milipore, Darmstadt, Germany). Subsequently, retinas were examined under confocal microscopy (LSM 710; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany). Whole-mounts were imaged as a tiled z-stack at ×10 magnification, which was used to generate a single plane maximum projection of the RGC layer in each retina for subsequent analysis. Each whole-mount image was manually orientated so that the superior retina was towards the top of the image using *in vivo* cSLO imaging of retinal vasculature as a reference. Retina image acquisition settings were kept constant for all retinas imaged, allowing comparison of Brn3a expression in each experimental group as previously described (Nadal-Nicolas et al. 2012). Automated quantification of Brn3a labelled RGCs in retinal whole mounts was completed as described previously (Davis, Guo, et al. 2016).

2.6. *Statistical analysis*

All data were represented as mean ± standard deviation (SD) or mean ± standard error (SE). Linear regression analysis was completed using R version 3.3.1. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Microspheres characterization

SEM investigation confirmed the presence of spherical particles with comparable and regular size distributions. Surface morphological differences were observed between formulations. Non-loaded MSs, MEL-loaded MSs and DX-loaded MSs had a smooth appearance with only small imperfections visible in the case of loaded MSs. In contrast, CoQ10-loaded MSs exhibited a number of small pores with a rough surface. The microspheres formulation prepared with the three active compounds (DMQ-loaded MSs) showed similar porous and rough surfaces (Fig.2).

TEM images of the fractured microspheres revealed a non-interconnected pore architecture inside the internal polymeric matrix. Compared to non-loaded MSs, the formulations loaded with actives substances presented big hollows in the inner structure. Thus, DX-loaded MSs inner structure showed solid particles consistent with dexamethasone crystals. MEL-loaded MSs presented a homogeneous porous composition whereas CoQ10-loaded MSs showed irregularly distributed large pores. The internal appearance of DMQ-loaded MSs revealed a combination of all three aspects (Fig.2).

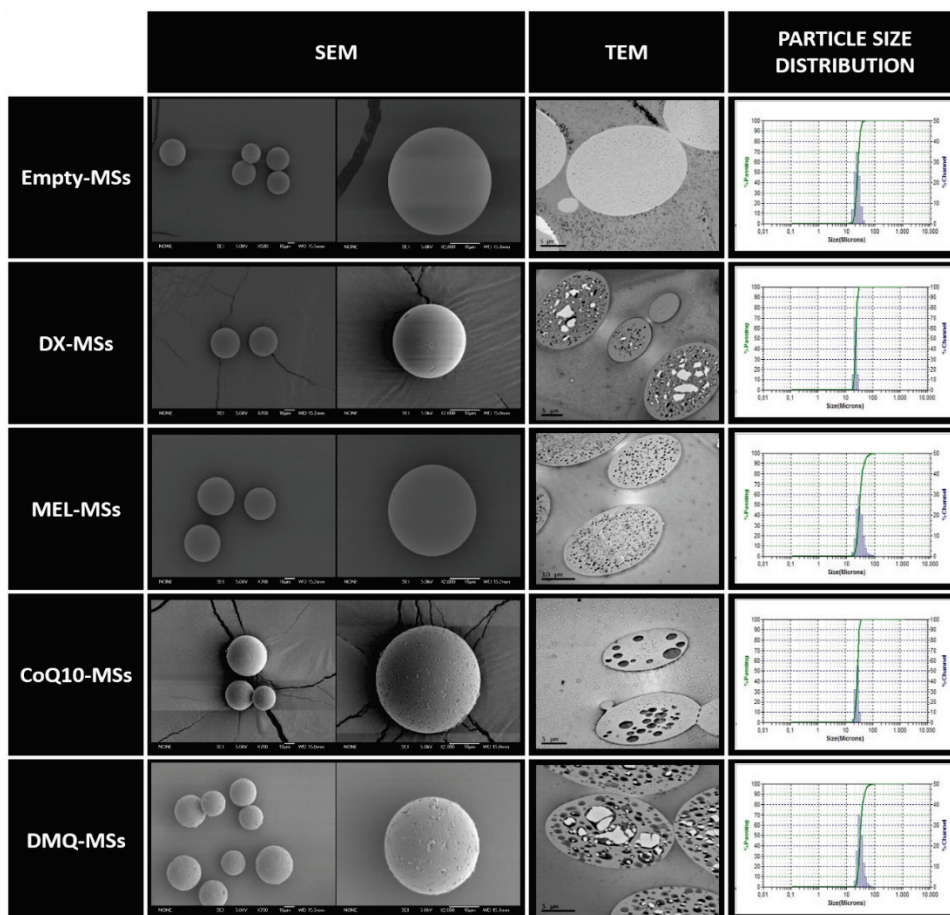


Figure 2. Morphological evaluation (Scanning electron microscopy and Transmission electron microscopy) and particle size distribution.

The MSs microencapsulation technique led to a high production yield (> 72% in all cases) with mean particle for the multiloaded and single loading formulations ranging from 24 to 29 μm as outlined in Table 2.

3.1.1 Encapsulation efficiency

Table 2 summarizes the encapsulation efficiency data for each formulation. DX encapsulation efficiency in the multiloaded MSs ($78.20 \pm 0.42\%$) was reduced compared to the single one drug formulation ($97.49 \pm 1.53\%$) suggesting some competition for drug loading sites. In contrast, MEL and CoQ10 encapsulation

efficiencies remained the same values in both formulations (~62% and ~96% respectively).

Table 2. Production yield mean particle size and encapsulation efficiency data for each formulation. Data are shown as mean \pm SD.

FORMULATION	PRODUCTION YIELD (%)	MEAN SIZE (μm)	ENCAPSULATION EFFICIENCY					
			$\mu\text{g DX/mg MSs}$	$\mu\text{g MEL/mg MSs}$	$\mu\text{g Q10/mg MSs}$	EE DX (%)	EE MEL (%)	EE CoQ10 (%)
Empty-MSs	85.97 \pm 3.46	24.72 \pm 0.79	-	-	-	-	-	-
DX-MSs	86.62 \pm 3.85	24.50 \pm 1.76	162.49 \pm 2.55	-	-	97.49 \pm 1.53	-	-
MEL-MSs	86.41 \pm 1.55	27.46 \pm 0.66	-	56.52 \pm 1.34	-	-	62.17 \pm 1.47	-
CoQ10-MSs	75.15 \pm 3.23	29.97 \pm 1.81	-	-	45.56 \pm 1.85	-	-	95.66 \pm 3.87
DMQ-MSs	72.99 \pm 0.60	29.04 \pm 1.89	115.86 \pm 0.62	45.80 \pm 1.86	35.71 \pm 1.53	78.20 \pm 0.42	61.83 \pm 2.51	96.42 \pm 4.12

3.1.2. Release studies

Currently, the drug delivery research is focused on developing systems enable to maintain drug concentrations above the minimum effective level and below the maximum safe concentration for an extended period of time (Park 2014; Jain 2014). Thus, the ultimate goal of the development of IODDS for the treatment of retinal diseases and other intraocular pathologies is to obtain long-acting injectable drug formulations with specific control of the release rate and a sustained effect into the target tissue (Herrero-Vanrell et al. 2014; V. Andrés-Guerrero 2017). In the present work, the three active agents were released *in vitro* from the developed formulations in a controlled fashion up to the end of the assay (30 days).

Figure 3 presents the release profile of each single loaded formulation (3A-C) and the release profile of each drug in the DMQ loaded MSs (3D). In the single loaded particles, the amount of dexamethasone *in vitro* released from DX-loaded MSs during the first 24 h (burst) represented 1.83 ± 0.06 % (2.97 ± 0.05 $\mu\text{g DX/mg MSs}$) of the encapsulated drug. After this low initial delivery, a sustained delivery was observed, with a release rate of 0.26 ± 0.02 $\mu\text{g DX/mg MSs/day}$ from day 1 to day 24, increasing to 1.64 ± 0.30 $\mu\text{g DX/mg MSs/day}$ from day 24 to day the end of the study (day 30) (Fig 3A). The amount of MEL released from MEL-loaded MSs within 24 hours (burst) represented 22.53 ± 0.74 % ($12.73 \pm$

0.12 μg MEL/mg MSs) of the encapsulated drug. After this initial burst, a relatively rapid drug delivery occurred during the first 10 days ($4.30 \pm 3.96 \mu\text{g}$ MEL/mg MSs/day). Subsequently, the MEL release rate resulted lower ($0.13 \pm 0.15 \mu\text{g}$ MEL/mg MSs/day) from day 10 to day 30 (Fig 3B). Finally, CoQ10-loaded MSs showed a sustained release of the CoQ10 at a rate of $0.35 \mu\text{g}/\text{mg}$ MSs/day during the 30-day study. No burst effect was observed (Fig. 3C).

Release profile of the multiloading-MSs formulation (DMQ-loaded MSs) exhibited an initial burst of DX of $3.78 \pm 0.71\%$ (DX $4.38 \pm 0.80 \mu\text{g}$ DX/mg MSs), followed by a release rate of $0.60 \pm 0.04 \mu\text{g}$ DX/mg MSs/day until day 24 and $1.20 \pm 0.15 \mu\text{g}$ DX/mg MSs/day from day 24 to day 30. Regarding MEL release, after a burst effect of $28.27 \pm 3.59\%$ ($12.91 \pm 1.12 \mu\text{g}$ MEL/mg MSs), a biphasic release occurred with a rate of $1.66 \pm 0.31 \mu\text{g}$ MEL/mg MSs/day for the first 14 days and $0.69 \pm 0.18 \mu\text{g}$ MEL/mg MSs/day until day 30. Finally, DMQ-loaded MSs presented a controlled release of the CoQ10 at a rate of $0.63 \mu\text{g}$ Coenzyme Q10/mg MSs/day during the study (Fig. 3D).

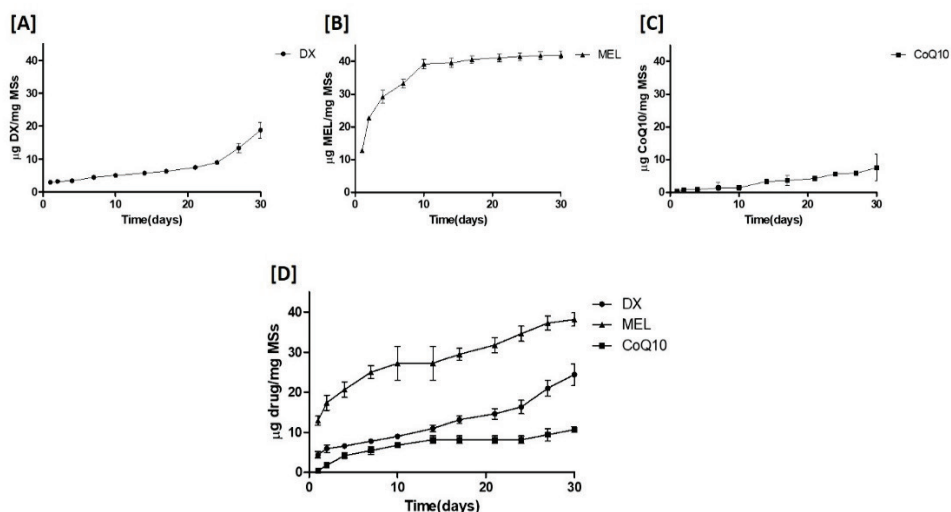


Figure 3. Cumulative *in vitro* release ($\mu\text{g}/\text{mgMSs}$) of DX from DX-loaded MSs [A], MEL from MEL-loaded MSs [B], CoQ10 from CoQ10-loaded MSs [C] and DX, MEL, CoQ10 from DMQ-loaded MSs [D] over one month. Release media: PBS (pH7.4) and 0.02% Na azide.

3.1.3. DSC measurements

DSC scans, which provide qualitative information about the physical status of the drugs in each system, are provided in Figure 4. The thermograms of pure active substances (DX, MEL and CoQ10) displayed sharp endothermic transitions at 244, 118 and 55 °C respectively, corresponding to their melting points (Fig. 4A). These peaks are also detected in the physical mixture (drugs plus PLGA) (Fig. 4B) whereas they decreased or disappeared in the loaded MSs containing the same fractions of drugs as the physical mixture indicating successful encapsulation (Fig. 4C and 4D).

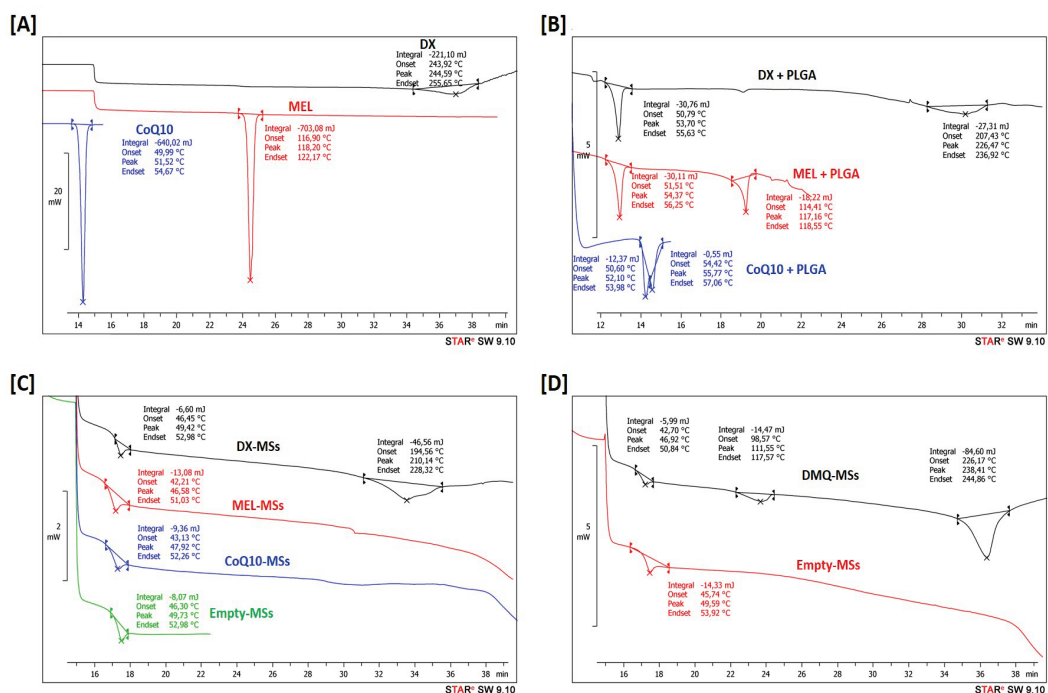


Figure 4. [A] DSC curves of DX, MEL, CoQ10. [B] DSC curves of physical mixture of DX+PLGA, MEL+PLGA, CoQ10+PLGA. [C] DSC curves of DX-MSs, MEL-MSs, CoQ10-MSs and Empty-MSs. [D] DSC curves of DMQ-MSs and Empty-MSs.

3.2. *DX/MEL/CoQ10-loaded MSs are neuroprotective in vitro against established model of excitotoxicity-mediated neurotoxicity in R28 retinal cultures.*

An *in vitro* model of glutamate-mediated neurotoxicity in R28 cells was used to evaluate the neuroprotective activity of varying concentrations of the three active substances (DX (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M), MEL (250 μ M, 500 μ M, 750 μ M), CoQ10 (1 μ M, 10 μ M, 25 μ M)) and vehicle controls. Data were fit in dose-response curves to determine the IC₅₀ values. Figure 5 illustrates that while the treatment of cells with DX did not elicit a significant neuroprotective effect in this cytotoxic model (Fig. 5A), MEL (500 μ M and 750 μ M) was neuroprotective compared to control (one-way ANOVA with Tukey posthoc test, $p = 0.0012$) (Fig. 5B). Also, CoQ10 (10 μ M and 25 μ M) promoted a significant reduction in cell death induced by glutamate (one-way ANOVA with Tukey posthoc test, $p = 0.0012$) (Fig. 5C).

20 mg/mL of DMQ-loaded MSs (burst initial: 108.5 μ M DX, 555.9 μ M MEL and 4 μ M CoQ10), but not non-loaded MSs, provided protection against the excitotoxic agent insult (glutamate) in R28 cell cultures. Treatment of R28 with the multiloading MSs significantly reduced the susceptibility of these cells to glutamate-induced cytotoxicity (one-way ANOVA with Tukey posthoc test, $p = 0.0061$) (Fig. 5D and 5E).

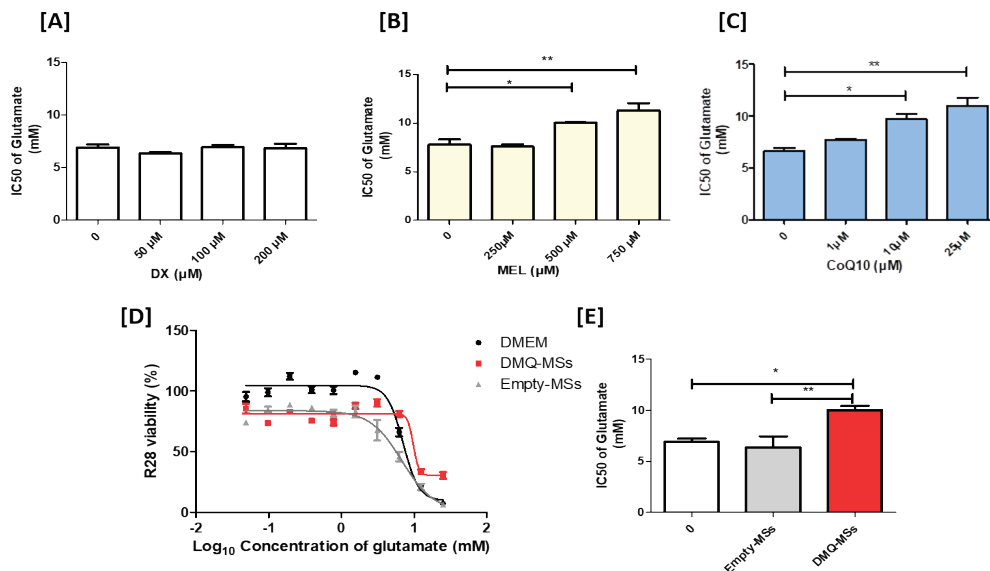


Figure 5. [A-C] MEL (500 μM and 750 μM) and CoQ10 (10 μM and 25 μM) but not DX resulted neuroprotective compared to control against glutamate-mediated neurotoxicity (one-way ANOVA with Tukey posthoc test, $p = 0.0012$ and $p = 0.0012$ respectively). [D,E] Neuroprotective effect of DMQ-loaded MSs against cytotoxic insult in R28 cell cultures. Treatment with DMQ-loaded MSs (20 mg MSs/mL) but not equivalent concentrations of non-loaded MSs only significantly (one-way ANOVA, $p = 0.0061$) reduced the susceptibility of these cells to glutamate-induced cytotoxicity.

3.3. Multiloaded MSs formulation inhibits RGC degeneration in the Morrison's model of ocular hypertension.

A well-established rodent model of experimental glaucoma was used to determine whether intravitreal injection of the multiloaded (DMQ) MSs had neuroprotective efficacy *in vivo*. Peak IOP was recorded one day after OHT induction and IOP elevation was maintained for at least 7 days after induction in all groups (Table 3 & Fig.6F). No significant change in IOP was observed in contralateral eyes. Intravitreal administration of the different treatments (empty-MSs, DMQ-MSs and physical mixture of MSs) had no effect on IOP profiles compared to OHT only eyes, suggesting that treatments did not affect IOP and that any neuroprotective effects observed were IOP independent.

Table 3. Mean IOP measurements and integral IOP (\pm SD) for each treatment group in this study.

Time post OHT induction (days)	OHT only	OHT (Co-eye)	OHT+Empty-MSs	OHT+Empty-MSs (co-eye)	OHT+DMQ-MSs	OHT+DMQ-MSs (co-eye)	OHT+Mixture of MSs	OHT+Mixture of MSs (co-eye)
0	10.03 (0.40)	10.02 (0.13)	10.18 (0.16)	10.34 (0.22)	10.40 (0.61)	10.30 (0.32)	10.30 (0.34)	10.00 (0.47)
1	25.46 (3.11)	10.95 (1.29)	22.70 (1.43)	10.10 (0.41)	25.70 (5.82)	10.25 (0.65)	24.56 (3.57)	10.66 (0.72)
7	19.94 (3.44)	10.48 (0.95)	20.32 (2.73)	10.28 (0.60)	20.30 (3.64)	10.43 (1.06)	18.02 (0.84)	10.22 (0.63)
14	14.20 (3.07)	11.78 (1.14)	14.88 (1.29)	10.78 (0.53)	14.60 (2.56)	10.85 (1.00)	15.92 (3.06)	11.44 (0.63)
21	12.34 (1.36)	10.80 (0.79)	13.01 (2.19)	10.56 (0.70)	12.45 (0.10)	10.95 (1.40)	15.62 (3.37)	11.24 (1.17)
Integral IOP (mmHg/day)	366.34 (23.65)	225.56 (16.36)	366.34 (32.24)	219.8 (5.25)	372.9 (45.06)	223.1 (16.17)	374.36 (24.82)	228.18 (4.60)

RGC loss due to increase of IOP was determined histologically by whole-retinal flat mounts immunolabeled with anti-Brn3a antibody (as example: Fig. 6Ai Naïve whole retina illustration). Figures from 6Aii to 6E show the RGC distribution from sections of Naive [Aii], OHT only [B], Empty MSs[C], Mixture MSs [D] and DMQ-MSs [E] from equivalent distances from the ONH in the retinal whole-mounts. Quantification of whole RGC populations was completed using an automated script as previously described (Davis, Guo, et al. 2016). Linear regression analysis (R version 3.3.1, eq. 2) was used to evaluate the efficacy of different treatments in the rodent OHT model with RGC density (cells/mm²) as the dependent variable (y) and treatment group as the independent variables (β_1) with categories OHT only (intercept, β_0), Naïve retina, Drug loaded MSs, empty MSs and mixtures comprising three single-drug loaded MSs. The results of the regression analysis indicated the treatment group predictors explained 58.4% of the variance in RGC density ($R^2 = .50$, $F(4,19)=6.677$, $p=0.01565$). Compared to OHT only group ($\beta_0 = 1253 \pm 76$ cells/mm², $p < 0.001$) It was found that application of drug loaded MSs significantly preserved RGC density ($\beta_{t1} = 287 \pm 108$ cells/mm², $*p = 0.0155$), to a comparable extent as the naïve retina control group ($\beta_{t2} = 280 \pm 98$ cells/mm², $*p = 0.0104$). Administration of drug empty MSs ($\beta_{t3} = 4 \pm 102$ cells/mm², $p = 0.97$) or combinations of single-drug loaded MSs ($\beta_{t4} = -101 \pm 102$ cells/mm², $p = 0.34$) with a residual standard error (ϵ) of 152 cells/mm² with 19 DF. Administration of drug empty MSs ($\beta_{t3} = 4 \pm 102$ cells/mm², $p = 0.97$) or combinations of single-drug loaded MSs ($\beta_{t4} = -101 \pm 102$

cells/mm², $p = 0.34$) had no significant preserving effect on RGC population with a residual standard error (ϵ) of 152 cells/mm² with 19 DF (Figure 5G).

$$y = \beta_0 + \beta_\tau x + \epsilon \quad [\text{eq. 2}]$$

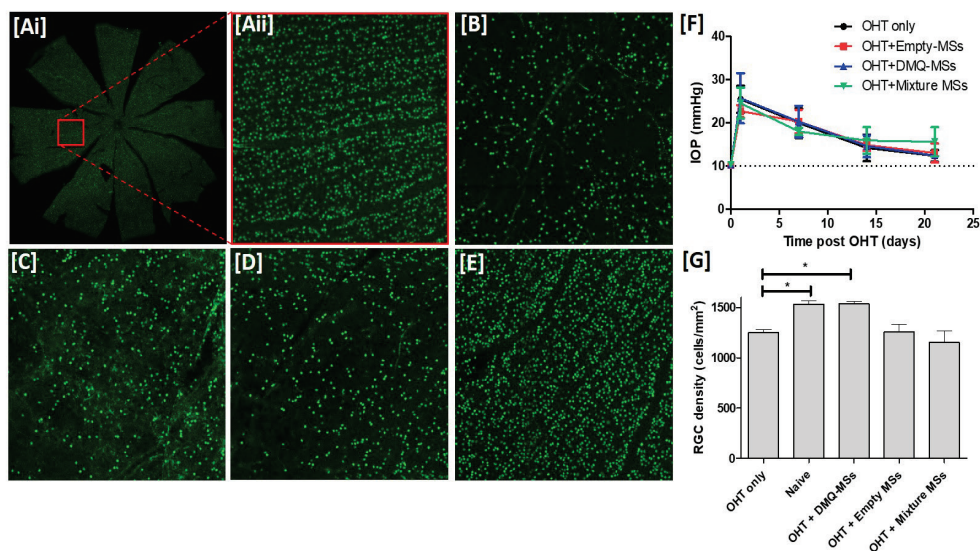


Figure 6. Intravitreal DMQ-MSs treatment but not MSs Mixtures preserved RGC density in a well-established rodent model of Ocular Hypertension. Each red box is $\sim 1 \text{ mm}^2$: [Ai] Naïve whole retina illustration [Aii] Illustration of RGC distribution from sections of Naive, [B] OHT only, [C] Empty MSs [D] Mixture MSs [E] DMQ-MSs treated retinal whole-mounts taken from equivalent distances from the ONH. [F] Treatment of eyes with intravitreal administration of Empty-MSs, DMQ-MSs or the mixture of MSs did not significantly alter the IOP profiles compared on OHT induction (two-way repeated measures ANOVA with Bonferroni post-test versus OHT model, $p > 0.05$) suggesting any neuroprotective activity of treatments was a result of IOP independent effects. Results are mean \pm SD. [G] Whole retinal RGC density measurements indicate that while OHT induction ($\beta_0 = 1253 \pm 76$ cells/mm², $p < 0.001$), empty MSs ($\beta_3 = 4 \pm 102$ cells/mm², $p = 0.97$) or combinations of single-drug loaded MSs ($\beta_4 = -101 \pm 102$ cells/mm², $p = 0.34$) caused a significant reduction in RGC density, RGC loss was preserved by an intravitreal administration of DMQ-MSs ($\beta_1 = 287 \pm 108$ cells/mm², $*p = 0.0155$), to a comparable extent as the naïve retina control group ($\beta_2 = 280 \pm 98$ cells/mm², $*p = 0.0104$).

4. Discussion

Glaucoma is a worldwide leading cause of irreversible vision loss (Weinreb, Aung, and Medeiros 2014). Although the exact mechanism of glaucoma pathology is debatable, (Davis, Crawley, et al. 2016) a hallmark of this disease is RGC degeneration that leads to vision deficit or loss (Nickells et al. 2012). Thus, there is an imperative need to develop RGC-targeted therapies that can be conveniently delivered via intraocular injection and enable a long-term sustained drug release (Zhao, Chen, et al. 2017). As the RGC degeneration occurs by different pathways, the present work suggests for the first time a beneficial role of a combination of three different neuroprotectants with anti-inflammatory and antioxidant activity (DX, MEL, and CoQ10) formulated as a multi-loaded microparticulate PLGA system (DMQ-MSs) in reducing RGC loss in an experimental glaucomatous model. This multi-IODDS resulted more effective than the administration of a mixture of MSs loaded with the three drugs separately (MSsmix). As far as we are aware, this is the first co-delivery study for incorporating three neuroprotective agents into a single carrier system for the posterior segment of the eye.

High production efficiency yields (> 72%) and drug loading efficiencies (> 61%) were achieved in each case. DX encapsulation efficiency slightly decreased (~20%) in the multiloaded MSs compared to the single one drug formulation suggesting some competition for drug loading sites. The competition might be solved by the addition of co-solvents like ethanol into the inner polymeric solution. This technological strategy has been already reported by other authors (Jeyanthi 1997; Park 1998; Yeo and Park 2004). However, since DMQ-MSs formulation contains three different drugs, this technology-based improvement would require optimization procedures.

Multi-loaded and single loaded MSs exhibited a homogeneous particle size (20 – 38 μm), with spherical morphology and were found to be suitable for its injection as a suspension through needles typically used for intravitreal administration (25G-32G) (Herrero-Vanrell and Refojo 2001; Andres-Guerrero et al. 2015). Scanning electron microscopy images of CoQ10 loaded MSs and multi loaded-MSs revealed the presence of pores on the particles' rough surfaces. This fact has been previously explained as consequence of the rapid removal of organic

solvent during elaboration procedure and to the encapsulation process characteristic of this poor soluble drug (Al Haushey et al. 2007; Nepal, Han, and Choi 2010). According to the images observed by transmission electron microscopy, the inner structure of the multi loaded-MSs correspond to a combination of the different entrapped drugs. Thus, a mixture of DX solid forms and small and large pores like those observed in fractured MSs of MEL and CoQ10 can be observed in the multi-loaded formulation (DMQ-MSs). The appearance of inner pores larger than the ones on the surface lies on the different solidification rates occurring during the processes of microsphere's formation and maturation (Paik and Choi 2014).

The inner structure is determined by the solidification rate of the polymer during the microparticle preparation process. A high polymer concentration, as the one used in the present work, involves a faster polymeric precipitation resulting in a matrix dense and a relatively porous inside. The nature of the entrapped drugs is also a critical factor since release is longer with decreasing water solubility of the drug (Yeo and Park 2004). Therefore, the morphology of the microparticles, as well as the low solubility of the active compounds (DX, MEL, CoQ10), contributed to high encapsulation efficiencies and a prolonged release profile.

Additional characterization of MSs formulations was achieved using DSC. As expected, characteristic transitions of free drugs were present when these agents were assessed as physical mixtures with PLGA. DMQ-MSs thermogram, however, lost or reduced these characteristic peaks, providing evidence of their association with MSs polymeric matrix. This is further supported by the observation of a slight decrease in PLGA transition temperature in all formulations, probably due to the plasticiser effect of the small active molecules present and also to the micrometric size and high surface area of the particles (Farboud, Nasrollahi, and Tabbakhi 2011). Furthermore, the presence of the endothermic peak of DX in DX-MSs formulation could be attributed to the presence of DX crystals embedded in the MSs matrix, an expected result in accordance with the TEM images of these fractured microspheres. In addition, the disappearance of the CoQ10 endotherm in the thermogram of MSs containing CoQ10 regarding to the physical mixture, suggests the dissolution of CoQ10 in the polymeric organic solution during the production procedure (Farboud, Nasrollahi, and Tabbakhi 2011). Finally, contrary to the physical mixture (MEL plus PLGA), no free drug peaks were identified in the thermograms

of MEL-MSs. This thermotropic variation would suggest that MEL was dispersed at molecular level inside the polymeric cavities, which might be attributed to the amphiphilic properties of the melatonin (Musumeci et al. 2013; Subuddhi 2014) and could explain the TEM pictures observed. DSC thermograms from DMQ-MSs revealed the presence of the melting peaks of DX and MEL, which might suggest the presence of part of these drugs in its solid form in the multi-loaded MSs formulation.

Multi-loaded microspheres provided simultaneous controlled co-delivery of the three therapeutic agents. The release rate of CoQ10 and DX from DMQ-MSs resulted in two (0.63 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MSs/day) and around three-fold (0.60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MSs/day) higher respectively compared to single loaded particles. These findings could be explained by the lower polymer/mg MSs ratio in the multi-loaded particles. In contrast, the delivery of MEL resulted in significantly slower release rates (1.66 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MSs/day) than single loaded microspheres. A possible explanation for this is that the presence of very poorly soluble substances (such as CoQ10) can modulate the release of other more soluble compounds from a combined formulation (Checa-Casalengua 2011). Furthermore, the presence of MEL crystals in DMQ-MSs suggested by DSC studies may explain the release rate reduction; future studies will seek to confirm these hypotheses.

The neuroprotective activity of DMQ-MSs formulations were assessed using an *in vitro* glutamate-mediated neurotoxicity model in an immortalised neuronal cell line (R28). Results suggest that CoQ10 and MEL treatments were significantly protective against this insult. Glutamate mediated neurotoxicity in the retina is considered as one of the factors contributing to glaucoma pathogenesis (Davis, Crawley, et al. 2016; Guo et al. 2006; Gross et al. 1999; Luo et al. 2001). Neuronal vulnerability to glutamate has been attributed to mitochondrial membrane depolarization triggering a profound drop of intracellular ATP level and ROS generation (Sandhu et al. 2003; Vishnoi, Raisuddin, and Parvez 2016). CoQ10 may help to maintain mitochondrial membrane potential and so inhibit the opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) which may lead to apoptosis induction (Papucci et al. 2003). Furthermore, it has been suggested that CoQ10 may also contribute to the reduction in expression of the glutamate binding receptor (N-methyl-D-aspartate receptor) subunits (NR1 and NR2A) in a mouse model of glaucoma (Lee, Shim, et al. 2014). We postulate that these protective activities of CoQ10 work in conjunction with its well

documented antioxidant activity (Hernandez-Camacho et al. 2018) to protect R28 cells against glutamate-induced cell death.

The ability of MEL to inhibit glutamate neurotoxicity has been previously attributed to the reduction of oxidative stress via multiple processes (Reiter et al. 2003). MEL has been reported to act both as a direct free radical scavenger (Reiter et al. 2000), and as an indirect antioxidant through the stimulation of antioxidant enzymes such as Superoxide dismutase (Antolin et al. 1997). MEL also promotes the synthesis of glutathione, an essential intracellular antioxidant (Urata et al. 1999), and it is able to increase the efficiency of the mitochondrial electron transport chain (ETC) thereby lowering electron leakage and reducing free radical generation (Mayo et al. 2017; Reiter et al. 2017). This study provides additional evidence to suggest that MEL is protective against glutamate-induced neurotoxicity and these findings are in agreement with those obtained by other groups (Patino et al. 2016; Lee, Shim, et al. 2014).

The *in vitro* experiments demonstrated no benefit of dexamethasone treatment in preserving cell function *in vitro*. However, the *in vitro* system does not model the full *in vivo* environment with multiple cell types at different levels. Our *in vitro* model consisted only of R28 cells and no microglia or astrocytes. We were therefore not expecting a neuroprotective effect with little expectation even for an immunomodulatory effect either, but wanted to be sure there was no toxicity. In any case inflammation events occurring within the *in vivo* environment of retinal degenerative diseases as we described in the introduction.

The DMQ-MSs formulation was assessed *in vivo* using a well-established rodent model of ocular hypertension (OHT) (Sanchez-Lopez et al. 2018; Dibas et al. 2008; Liu et al. 2014). Intravitreal administration of 0.1 mg DMQ-MSs was compared to a physical mixture of single drug loaded MSs (0.23 mg) containing the same amount of active drug substances, empty MSs, an OHT only (untreated) group and naïve controls (No OHT or treatment). Three weeks after OHT induction, RGCs survival was quantified histologically from retinal whole mounts using Brn3a+ labelling as previously described (Davis, Guo, et al. 2016). Intravitreal administration of DMQ-MSs was found to significantly promote RGCs survival compared to administration of empty MSs. Although the amount of drug release is low, particularly in the case of Coq10, the simultaneous delivery of the three drugs resulted in a significant neuroprotective activity. The efficacy of low

amounts released from PLGA microsystems loaded with neuroprotective agents has been already reported (Checa-Casalengua 2011; Ward et al. 2007; Jiang et al. 2007; Andrieu-Soler et al. 2005).

Interestingly, administration of a mixture of MSs loaded with the three drugs separately (MSsmix) was found to be mildly neurotoxic. This may be related to the MSsmix formulations requiring a higher concentration of MSs particles than DMQ-MSs (0.23 mg vs 0.1 mg respectively), which may contribute to retinal toxicity. In support of this hypothesis, we previously reported that intravitreal injection of 0.5 mg of PLGA but not 0.1 mg PLGA induced retinal stress and neuronal cell dysfunctions in rats (Zhao, Rodriguez-Villagra, et al. 2017).

In the present work, a multi-therapy approach comprising DX, MEL and CoQ10 was chosen in order to target multiple pathways of neuronal degeneration simultaneously.

Corticosteroids has been suggested to induce neuroprotection by indirectly modulating microglia activity (Drew and Chavis 2000). Furthermore, corticosteroid anti-inflammatory and immunosuppressive effects are thought to modulate the production of neurotoxic substances by microglial and the rate of phagocytosis of apoptotic neurons. (Vardimon et al. 1999) The neuroprotective effects of melatonin and coenzyme Q10 in the retina are based on their well-documented antioxidant activity and mitochondrial protection, which could prevent development and progression of neurodegeneration (Wongprayoon and Govitrapong 2017; Hargreaves 2014).

MEL has demonstrated to protect retinal ganglion cells against apoptosis in a *in vivo* rodent model of nitric oxide induced retinal injury (Siu et al. 2004) and after acute injury intraorbital optic nerve transection or hypoxia (Kilic et al. 2002; Kaur et al. 2013). Interestingly, the protective effect of MEL is not only confined to neurons, as it may also elicit neuroprotection by acting on retinal glia, which is increasingly recognised to play an important role in the pathogenic cellular processes of glaucoma (Tezel 2011). Recently, we have also found that controlled delivery of MEL after a single intravitreal injection of MSs in combination with a neurotrophic factor (glial cell-line-derived neurotrophic factor, GDNF) promoted a rescue of the photoreceptors in rho (-/-) mice (García-Caballero C. 2018).

The neuroprotective effect of CoQ10 in RGCs has previously been suggested through the prevention of glutamate-induced apoptosis or inhibition of mitochondrial depolarization after topical administration in an IOP-induced transient ischemia rat model or in a UV-induced rat model of retinal damage respectively (Nucci et al. 2007; Papucci et al. 2003). In fact, topical instillation of this mitochondrial-targeted antioxidant was found to promote RGC neuroprotection in the same rodent model of ocular hypertension employed in the current study (Davis et al. 2017). The mechanism of neuroprotection was attributed to the decrease of glutamate excitotoxicity and oxidative stress that preserve mtDNA content and Tfam/OXPHOS complex IV protein expression in the retina (Lee, Shim, et al. 2014). Similarly to MEL, the neuroprotective activity of CoQ10 has also been attributed to mitochondrial mediated modulation of retinal glial activation (Jing et al. 2015; Bhardwaj and Kumar 2016).

Although several fixed combination therapies of antihypertensive drugs are currently in clinical practice, an equivalent neuroprotective combination therapy has not yet been clinically translated (Hollo et al. 2014; Hollo, Topouzis, and Fechtner 2014; Guven Yilmaz et al. 2018). In summary, this paper presents a novel neuroprotective combination therapy combining an anti-inflammatory drug (DX) with two antioxidants (MEL and CoQ10). These drugs were delivered from a PLGA polymeric microcarrier (DMQ-MSs) which resulted in significant neuroprotection in a rodent model of RGC loss (ocular hypertension). Furthermore, the amount of polymer resulted lower than the one necessary for the physical mixture of microspheres resulting in a good tolerance of the formulation. Although the neuroprotective efficacy of other drug delivery systems has previously been reported (Aihara et al. 2017; Rodriguez Villanueva et al. 2016; Martins, Khalil, and Mainardes 2017; Kumar et al. 2016), to the authors' knowledge, this is the first study to present an effective intraocular drug delivery system (IODDS) loaded with three drug cargo for the treatment of retinal degeneration.

5. Conclusion

This study presents a novel, effective and well-tolerated intraocular drug delivery system (IODDS) comprising PLGA polymeric microparticles for the co-delivery

of three neuroprotective substances. This novel multi-therapy strategy allowed the co-incorporation of different drugs into a single microcarrier reduces the amount of biomaterial (PLGA) required for intraocular administration compared to equivalent dosing of single drug loaded formulations, so reducing the risk of PLGA associated retinal stress. Moreover, this IODDS provided the simultaneous release of the three active agents in a controlled fashion. *In vivo* efficacy studies revealed that the multi loaded IODDS could not only protected the RGCs from death, but also resulted in a higher efficacy than the physical mixture of MSs. These findings indicate that combination therapy using multi-loaded MSs may be a promising neuroprotective strategy for the treatment of multifactorial retinal diseases such as glaucoma.

Acknowledgements

This work was supported by Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MAT2013-43127-R and MAT2017-83858-C2-1-R), ISCIII-FEDER “Una manera de hacer Europa” RETICS: RD16/0008, and UCM Research Group 920415. First author AAR thanks MINECO for the fellowship granted (BES-2014-070041) and for the mobility grant (EEBB-17-12525). We thank Professor Jorge Rubio Retama for generous technical advice with DSC technique. Authors are grateful to the technical SEM and TEM assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI, UCM).

CAPÍTULO III – CHAPTER III

Co-delivery of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) from PLGA microspheres. Potential combination therapy of retinal diseases

**CO-DELIVERY OF GLIAL CELL-DERIVED NEUROTROPHIC
FACTOR (GDNF) AND TAUROURSODEOXYCHOLIC ACID (TUDCA)
FROM PLGA MICROSPHERES. POTENTIAL COMBINATION
THERAPY OF RETINAL DISEASES**

Alicia Arranz-Romera, Laura Fernández-Sánchez, Sergio Esteban-Pérez, Irene T. Molina-Martínez, Irene Bravo-Osuna, Nicolás Cuenca, Rocio Herrero-Vanrell*

ABSTRACT

Advances in the understanding of the pathophysiologic pathways that lead to retinal cells death in retinitis pigmentosa (RP) have been essential to develop new therapeutic approaches. - Combination therapy based on the simultaneous administration of several active substances is an emerging strategy for the treatment of this type of neurodegenerative disorders. The need of maintaining effective concentration in the retinal target site makes the Multi-loaded intraocular drug delivery systems (IODDS) based of biodegradable microspheres promising tools for such purpose. In the present study, we sought to develop different formulations of MSs incorporating two neuroprotectants (gila cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)). A solid-in-oil-in-water emulsion solvent extraction-evaporation technique was employed to MSs elaborations. 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 studied. Several formulation parameters that are known to influence these properties were evaluated. Thus, the incorporation of a water-soluble co-solvent (ethanol) into the inner organic phase was studied. Other technological strategies such as salt addition (NaCl) and the use of viscosity enhancer ((hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)) in the external aqueous phase were also evaluated. Two of the studied variables (EtOH and Viscosity) resulted critical for co-incorporating both active agents in the microcarrier affecting their entrapment efficiencies and release profiles. In such a way, when using methylene chloride: EtOH (75:25) into the inner organic phase and the viscosity enhancer (HPMC (1% w/v)) in the external aqueous phase, high GDNF/TUDCA payloads ($48.86 \pm 1.49\%$ and $78.58 \pm 10.40\%$ respectively) and *in vitro* sustained releases were obtained. Optimized microparticles exhibited a sustained co-delivery of both neuroprotectants *in vitro* over 91 days of study (release rates: 47.58 ± 3.09 pg GDNF/mg MSs and 0.35 ± 0.15 μ g TUDCA/mg MSs). This work suggests that this multi-loaded PLGA MSs may be a promising neuroprotective strategy for the management of multifactorial retinal diseases such as RP.

Keywords: Combination therapy, PLGA Microspheres, co-delivery, Intraocular drug delivery system (IODDS), Retinitis pigmentosa

1. INTRODUCTION

Retinitis pigmentosa (RP) is a group of genetically diverse inherited disorders characterized by night blindness and progressive visual field constriction, subsequently leading to central vision impairment. In all forms of RP, the genetic mutation is expressed exclusively in rods; however, cones die too (Narayan et al. 2016). More than 25% of RP cases in humans are caused by inherited autosomal dominant (ad) mutations in *rhodopsin-encoding gene* (RHO) (Mitra et al. 2018; Gray et al. 2018). Within this tremendous genetic heterogeneity, the P23H mutation in this gene is the most prevalent cause of RP leading to misfolding and aggregation of the rhodopsin protein in the endoplasmic reticulum of rod photoreceptors (Gragg and Park 2018; Fernandez-Sanchez et al. 2018). In recent years, another spontaneous mutant has been isolated (rd10) (Chang et al. 2002), which carries a mutation of the rod-phosphodiesterase (PDE) gene, leading to a rod degeneration that starts around P18. Later, cones are also lost (Gargini et al. 2007). Regardless of the mutations, the final common pathway is programmed photoreceptor cell death or apoptosis (Reme et al. 1998; Wong 1994; Portera-Cailliau et al. 1994), even though non-apoptotic mechanisms may also be involved (Sancho-Pelluz et al. 2008; Fernandez-Sanchez et al. 2015). Due to this complex and non-specific etiopathogenesis, no effective therapy has been found yet for RP. Nevertheless, several active substances have demonstrated to be useful for the treatment of retinal degeneration processes. Among them, therapeutic agents targeting photoreceptor death (Portt et al. 2011) and pro-survival molecules (Marsh and Blurton-Jones 2017) are two of the most enthralling compounds.

Among the active substances avoiding photoreceptor death, Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), an amphiphilic bile acid, has evidenced excellent anti-apoptotic, anti-inflammatory, antioxidant and cytoprotective properties against cell degeneration in retinal disease models (Cuenca, Fernandez-Sanchez, Campello, et al. 2014; Lawson et al. 2016; Xia et al. 2015). The efficacy of TUDCA has been described in rodent models of photoreceptor degeneration, including light-induced retinal damage (Boatright et al. 2006), retinitis pigmentosa (Phillips et al. 2008; Oveson et al. 2011; Fernandez-Sanchez et al. 2011) experimental retinal detachment (Mantopoulos et al. 2011) and Leber congenital amaurosis (Zhang, Baehr, and Fu 2012). TUDCA has also proven

useful as an antiapoptotic and a cytoprotective agent in animal models of other neurodegenerative disorders, such as Parkinson's (Rosa et al. 2017), Alzheimer's (Dionisio et al. 2015) and Huntington's diseases (Keene et al. 2002).

The use of potential molecules such as neurotrophic factors has successfully been investigated as promoters of retinal cells differentiation and survival (Kimura et al. 2016). Thus, several neurotrophins such as glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Baranov et al. 2017), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Zhang et al. 2009), nerve growth factor (NGF) (Sacchetti et al. 2017) or ciliary neurotrophic factor (CNTF) (Kassen et al. 2009) have been identified as potential treatment options for posterior segment eye diseases. GDNF has gain considerable attention as it is widely expressed in central and peripheral neurons (Bohn, Kozłowski, and Connor 2000). This neurotrophin has shown to be an effective survival factor for different neurodegenerative pathologies including Parkinson's disease, Alzheimer's disease and degenerative ocular diseases (Walton 1999; Campos et al. 2016; Sullivan and O'Keeffe 2016; Budni et al. 2015). GDNF results of high interest in the eye as it has been demonstrated its potential for rescuing retinal photoreceptors and ganglion cells functions during retinal degeneration even at low concentrations (Klocker et al. 1997; Frasson et al. 1999; Jiang et al. 2007).

Successful drug therapy for retinal diseases requires effective concentrations of the active substances maintained during long term in the intraocular target site (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). In this context, the intraocular drug delivery systems (IODDS) are emerging therapeutic tools capable of releasing the loaded molecules overtime avoiding repeated intravitreal injections (Wassmer et al. 2013). Among the IODDS, biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres (MSs) offer an excellent alternative for such purpose (Herrero-Vanrell et al. 2014). These controlled-release drug microsystems can be administered as suspensions through conventional needles without surgery minimizing non-desired effects (Bravo-Osuna et al. 2016). Likewise, MSs are good candidates to be used in personalized therapy as different amounts of particles can be administered depending on patients needed (Bravo-Osuna et al. 2018).

In recent years, IODDS loaded with neuroprotective substances for the treatment of retinal diseases has been widely studied. For example, a recently published study showed that a three-month treatment with monthly intravitreal administration of TUDCA-loaded PLGA MSs was able to slow vision loss and retinal remodelling in a rat model of retinitis pigmentosa (Homozygous P23H line 3 rats) (Fernandez-Sanchez et al. 2017). Likewise, a single intravitreal injection of a formulation based on PLGA MSs loaded with GDNF/Vitamin E significantly ($p < 0.01$) increased retinal ganglion cells survival in an experimental animal model of glaucoma compared to GDNF, Vitamin E or blank microspheres after 11 weeks of the MSs administration (Checa-Casalengua 2011).

Moreover, microparticulate systems are able to co-encapsulate and co-deliver several drugs resulting in simultaneous treatment of multiple targets. Due to the multifactorial ethiology of neurodegenerative diseases, combination therapy with multi-loaded MSs may be a crucial therapeutic approach. Thus, the aim of the present study was to develop a combination therapy based on microsystems co-incorporating two neuroprotective agents (GDNF and TUDCA) into a single carrier system designed for the treatment of RP. To obtain a formulation able to release the dual payload in a more controllable manner, different technological strategies that contribute to drug loading, release profiles and stability were investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Recombinant Human GDNF and the ELISA (enzyme-linked immunoabsorbant assay) kit for GDNF quantification were supplied by R&D Systems (Minneapolis, MN USA). Poly(D,L-lactic-co-glycolid) acid 50:50 (Resomer® 503, 24,000 – 38,000 g/mol) was purchased from Evonik Industries (Essen, Germany). TUDCA was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Polyvinyl alcohol 72,000 g/mol (PVA) was supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) was provided by Abaran Materias Primas S.L., α -tocopherol acetate (VitE), bovine serum albumin (BSA) were purchased from

Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). The other chemicals were reagent grade and use as received. All organic solvents were HPLC grade and used as received.

2.2. Elaboration of Microspheres

PLGA microspheres (MSs) were elaborated by S/O/W emulsion solvent extraction-evaporation technique which involves the incorporation of the protein in its solid state as a suspension in an oil additive (Vitamin E). Prior to the multi-loaded MSs elaboration, an initial formulation of single-loaded MSs of GDNF was prepared according to a previously published method (Checa-Casalengua et al. 2012). Subsequently, in order to optimize the co-encapsulation process with TUDCA, several technological strategies were employed from the initial formulation. Combined formulations of GDNF and TUDCA based on microspheres were developed as follows. Briefly, 20 µg of GDNF was suspended in 20 µL of Vit E by gentle sonication at low temperature (Sonicator XL, Head System, Inc., Farmingdale, NY, USA) for 30 s. This suspension was added to a solution of 200 mg of PLGA in 1 mL of a mixture of methylene chloride and ethanol in different proportions (100:0, 80:20; 75:25 or 70:30) containing 10 mg of TUDCA. Then, this organic phase was emulsified at 5000 rpm (1 min) with 5 mL of PVA MiliQ® water solution (2%w/v) with or without the inclusion of several agents (HPMC 1%, NaCl 5%) in a homogenizer (Polytron® PT 10-35, Kinematica GmbH, Lucerna, Switzerland). The resulting emulsion was subsequently poured into 100 mL PVA (0.1% w/v) and continuously stirred for 3 h at room temperature to allow organic solvent evaporation. Once formed, microspheres were washed with MiliQ® water to eliminate the PVA and sieved according to their particle size (>53 µm, 53-38µm, 38-20µm and 20-1µm). The solid microspheres were frozen and freeze-dried. The lyophilized microspheres were stored at -20°C under dry conditions until use. Empty MSs in the absence of drug cargo (PLGA-MSs) and MSs with the oil additive (VitE-20µL) were prepared using the same protocol. Three batches were prepared per type of formulation.

The different experimental conditions evaluated in the optimization of co-microencapsulation process are compiled in table 1 and 2.

Table 1. Experimental conditions of inner phase evaluated to select the more optimal MSs formulation. MC: Methylene Chloride, EtOH: Ethanol.

Formulation	Composition (µg/µL/mg)	Organic phase solvent (1mL)	External aqueous phase (5 mL)
0	GDNF/VitE/TUDCA(0/0/0)	MC	2%PVA
00	GDNF/VitE/TUDCA(0/20/0)	MC	2%PVA
1	GDNF/VitE/TUDCA(20/20/0)	MC	2%PVA
2	GDNF/VitE/TUDCA(20/20/10)	MC	2%PVA
3	GDNF/VitE/TUDCA(20/20/10)	MC:EtOH (80:20)	2%PVA
4	GDNF/VitE/TUDCA(20/20/10)	MC:EtOH (75:25)	2%PVA
5	GDNF/VitE/TUDCA(20/20/10)	MC:EtOH (70:30)	2%PVA

Table 2. Experimental conditions of external phase evaluated in the optimization of the previously selected MSs formulation. PVA: Poly(vinyl alcohol), HPMC: hydroxypropyl methylcellulose, NaCl: Sodium Chloride.

Formulation	Composition (µg/µL/mg)	Organic phase solvent (1mL)	External aqueous phase (5 mL)
Selected formulation for further optimization:			
4	GDNF/VitE/TUDCA(20/20/10)	MC:EtOH (75:25)	2%PVA
6	GDNF/VitE/TUDCA(20/20/10)	MC:EtOH (75:25)	1%PVA 1%HPMC
7	GDNF/VitE/TUDCA(20/20/10)	MC:EtOH (75:25)	1%PVA 1%HPMC 5% NaCl

2.3. Microspheres characterization

Microparticles were characterized in terms of production yield, particle size, morphological studies, encapsulation efficiencies and *in vitro* release studies.

2.3.1. 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:

$$\text{PY \%} = \frac{\text{Weight of MSs (W}_1\text{)}}{\text{Total weight of active substances and polymer (W}_2\text{)}} \times 100$$

2.3.2. Mean particle size and particle size distribution

Mean particle size and particle size distribution were determined by light scattering (Microtrac S3500, York, PA, USA). Samples were prepared by suspending the microspheres in MiliQ® water. Each formulation was run in triplicate.

2.3.3. Morphological studies

The morphological examination of the microspheres was performed using a scanning electron microscopy (SEM, Jeol, JSM-6335F, Tokyo, Japan). Samples were placed on a graphite surface and were gold sputter-coated prior to analysis.

The internal morphology of MSs was evaluated by transmission electron microscopy (TEM, Jeol, JEM-1010, MA, USA). A Leica Cryostat CM 1900 was used to create cross-section of microspheres (50-70 nm thickness slides) at -20 °C in a synthetic resin medium (Spurr Low Viscosity Embedding Kit).

To allow for deeper examination of the internal MSs matrix as well as to assess the influence of drug/protein ratio on the structural integrity of the polymeric matrix, one batch of similar compositions of formulations 1 (BSA/VitE/TUDCA(20/20/0)-MC), 2 (BSA/VitE/TUDCA(20/20/10) -MC) and 4 (BSA/VitE/TUDCA(20/20/10) - MC:EtOH (75:25)) were prepared according to the previously described methods by mixing the organic phase with 20µL of Nile red (4 mg/mL). Bovine serum albumin (BSA) was used as protein model. The microspheres obtained were observed by Confocal Fluorescence Microscopy (Leica, Nikon Eclipse TE300, MRC-1024 BioRad). Similarly, blank MSs were prepared for comparison studies.

2.3.4. Encapsulation efficiencies (EE%)

The determination of GDNF entrapment efficiency was achieved by liquid/liquid extraction. Thus 5 mg of microspheres were placed in 0.7 mL methylene chloride. Upon dissolution of the PLGA, 0.7 mL of the diluent reactive provided in the ELISA Kit (PBS 7.4 and 1%BSA) was added. After vortex mixing, the samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes and the aqueous phase was removed. The extraction procedure was carried out four times to collect all the encapsulated protein. Assays were performed in duplicate. GDNF concentration in the aqueous medium was determined by ELISA immunoassay.

Encapsulated TUDCA content in the MSs was assessed as follows. Briefly, 1mg of loaded-MSs was placed in methylene chloride (2.5mL). After dissolution of the PLGA, TUDCA was extracted with 6 mL of methanol, which also promoted polymer precipitation. After vortex mixing, the samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes and the supernatant was recovered and filtered (0.22µm). High-Performance Liquid Chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) was employed for TUDCA quantification according to the previously published method (Fernandez-Sanchez et al. 2017).

For each active substance (GDNF and TUDCA) encapsulation efficiency was calculated as follows:

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

2.3.5. In vitro release Study

To evaluate the GDNF release from the microspheres, replicates of 5 mg of MSs were suspended in 1.5 mL of phosphate buffer saline (pH 7.4) with BSA 1% (w/v) and sodium azide 0.02% (w/v) in low-binding eppendorf® vials. Samples were immersed in a water shaker bath with a constant agitation of 100 rpm at 37°C (Memmert Shaking Bath WNB 7-45). At pre-set times (24h and once a week until day 91) the microsphere suspensions were gently centrifuged (5000 rpm, 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.

TUDCA release was determined from 5 mg of GDNF/TUDCA-loaded MSs dispersed in 1.5 mL phosphate buffered saline (pH 7.4 isotonic with NaCl azide) and kept under a constant agitation speed of 100 rpm at 37°C (Clifton Shaking Bath NE5, Nikel Electro Ltd, Avon, UK). At 24h, 1 week and once a week until the end of the assay (91 days). The supernatants were recovered and filtrated (0.22 μ m) and the concentration of the released TUDCA from the microspheres was quantified by HPLC/MS as previously mentioned. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD), unless noted otherwise.

3. RESULTS

3.1. Microspheres characterization

Production yields and mean particle sizes for formulations prepared are stated in Table 3. The microencapsulation methods utilized in this work led to high production yields range between 70 – 90% in all cases. A unimodal distribution of particle size with a large population in the 20 - 30 μm range was obtained for all MSs.

Table 3. Production yield (%) and mean particle size (μm) of the microspheres' formulations.

Formulation	Production yield (%)	Mean particle size (μm)
0	85.97 \pm 3.46	24.72 \pm 0.79
00	88.21 \pm 1.61	25.5 \pm 0.6
1	82.40 \pm 0.21	24.80 \pm 0.28
2	85.45 \pm 2.21	24.49 \pm 0.25
3	81.34 \pm 2.38	28.38 \pm 0.68
4	85.55 \pm 3.77	28.82 \pm 1.61
5	71.04 \pm 1.57	29.23 \pm 0.58
6	81.31 \pm 3.89	29.28 \pm 2.06
7	77.37 \pm 4.21	30.88 \pm 0.17

3.2. Morphological studies

Fig.1 shows the external morphology and the internal structure of the different polymeric microparticles obtained. Scanning Electron Microscopy (SEM) pictures revealed MSs with spherical shapes and regular size distributions in all cases (Fig.1, SEM images). Some external morphological differences were observed between formulations. Non-loaded PLGA MSs (Fig.1, SEM images, formulation 0) presented a smooth appearance with absence of irregularities on their surfaces. In contrast, VitE-MSs (formulation 00), as well as GDNF/VitE-MSs (formulation 1) and co-delivery formulations (formulations 2-7) exhibited several pores located on the surface. According to the images, a slightly rough surface was shown in the formulations prepared with the presence of ethanol (EtOH) in the inner organic phase (Fig.1, SEM images, formulation 3-7).

The cross-sectional images of Transmission Electron Microscopy (Fig.1, right column) showed the inner morphology of the different MSs. According to the TEM images, the use of methylene chloride as organic solvent of the inner phase (Fig.1, TEM images, formulations 0 - 2) resulted in dense polymeric matrices. On the other hand, the addition of a water-miscible co-solvent (ethanol, EtOH) to the organic solution contributed to creating moderately dense matrices with slightly bigger hollows in the inner structure (Fig.1, TEM images, formulations 3 - 7). Moreover, the presence of Vitamin E also promoted a high number of small hollows compared to blank PLGA-MSs prepared without the oil additive (Fig.1, TEM images, formulation 0).

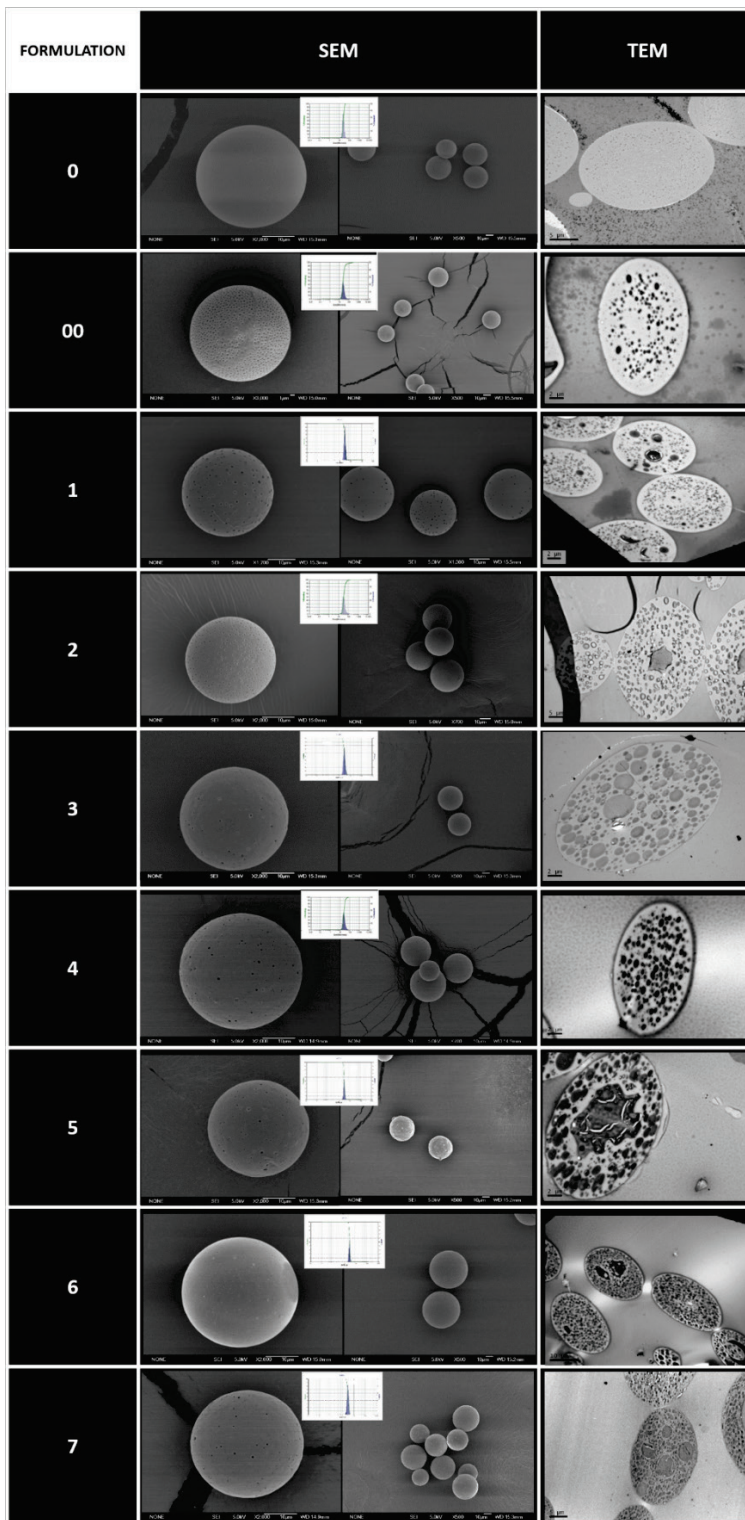


Fig.1. Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy pictures. From the top to the bottom: formulation 0 – formulation 7. Particle size distributions have been also included.

To further analysis the inner structure differences because of ethanol and TUDCA, batches of the same composition of formulation 1, 2 and 4 were prepared including Nile red in the polymeric matrices replacing GDNF by BSA. Nile red is known to show high PLGA affinity, so it can be assumed that the absence of dye might be related with the inner porous structure observed by TEM. As model protein, bovine serum albumin was encapsulated in the same conditions described for GDNF. Confocal microscopy axial pictures showed a homogeneous distribution of pores (the dye disappears) in the inner polymeric matrices in both cases similarly to Fig.1. Bigger hollows were found in MSs prepared with the mixture of methylene chloride:ethanol and TUDCA (Fig. 2).

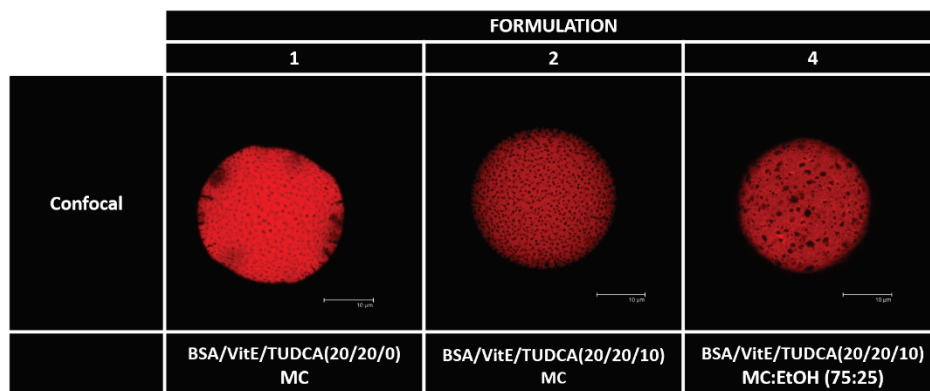


Fig.2. Confocal microscopy images of Nile red labelled PLGA microspheres. From left to right: Microspheres of formulation 1, 2 and 4. The absence of dye might be related with an inner porous structure.

3.3. Encapsulation efficiencies (EE%)

Table 4 and 5 summarize the GDNF and TUDCA loading data of the elaborated MSs.

Table 4. Entrapment efficiency of GDNF in the MSs formulations.

Formulation	ng GDNF/mg MSs	Entrapment efficiency GDNF (%)
1	19.19±2.9	21.01±3.18
2	24.91±0.32	28.53±0.36
3	30.88±3.34	35.36±3.82
4	49.27±1.83	56.42±2.10
5	32.30±9.54	36.98±10.93
6	42.67±1.30	48.86±1.49
7	46.26±0.48	52.98±0.55

Table 5. Entrapment efficiency of TUDCA in the MSs formulations

Formulation	µg TUDCA/mg MSs	Entrapment efficiency TUDCA (%)
1	-	-
2	19.93±3.50	45.65±8.01
3	29.44±2.94	67.42±6.73
4	31.66±3.28	72.50±7.50
5	30.64±4.16	70.17±9.52
6	34.31±4.54	78.58±10.40
7	27.83±2.40	63.74±5.49

TUDCA is a water-soluble bile acid soluble in polar organic solvents such as ethanol. Thus, to enhance the TUDCA incorporation into the MSs, a mixture of methylene chloride (MC) and ethanol (EtOH) was employed during the microencapsulation procedure. Three different ratios of MC:EtOH were studied: 80:20, 75:25, and 70:30 (formulation 3, 4 and 5 respectively). As shown in tables 4 and 5 the inclusion of EtOH in the inner phase of the emulsion provided higher GDNF and TUDCA encapsulation efficiencies. It can be seen that the mixture of MC:EtOH in a 75:25 proportion (formulation 4) rendered the highest encapsulations of both active molecules (GDNF/TUDCA), being selected for further studies as the optimal solvents mixture.

Subsequently, formulation 6 was elaborated to analyze the effect of the viscosity of the external phase regarding drug loadings into the MSs. To such purpose, a viscosity enhancer, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), was employed. MSs were prepared using a physical mixture of Poly(vinyl alcohol) (PVA) (w/v 1%) and HPMC (w/v 1%) aqueous solution as external aqueous phase. Here, this technological strategy led to an increase in TUDCA encapsulation efficiency (from 72.50±7.50% to 78.58±10.40%). However, the encapsulated protein was found to be decreased within the microparticles (from 56.42±2.10% to 48.86±1.49%).

Finally, the technological variable based on the combination of viscosity and high osmotic pressure of the external aqueous phase was studied. The addition of NaCl was aimed at avoiding the protein migration from the internal to the external aqueous phase assumed in the previous formulation. However, when 5% (w/v) of NaCl was included in the previously explain external phase (formulation 7) no significant changes in encapsulation efficiencies were detected. This composition did not lead to optimal results, since the protein payload (52.98±0.55%) was maintained but with an important decrease in TUDCA encapsulation efficiency (63.74±5.49%).

3.4. *In vitro* burst release

The reduced *burst effect* of the neurotrophic factor (GDNF) from the different MSs was the criterion for selecting the optimal formulation to assess in long-term *in vitro* release studies. Table 6 summarizes the *burst release* of GDNF from the microparticles developed by the diverse microencapsulation procedures.

Table 6. Release of GDNF during the first 24 hours (*burst release*) of the MSs formulations

Formulation	ng GDNF/mg MSs	Entrapped GDNF released (%)
1	11.65±0.89	60.67±4.66
2	10.18±1.66	40.86±6.66
3	10.10±1.34	32.70±4.33
4	18.03±0.76	36.59±3.98
5	12.13±2.25	37.56±6.98
6	9.40±1.61	22.03±1.41
7	9.92±1.24	21.45±2.67

The amount of GDNF released from the initially selected multi-loaded MSs (formulation 4) was ~36% within the first 24h. According to the data obtained, the *burst releases* of formulation 6 and 7 were reduced to around 22% without no differences in the *burst* values between them.

When the release of TUDCA during the first 24 h was quantified, the amount of TUDCA delivered was less than 6% in all cases (Table 7). Contrary to GDNF the addition of HPMC (1% w/v) and NaCl (5% w/v) produced a slight increase in the *initial burst* regarding formulation 4.

Table 7. Release of TUDCA during the first 24 hours of the MSs formulations

Formulation	$\mu\text{g TUDCA/mg MSs}$	TUDCA released (%)
1	-	-
2	0.95±0.09	4.87±1.32
3	1.61±0.31	5.47±1.05
4	1.09±0.18	3.43±0.37
5	0.88±0.01	2.72±0.04
6	1.49±0.72	4.49±2.66
7	1.24±0.26	4.45±0.93

While no differences in GDNF *burst* values were observed between formulation 6 and 7, TUDCA entrapment efficiency was higher in formulation 6. Thus, formulation 6 presented the lowest *burst effect* of GDNF and the highest TUDCA loading being selected for long-term *in vitro* release studies.

3.4.1. Long-term *in vitro* release study

Long-term *in vitro* release assay was carried out with the optimized formulation, which corresponds to formulation 6 (MSs prepared with a water-soluble co-solvent into the inner organic phase and a viscosity enhancer in the external aqueous phase). For further comparison, long-term *in vitro* releases profile was also investigated for formulation 4 (MSs elaborated with the same proportion of polar co-solvent into the inner organic phase). Results obtained are plotted in Fig. 3 and 4.

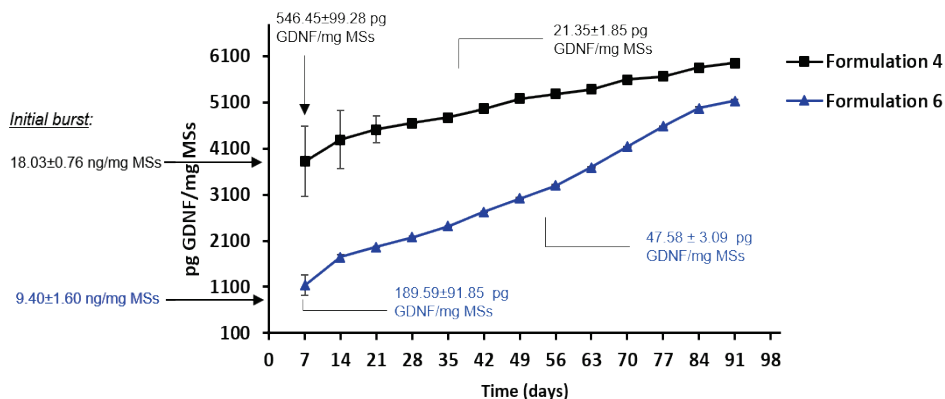


Figure 3. Release profiles of GDNF of the selected microspheres

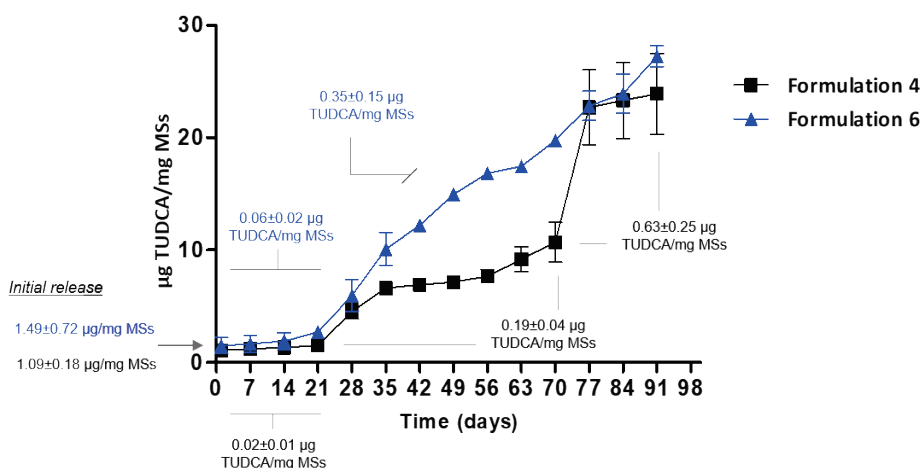


Figure 4. Release profiles of TUDCA of the selected microspheres

As previously mentioned, optimized MSs (formulation 6) showed an initial *burst* of GDNF corresponding to $22.03 \pm 1.41\%$ (9.40 ± 1.60 ng GDNF/mg MSs). After a relatively fast release within the first seven days (189.59 ± 91.85 pg GDNF/mg MSs/day), a more sustained release occurred at a rate of 47.58 ± 3.09 pg GDNF/mg MSs/day until the end of the study (day 91). The amount of TUDCA released within the first 24 h was $4.49 \pm 2.66\%$ (1.49 ± 0.72 µg TUDCA/mg MSs) followed by a low release until day 21 (0.06 ± 0.02 µg TUDCA/mg MSs/day). Subsequently, a sustained release of TUDCA was observed at a rate of 0.35 ± 0.15 µg TUDCA/mg MSs/day until day 91.

Regarding formulation 4, the GDNF release profile exhibited an initial *burst* of $36.59 \pm 3.98\%$ (18.03 ± 0.76 ng GDNF/mg MSs) in the first 24 h. After this initial release, a rapid drug delivery occurred during the first 7 days (546.45 ± 99.28 pg GDNF/mg MSs/day) followed by a sustained release of GDNF at a release rate of 21.35 ± 1.85 pg GDNF/mg MSs/day until the end of the study (day 91). Regarding TUDCA release profile, $3.43 \pm 0.37\%$ (1.09 ± 0.18 µg TUDCA/mg MSs/day) of this active agent incorporated in the MSs was delivered during the first 24h. After that, a triphasic release occurred with a release rate of 0.02 ± 0.01 µg TUDCA/mg MSs/day from day 7 to day 21 increasing to 0.19 ± 0.04 µg TUDCA/mg MSs/day until day 70 and to 0.63 ± 0.25 µg TUDCA/mg MSs/day from then to day 91.

4. DISCUSSION

We developed several formulations based on intraocular drug delivery systems (IODDS) comprising PLGA polymeric microparticles for the co-delivery of two neuroprotective substances: a protein (GDNF) and a low molecular weight drug (TUDCA). Different elaboration process variables involved in optimizing encapsulation efficiencies, release kinetics and morphologies of these microparticles were evaluated.

This study presents a combinatorial approach for the treatment of retinal diseases such as retinitis pigmentosa (RP). RP is a group of genetically diverse inherited blinding disorders for which there are no treatments. Investigations into the degeneration pathways from mutation to rod cell death have revealed targets for developing new treatment (Zhang 2016). The pathophysiology of RP is characterized by a multifactorial progression, involving a complex interaction of genetic, immunologic, functional, and inflammatory factors, remaining poorly understood (McMurtrey and Tso 2018; Zhang, Cui, et al. 2018; Ten Berge et al. 2018). Moreover, it is becoming clear that these events can interact and compound, suggesting that an effective treatment may require a multi-modal approach. Thus, combination therapy based on co-administering several neuroprotectants could be a crucial therapeutic approach for the synergistic treatment of ocular neurodegenerative diseases. One of the main challenges for

combination neuroprotective treatments lies in the release of the multiple payloads at desired sites in a controlled manner.

The microencapsulation method used in this work has been optimized to allow the preparation of multi-loaded PLGA MSs with good production yields and mean particle sizes range from 38 – 20 μm . Generally, the control of the size is important since this parameter affects degradation rate, drug loading (Jeffery, Davis, and O'Hagan 1993) and initial *burst* release (Ito, Fujimori, and Makino 2007) of microspheres increasing the release time with higher size particles. Chronic posterior segment eye diseases require therapeutic concentrations at the target site for extended period of time. For that reason, relatively large microspheres are preferred. However, it must be considered that the larger the microspheres the greater the diameter of the needed needle. Here, as the designed microspheres were intended for intravitreal injection as an aqueous suspension through small gauge needles (25 (internal diameter of 0.3 mm) - 32G (internal diameter of 0.108 mm)), there is an upper limit of size that must be established (Bravo-Osuna et al. 2018). Particles larger than one-third of the internal diameter of the needle should be avoided to prevent surgical procedures (Garcia-Caballero et al. 2017). Here, experimental conditions were designed to obtain particle size values suitable for intravitreal injection using the above conventional needles.

Interestingly, mean particle sizes of co-delivery systems elaborated with a polar co-solvent (EtOH) into the inner organic phase (formulations 3 – 7) were slightly higher (around 28 - 30 μm) compared to the rest of the formulations (around 24 - 25 μm). This could be attributed to the presence of EtOH in the inner organic phase. It has been described that microparticulates formed with a faster solvent extraction resulting in larger particle sizes than those formed by slower precipitation (Yeo, Basaran, and Park 2003).

Regarding the morphological studies, several pores located on the microspheres' surfaces were observed in all formulations except for PLGA-MSs (formulation 0). The presence of pores on the MSs surface was previously explained as consequence of the removal of the organic phase's solvent during elaboration process and also due to the presence of the oily additive (vitamin E) in the formulation (Checa-Casalengua, Jiang, Bravo-Osuna, Tucker, Molina-Martínez, et al. 2011). Vitamin E was included in the formulation because this

oily additive has demonstrated to improve the stability of GDNF during the S/O/W procedure (Checa-Casalengua 2011). According to the SEM images, a slightly rough surface was shown in the formulations prepared in presence of ethanol in the inner phase (Fig.1, SEM images, formulation 3-7). According to several authors, solubilities of polymers in organic solvents determines the solidification rate of the polymers during the microparticle preparation process, which in turn affects microparticle properties such as external morphology, drug incorporation, and matrix porosity (Jeyanthi 1997; Mehta 1996). Hence, the presence of ethanol in the dispersed phase may decrease the polymer solubility in the organic phase lead to a fast solidification of the microparticles and a final rough appearance on the surface.

The cross-sectional images of Transmission Electron Microscopy from Fig.1 (right column) offered the inner morphology of the different formulations. As the surface of microspheres is first solidified due to the evaporation at the interface of the oil and water (Paik and Choi 2014), the solidification rate of the polymer during the microspheres maturation determines the matrix inner porosity. Hence, it has been noted that the inner porosity of the final microparticles depends on dispersed phase diffusion rate toward the continuous phase (Yeo and Park 2004). On the other hand, the addition of a water-miscible co-solvent (ethanol, EtOH) to the organic solution contributed to a matrix moderately dense with bigger hollows in the inner structure. This type of internal morphology results when a fast-polymeric solidification occurs. As PLGA is insoluble in the water-miscible solvent EtOH, it can be concluded that this solvent played a dual function in facilitating the polymer precipitation. First, when a water-miscible co-solvent is involved in the inner phase, a fast mass-transfer between both the dispersed and the continuous phases occurs leading to a quicker polymer precipitation as compared with the use of a non-co-solvent system (Jeyanthi 1997; Bodmeier 1988). Likewise, the increased hydrophilicity of the inner phase reduced the solubility of the polymer and caused fast polymer solidification (Yang, Chung, and Ng 2001).

GDNF entrapment efficiencies (EE) in the co-delivery formulations elaborated with a solvent mixture of MC:EtOH inner phase (formulations 3-7, EE> 35%) were increased compared to the initial single-loaded formulation of GDNF

(formulation 1, 21.01±3.18%) and the co-delivery MSs using only methylene chloride into the inner organic phase (formulation 2, 28.53 ± 0.36%). TUDCA entrapment was found higher than 60 % in all MSs prepared using ethanol into the inner organic phase. Moreover, according to the data, the solvent mixture of MC:EtOH (75:25) employed in the inner phase rendered the highest entrapment values of both active molecules (formulation 4: 56.42±2.10% of GDNF and 72.50±7.50% of TUDCA). As previously mentioned, the diffusion rate of the organic solvent into the external aqueous phase is crucial to the PLGA precipitation, conditioning the drug entrapment in the resulting microparticles. Organic solvents with high water solubility such as EtOH result in rapid hardening of the droplets of polymer solution. Thus, the addition of EtOH to the organic solution may explain the rise in the GDNF entrapments observed.

Viscosity of the continuous phase is often an influential factor in determining drug encapsulation efficiencies (Ogawa 1988). High viscosity is preferable in contributing to create stable emulsions. It is likely that a large viscosity of continuous phase provides a high concentration gradient of the organic solvent across the phase leading to a fast extraction of the solvent and a fast solidification of the microparticles (Coombes et al. 1998). Here, however, this technological strategy did not allow to increase the encapsulation efficiency of the protein (48.86±1.49%) since only TUDCA entrapment was increased (78.58±10.40%). On the other hand, the addition of NaCl to the aqueous phase is claimed to lead to an increase in the osmotic pressure preventing thereby protein diffusion to this external aqueous phase and consequently increasing the protein loading (Dorati 2008; Chen 2002). Nevertheless, when evaluated the role played by a high osmotic pressure in combination with a high viscosity to encapsulate drugs into the microparticles, desired results were not found. While higher entrapment of GDNF (52.98±0.55%) was observed, an important decrease in TUDCA encapsulation efficiency (63.74±5.49%) was gotten. As possible explanation, we point out that data obtained from formulation 6 and 7 may suggest some competition for drug loading sites occurred.

Release pattern of proteins from PLGA microspheres typically exhibits several phases; a significant release of proteins is generally observed in the first 24 hours of testing (*burst effect, burst release or initial burst*). This first step is followed by

a more convenient diffusion-driven controlled release, and an erosion-driven controlled release respectively (Cho 2000). Thus, the large bolus of protein release during the first 24 hours before they can reach the stable release rate may lead to an ineffective formulation from both therapeutic and economic standpoint (Huang and Brazel 2001). For that reason, additional characterization of MSs to determine the optimal formulation was achieved assessing the *initial burst* of the encapsulated protein. It has been reported that the external morphology of the microparticles affects the release profile of an encapsulated active substance, especially in protein-loaded microparticle systems (Martin-Sabroso et al. 2015) due to these active substances tend to fast escape through the pores located at microparticles' surfaces (Yeo and Park 2004). In this sense, one of the goals in development of microencapsulation systems involving protein is to reduce the *initial burst* and achieve a constant release rate thereafter. According the data obtained, the highly porous microparticles of formulation 1 led to a significantly higher *initial burst* compared to the co-delivery systems, since the amount of GDNF released was $60.67 \pm 4.66\%$ within the first 24h. Moreover, as the data show, it was evidence that the *burst release* of GDNF was modified in the dual drug-loaded MSs. Here, the effect of how one drug can influence the release of another from the same microparticle was observed. It is known that the presence of other substances (such as TUDCA) may modulate the release of more hydrophilic compounds from a combined formulation (Checa-Casalengua 2011). Furthermore, *initial burst* of proteins occurs mainly due to their heterogeneous distribution into the polymeric matrices. Proteins embedded in or near the surface of the MSs are responsible for the *initial burst* (Igartua 1997; Dorati 2008). According to our previously published work, confocal microscopic analysis indicates that HSA-FITC employed as labelled-protein model in formulation 1, was located near the surface of the particles (Garcia-Caballero et al. 2017; Checa-Casalengua 2011). On the contrary, it is possible that the co-encapsulation procedure described here, may have led to a more homogeneous distribution of the protein in the polymeric matrix. However, future studies will seek to confirm these hypotheses.

Formulations 6 and 7 presented the lowest initial protein releases. In formulation 6, when the viscosity enhancer (HPMC (1% w/v)) was added to the external aqueous phase, a significant decrease in the initial release of GDNF was

observed (22.03 ± 1.41 %). HPMC is a semisynthetic polymer able to swell upon contact with water and form a hydrated layer which controls the penetration of water (Zeng A 2009; Ma D 2013). It is known that the molecular weight of HPMC is related to the viscosity of their solutions, thus an increased average molecular weight increases the viscosity (Novak 2011). As mentioned above, HPMC (1390 csp) in the external aqueous phase was added to increase the viscosity and retain protein deeper inside the MSs during the microencapsulation process. By increasing the viscosity of the external phase, the interfacial tension between the aqueous and the organic phase drops may be facilitated (Löfroth J.E. 1991). Moreover, by variation of the external aqueous phase surfactant may also increase the viscosity of the droplets of drug-containing polymer solution which are formed during emulsification improving the entrapment of therapeutic proteins (Coombes 1998). This may in turn favor confinement of protein within the core of the microparticles decreasing the *initial burst*. In formulation 7, NaCl (5% w/v) was added to the previous explained external phase composition. In the same way as the previous formulation, a marked reduction in the burst release of GDNF was obtained (21.45 ± 2.67 %). This result could be attributed to an increase not only in the external phase viscosity by the effect of HPMC (1% w/v) but also an increase in the osmotic pressure in this phase by addition of salts, improving the protein internalization into the polymeric matrix and consequently decreasing the protein release rate (Dorati et al. 2005; Martin-Sabroso et al. 2015).

Complementary to this, no significant differences were found when *initial release* of TUDCA was investigated, since *burst effect* was practically negligible in all cases.

The main aim of the development of drug delivery systems for the treatment of posterior segment diseases lies to obtain long-acting injectable drug depot formulations (Kang-Mieler, Osswald, and Mieler 2014). Biodegradable microspheres allow to achieve a sustained effect into the target tissues overtime maintaining drug concentrations above the minimum effective level and below the maximum safe concentration (Bravo-Osuna et al. 2018; Jain 2014). 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 (Ahmed et al. 2012; Mao et al. 2007). The release profile was evaluated from the optimized MSs (formulation 6), which presented the lowest *initial release* of GDNF and the highest encapsulation efficiency of TUDCA. To make an additional comparison, long-term *in vitro* release of MSs elaborated with the same inner phase (formulation 4) were also evaluated. GDNF released from each formulation at the end of the study (91 days) was: $48.66 \pm 0.11\%$ from formulation 4 and $34.06 \pm 0.08\%$ from formulation 6. GDNF from MSs prepared with high viscosity external phase (formulations 6) was released at a markedly constant rate (47.58 ± 3.09 pg GDNF/mg MSs/day) until the end of the study. Thus, the increased internalization of protein within the MSs due to the presence of HPMC (1% w/v) in the external phase during the fabrication process, may result in an increased diffusional pathlength, that in turns lead to an overall more control in the release of the drug.

TUDCA was released faster than GDNF from each formulation ($75.48 \pm 11.34\%$ from formulation 4 and $78.80 \pm 2.68\%$ from formulation 6) at the end of the study (91 days), the release profiles exhibited were markedly different. After the *initial releases* of TUDCA, microparticulates of formulation 4 showed a more erratic release profile with three different release patterns. On the contrary, in formulation 6 after a slow delivery of the drug during the first 21 days, TUDCA was released at a constant rate until the end of the study. A possible explanation to this could be found by analysing the effect of HPMC on TUDCA distribution into the microparticles. The high viscosity of the external phase during the MSs elaboration may lead to a more homogeneous distribution of TUDCA within the polymer matrix. Thus, the release of this drug from this formulation was in a more controlled and constant manner. However, further studies should be made to confirm this hypothesis.

5. CONCLUSIONS

The use of a mixture solvent based on methylene chloride (MC) and ethanol (EtOH) in the inner organic phase facilitated the co-encapsulation of an

amphiphilic substance (TUDCA) and a protein (neuroprotective substance, GDNF).

Also, the use of a viscosity enhancer in the external aqueous phase led to obtain an optimized co-delivery system of a biotechnological product (GDNF) and a low molecular weight compound (TUDCA). These multi-loaded MSs presented appropriate encapsulation efficiencies where both active agents were simultaneously released *in vitro* in a controlled manner over at least 91 days with low *initial bursts*.

The co-delivery strategy described here, presented a high potential for combination therapy of retinal degenerative diseases such as RP.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MAT2013-43127-R and MAT2017-83858-C2-1), ISCIII-FEDER “Una manera de hacer Europa” RETICS: RD16/0008, and UCM Research Group 920415. First author AAR thanks MINECO for the fellowship granted (BES-2014-070041). Authors are grateful to the technical SEM and TEM assistance of the Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru (CAI, UCM)

PRELIMINARY STUDIES

IN VIVO ASSAY

Animals

All procedures were approved by the ethic committee for animal care and use of the University of Alicante (UA-2013-07-22). All animals were housed and handled according to current regulations regarding the use of laboratory animals (NIH, ARVO and European Directive 2010/63/UE), which are intended to limit both animal suffering and the number of animals required for experimentation.

Retinal degeneration¹⁰ (rd10) mice (n=5 (survivors n = 2)) and RhoP23H mice (n = 8), provided by The Jackson Laboratory, were used as animal models of Retinitis Pigmentosa (RP). Retinal degeneration 10 (rd10) mice are a model of autosomal recessive RP, identified by Chang et al. in 2002 (Chang et al. 2002). These mice carry a spontaneous mutation of the rod-phosphodiesterase (PDE) gene *Pde6b*, leading to a rod degeneration. Later, cones are also lost.(Gargini et al. 2007) Mice homozygous for retinal degeneration 10 (rd10) exhibit sclerotic retinal vessels at 4 weeks of age, progressive retinal outer nuclear layer degeneration beginning at 16 days. RhoP23H mice are a model of autosomal dominant RP. These mice carry the P23H mutation of the Rho (rhodopsin) gene, a substitution at codon 23, CCC to CAC, encoding the amino acid substitution of proline to histidine at position 23 (P23H). The phenotype in heterozygous mice mimics progressive retinal degeneration observed in patients with autosomal dominant RP caused by the P23H mutation. By 35 days of age, heterozygotes have a shorter rod outer segment when compared to controls. At post natal day 63, mice have fewer rod nuclei and decreased length of the rod outer segment ('Krzysztof Palczewski, Case Western Reserve University (n.d.). Retrieved from <https://www.jax.org/strain/017628>').

All animals were bred and maintained under controlled humidity (60%), temperature (23°C ± 1°C), and photoperiod (12-hour light/12-hour dark) conditions. Animals were maintained in dim illumination (50 lux) during all the experiments. Diet and water were available *ad libitum*.

Intravitreal injections

All injections were performed under general anaesthesia and aseptic conditions. Animals received a single intravitreal injection of GDNF/TUDCA-MSs in the right eyes, and non-loaded MSs in the left eyes. Intravitreal injection of MSs was performed under general anesthesia as previously described (Checa-Casalengua, Jiang, Bravo-Osuna, Tucker, Molina-Martinez, et al. 2011). To ensure a homogeneous dispersion of MSs in the injection, 5% (w/v) suspensions of the MSs were prepared in BSS and briefly vortexed immediately before each injection. A 30-gauge hypodermic needle was used to perforate the sclera 1.5 mm behind the limbus. Three microliters of suspension were then injected into the vitreous by mean of a 10 µl Hamilton Syringe (Hamilton Co, Reno, NV, USA). To prevent backflow, the needle was held in place for 1 min and withdrawn slowly. Animals with retinal bleeding or lens injury following the injection procedure were excluded from the study. Retinal structure in the mouse model *rd10* was characterized by immunofluorescence confocal microscopy at P30 (n = 2). Retinal function of P23H mice was assessed by electroretinography at P150 (n = 8).

ERG recording

Animals were dark adapted overnight (12±15 h) and prepared for bilateral ERG recording under dim red light. They were anesthetized through intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (4 mg/kg) and maintained at 38°C by a homeothermic heated pad. A drop of tropicamide 1% (Alcon Cusí, Barcelona, Spain) was used to dilate the pupils. Topical application of Viscotears carbomer 0.2% (Novartis, Barcelona) prevented dehydration and allowed electrical contact with the DTL electrodes (Sauquoit Industries; Scranton, PA, USA). A reference electrode, consisted of a 25-gauge platinum needle, was introduced under the scalp between the eyes. All experiments were performed on a Faraday cage in absolute darkness. Light stimuli were generated by a Ganzfeld stimulator and presented for 10 ms at 9 different increasing luminances (-5.2 to 0 log cd_s/m²). For each light presentation, three to ten successive recordings were averaged. The time between successive light flashes was 10 s for dim flashes and 20 s for the highest luminances. The recorded signals were band-pass filtered (1±1000 Hz, without notch filtering) and amplified using a DAM50 data acquisition board (World Precision Instruments,

Aston, UK). Data acquisition (4 kHz) and stimulus presentation were performed by a Power- Lab system (ADInstruments, Oxfordshire, UK).

Optical Coherence Tomography (OCT)

Animals were anesthetized through intraperitoneal injection as described above. Spectral-Domain Optical Coherence Tomography (SD-OCT) imaging was performed using a commercially available device (Spectralis OCT system, Heidelberg Engineering, Heidelberg Germany). To adapt the system to the rat eye, a commercially available +25D lens was fit to the system (Heidelberg lens, HE 50744), the length of the reference pathway was manually adapted according to the manufacturer's instructions. The images were always taken centered on the optic nerve.

Retinal sections

Animals were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium. The dorsal margin of the limbus was marked with a stitch. The enucleated eyes were fixed in 4% paraformaldehyde during 1 h at room temperature, washed in 0.1MPB at a pH of 7.4 (PB) and cryoprotected in 15, 20 and 30% sucrose. After removing the cornea, lens and vitreous body, the retinas were embedded in OCT and frozen in liquid N₂. Retinal sections (fourteen- μ m-thick) were prepared at -25°C by a cryostat (Leica CM 1900; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), mounted on adhesive slides (Superfrost Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Germany) and air-dried. Before further use, retinal sections were thawed, washed in PB for three times, and placed for 1 h in blocking solution (10% normal donkey serum in PB plus 0.5% Triton X-100).

Retinal immunofluorescence

For an objective comparison, TUDCA/GDNF-treated and control retinas (Non-loaded PLGA MSs) were processed in parallel. The primary antibodies used (summarized in Table 1) have been characterized previously. Retinal sections were processed for single or double immunostaining with combinations of antibodies at different dilutions (Table 1) in PB with 0.5% Triton X-100 overnight at room temperature. Subsequently, anti-guinea pig IgG (Alexa Fluor 643 Conjugate), anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488 Conjugate) and/or donkey anti-mouse IgG (Alexa Fluor 555 conjugate) secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were applied at 1:100 dilution for 1 h. The nuclear

marker TOPRO- 3 iodide (Molecular Probes) was also added at a 1:1000 dilution. The tissue samples were washed in PB, mounted in Citifluor (Citifluor Ltd, London, UK), coverslipped and analyzed using confocal laser scanning fluorescence microscopy (Leica TCS SP2; Leica Microsystems). Negative controls included omission of the primary or secondary antibody. Confocal images were processed using Adobe Photoshop 10 software (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

Table 1. Primary antibodies.

Molecular marker	Antibody (reference)	Source	Working dilution
Bassoon	Mouse monoclonal (Pinilla et al. 2016)	Enzo Life Sciences (ADI-VAM- PS003)	1:1000
Calbindin D-28K	Rabbit polyclonal (Fernandez-Sanchez, Lax, Esquivá, et al. 2012)	Swant (CB-38a)	1:500
Protein kinase C, α isoform (α -PKC)	Rabbit polyclonal (Fernandez-Sanchez, Lax, Isiegas, et al. 2012)	Santa Cruz Biotechnology (sc-10800)	1:100
C-terminal Binding Protein-2 (CtBP2)	Mouse monoclonal. Clone: 16/CtBP2 (Schmitz, Königstorfer, and Sudhof 2000)	BD transduction (612044)	1:1000
Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGLUT1)	Guinea Pig polyclonal (Gong et al. 2006)	Chemicon (AB5905)	1:1000

RESULTS

Retinal degeneration 10 (rd10) mouse model:

We tested whether the combination of TUDCA/GDNF had protective effects on photoreceptor degeneration in rd10 model. With that purpose immunolabeling using antibodies against different components between photoreceptor cells and second-order neurons within the outer plexiform layer (OPL) were used.

In order to assess whether TUDCA/GDNF MSs were able to ameliorate loss of synaptic contacts between photoreceptors and horizontal cells, we analyzed the staining pattern of antibodies against C-terminal binding protein-2 (CtBP2) a component of the presynaptic ribbons of photoreceptor cells, and Calbindin, a marker for horizontal cells. TO-PRO 3-iodide was used to stain nuclei.

Horizontal cells are located scattered throughout the most outer part of the inner nuclear layer, near outer plexiform layer (OPL), receiving synaptic input from photoreceptor cells. [Figures 1A](#) and [1B](#) show retinal sections of P30 rd10 mice in which we can appreciate horizontal dendritic terminals at the OPL (arrows). TUDCA/GDNF-PLGA-MSs-treated eyes showed ([Fig 1B](#)) showed more and longer horizontal dendrites tips compared to the untreated control retina (PLGA-MSs) ([Fig 1A](#)).

In order to visualize the synaptic ribbon at photoreceptor axon terminals we used antibodies against CtBP2. In TUDCA/GDNF-treated retinas, CtBP2 staining displayed a continuous band of spots at the OPL level, compared with untreated retinas where only a few disperse dots can be observed ([Fig 1D](#) vs [Fig 1C](#)).

In the treated eyes, merge of double labelling using Calbindin and CtBP2 shows better preserved OPL with more density of photoreceptor synaptic ribbons (red) associated with horizontal dendritic tips (in green) ([Fig 1F](#), arrows) compared to untreated retinas ([Fig 1E](#), arrows).

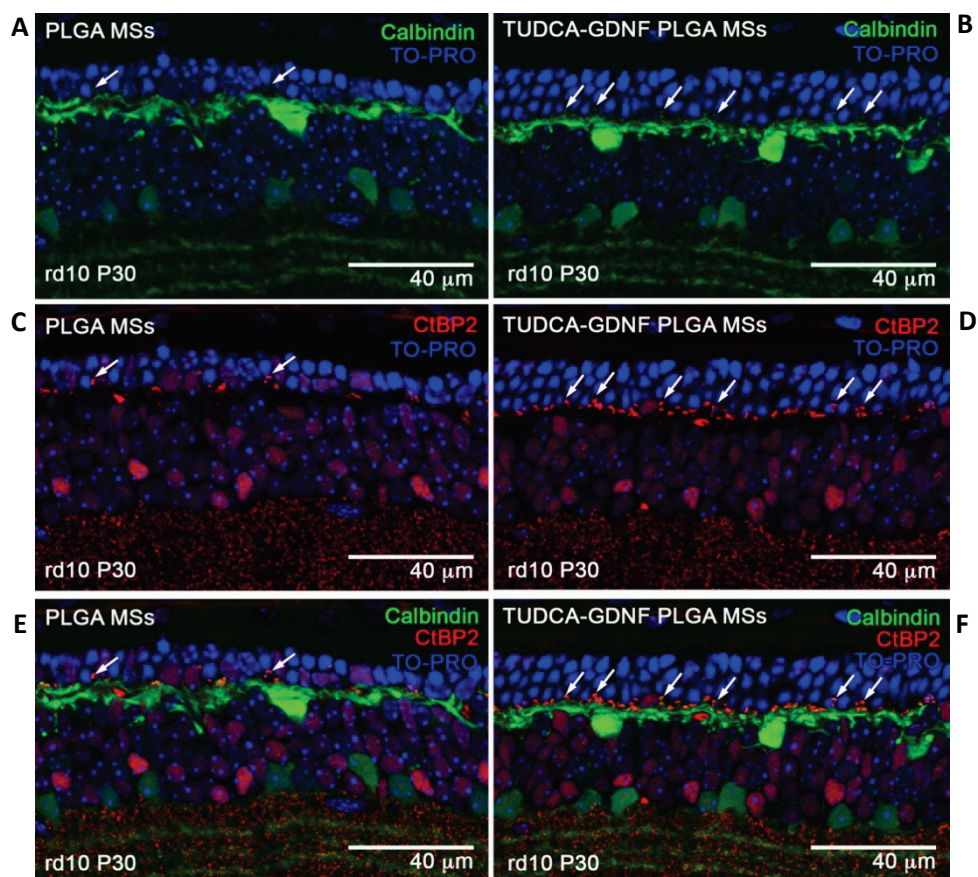


Fig 1 with antibodies against calbindin (horizontal cells), CtBP2 (synaptic ribbons) and TO-PRO (a specific marker for Outer Nuclear Layer - nuclear bodies of photoreceptors).

In addition to horizontal cells, photoreceptors also establish contacts with dendritic terminals of bipolar cells. In order to study the relationship between these cells, rod bipolar cells, the postsynaptic component, were marked with antibodies against the α isoform of protein kinase C (α -PKC) (Fig 2A and Fig 2B). The synaptic ribbons were marked using antibodies against the protein Bassoon (Fig 2C and Fig 2D), a component of synaptic ribbons of both cone pedicles and rod spherules. The results showed less bassoon-positive dots in vehicle-treated rd10 mice retinas at P30 compared to the density observed in treated retinas (compare Fig 2C with Fig 2D).

To assess the structure of presynaptic photoreceptor axon terminals, we analyzed the vesicular glutamate transporter VGLUT1 (Fig 2E and Fig 2F), which contributes to the synaptic transmission between photoreceptor and bipolar cell

terminals. In rd10 mice treated with TUDCA/GDNF particles (Fig 2F), VGLUT1 spots form a continuous band compared with the disrupted VGLUT1 immunolabeling in untreated retinas (Fig 2E). A marked reduction of VGLUT1 immunoreactive axonal terminals has been reported to be related to less ERG responses (Johnson et al. 2007).

Triple labelling using antibodies against α -PKC, Bassoon and VGLUT1 shows better preserved outer plexiform layer in the treated animals (compare Fig 2G with Fig 2H).

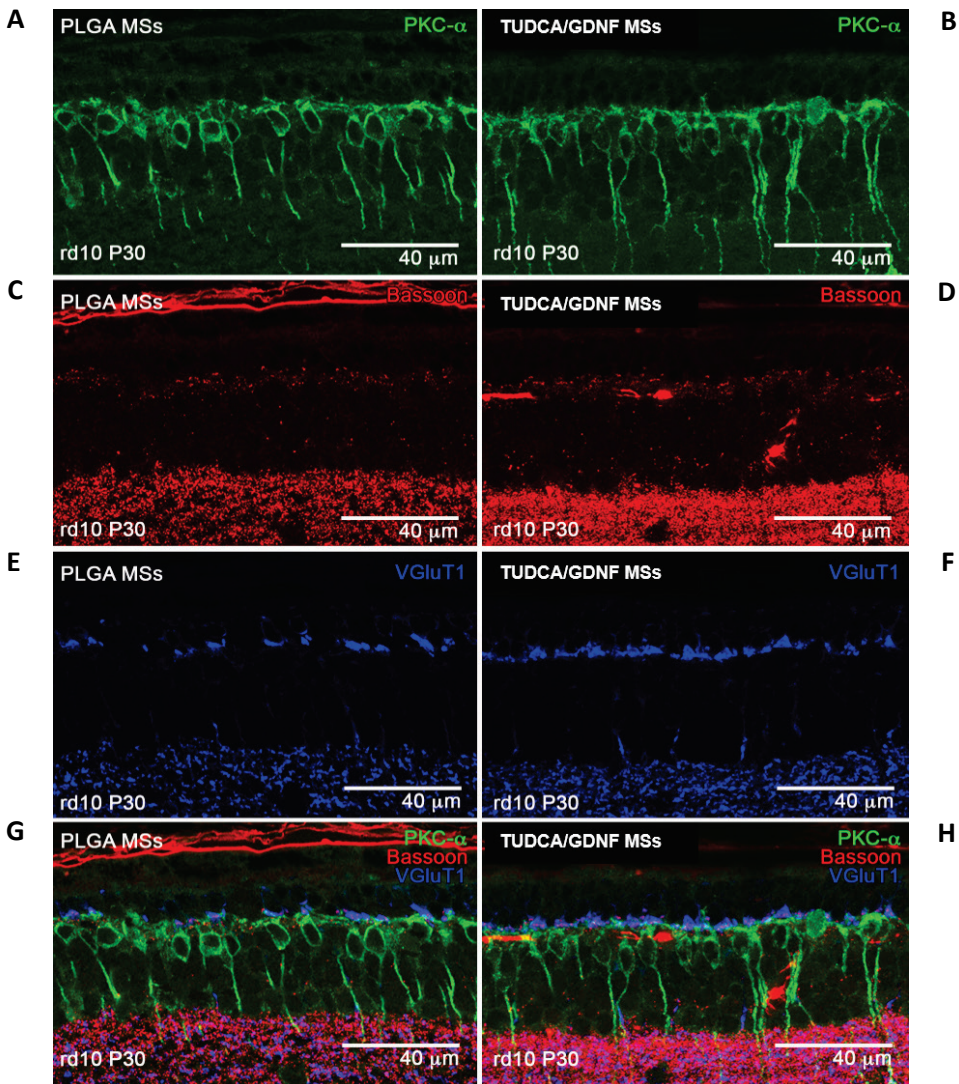


Fig 2 with antibodies against PKC (bipolar sticks), Bassoon (synaptic ribbons) and VGLuT1 (Vesicular glutamate transporter, axonal terminals).

Although these results in rd10 model are encouraging, more experiments are needed in order to achieve stronger results.

RhoP23H mouse model:

To assess the effect of TUDCA/GDNF-loaded MSs on the responsiveness of P23H mouse retinas, scotopic ERG responses were obtained from animals treated with TUDCA/GDNF MSs (right eye) and unloaded MSs (left eye) at 150. By this time point, no significant differences were observed in the eyes injected with TUDCA/GDNF MSs as compared to the controls (Fig. 3).

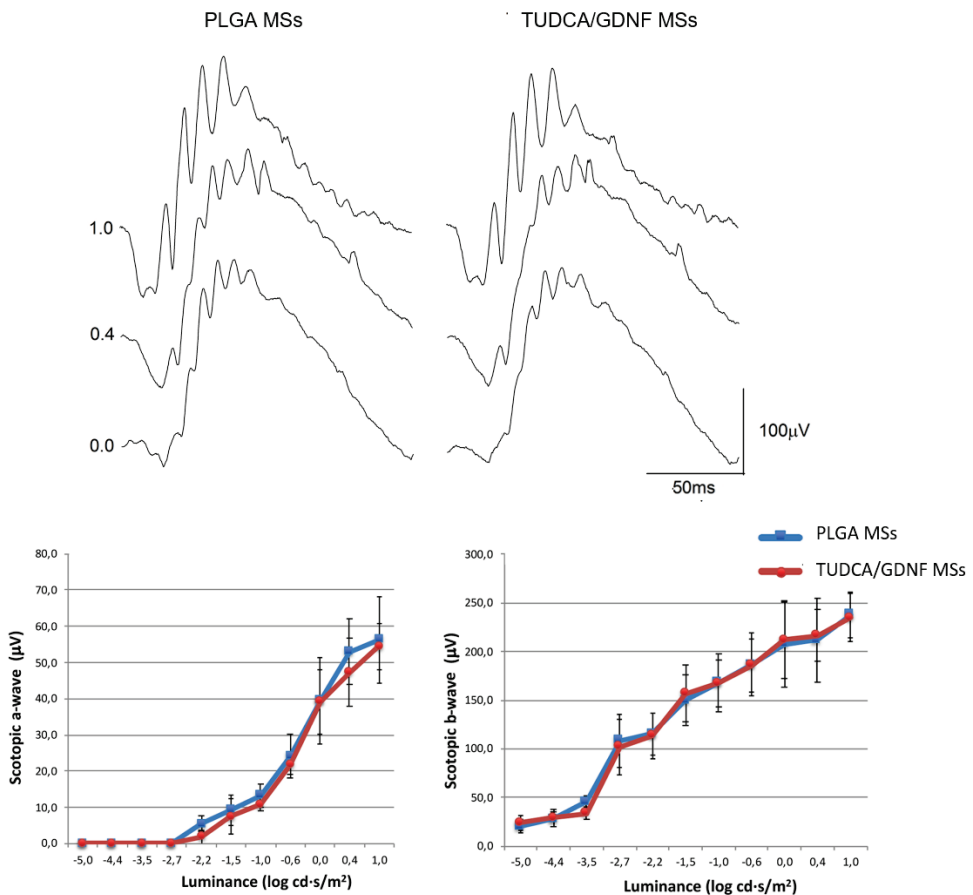


Fig 3 Electroretinographic responses in vehicle- and TUDCA/GDNF-MSs-treated eyes

Cuenca et al. used immunohistochemical methods to correlate the OCT bands with the cell microstructure in the healthy human retina. They proposed the structures and organelles that may be responsible for the visualization of the 4 hyperreflective bands in the external retina in the OCT (Cuenca, Ortuno-Lizaran, and Pinilla 2018):

- First Hyperreflective Band corresponds to the Müller cell contacts and their microvilli surrounding the photoreceptors.
- Second Hyperreflective Band generated by the inner segment ellipsoids (the IS ellipsoid zone [ISeZ]).
- Third Hyperreflective Band correlates with the phagosome zone (PhaZ).
- Fourth Hyperreflective Band generated by the basal mitochondria of the retinal pigment epithelium (RPE mitochondria zone (RPEmitZ)).

Anatomical changes can be effectively evaluated using SD-OCT and immunocytochemistry, with a good correlation between their values. Thus, Cuenca et al. evaluated the correlation between SD-OCT and immunocytochemistry in Pigmented rats heterozygous for the P23H mutation. In this study, anatomical changes observed by SD-OCT were correlated with retinal thickness values determined by immunocytochemistry. According to the authors, normal rats exhibited an OCT profile with four hyperreflectivity layers observed at the external retina. A hyperreflective Inner Plexiform Layer was followed by a hyporeflective Inner Nuclear Layer, a high reflectivity Outer Plexiform Layer and a low reflectivity Outer Nuclear Layer. However, the hyperreflective lines of the external retina were less evident in the P23H rats, diminishing in thickness and being more difficult to recognise (Cuenca, Fernandez-Sanchez, Sauve, et al. 2014).

In the present study, anatomical changes of P23H mice was assessed by SD-OCT. According to the preliminary data (Fig. 4), the 4 outer hyperreflective bands observed in the OCT profile show greater consistency in the treated retina with TUDCA/GDNF-MSs (Fig 4D, arrowheads) compared to the control retina in which is difficult to identify all hyperreflective bands (Fig 4C, arrowheads). This may suggest a beneficial role of the optimized formulation (TUDCA/GDNF-MSs)

in the preservation of the retinal architecture. Although more experiments are needed in order to achieve stronger results.

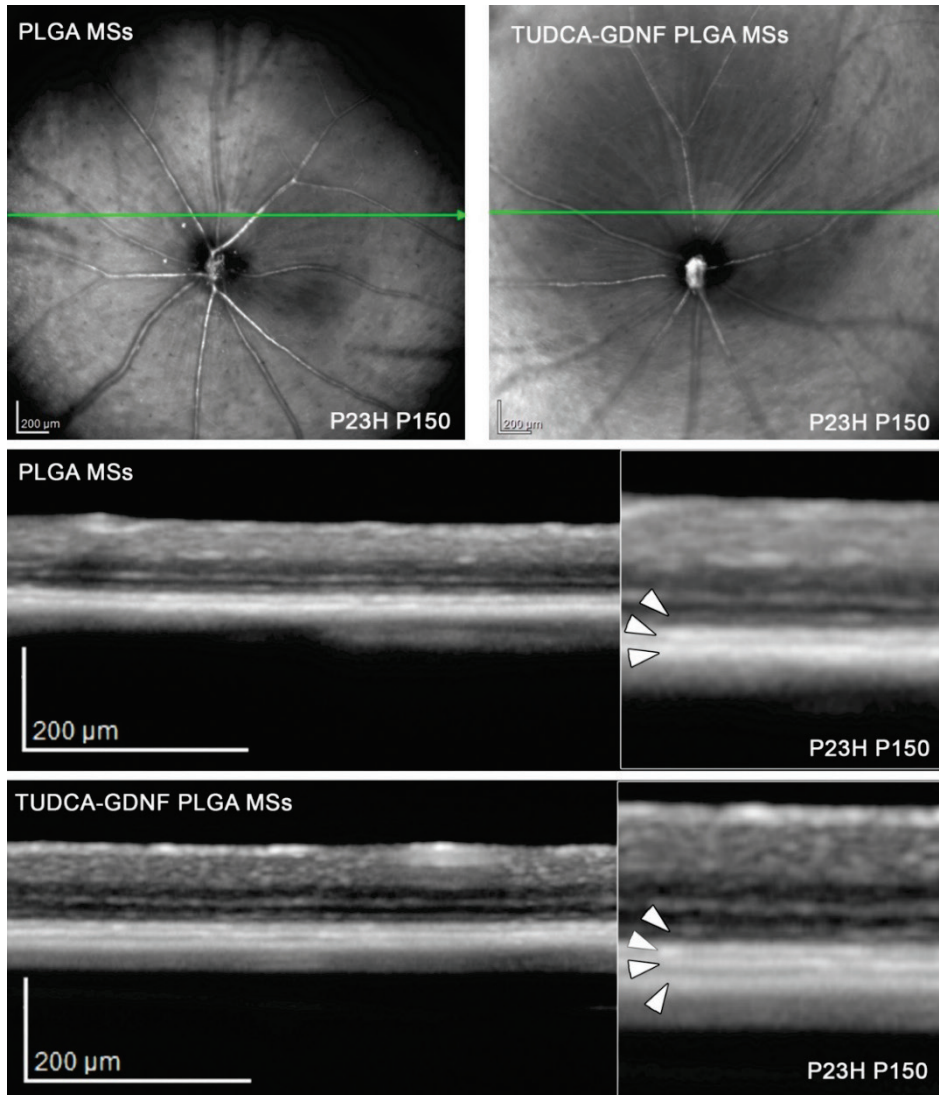


Fig 4 OCT images in vehicle- and TUDCA/GDNF-MSs treated eyes

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo son en su mayoría crónicas y conducen a la pérdida irreversible de la visión (Sheikh et al. 2013). Dentro de estas patologías se incluyen la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), el glaucoma, la retinopatía diabética y los trastornos retinianos hereditarios (Schmidt, Bergert, and Funk 2008). En el curso de estas enfermedades, se produce una degeneración progresiva de las células ganglionares de la retina (CGR), los fotorreceptores, así como de otras estructuras retinianas en lo que se conoce como neurodegeneración (Sheikh et al. 2013). Durante este proceso, se produce un daño gradual en cascada que comienza en las células retinianas inicialmente dañadas, dirigiéndose posteriormente hacia las células vecinas (Baltmr et al. 2010). Se sabe que en la degeneración neuronal se encuentran implicados numerosos mecanismos moleculares, tales como el estrés oxidativo, la inflamación, la disfunción mitocondrial o la activación de proteínas pro-apoptóticas (Kim et al. 2015; Schain and Kreisl 2017; Finsterer et al. 2018). El avance en el entendimiento de estas vías fisiopatológicas ha sido esencial para poner de manifiesto la complejidad ligada a estas enfermedades. Así, se puede decir que todas ellas se caracterizan por presentar una naturaleza multifactorial que implica una interacción compleja de factores metabólicos, funcionales, genéticos y ambientales (Schmidt, Bergert, and Funk 2008).

Dentro de las distintas estrategias terapéuticas encaminadas al tratamiento de estas patologías se encuentra la neuroprotección (Chinskey, Besirli, and Zacks 2014). La terapia neuroprotectora se centra en prevenir, limitar, y en algunos casos, revertir la degeneración o daño de las células neuronales mediante el bloqueo de los mecanismos que la desencadenan, independientemente de cuál haya sido el daño primario (Paulus and Campbell 2016). El conocimiento actual sobre los mecanismos implicados en la muerte neuronal ha generado el desarrollo de un gran número de sustancias con efecto potencial neuroprotector. Así, se han ensayado agentes antiapoptóticos, neurotróficos, moduladores de la inflamación, antioxidantes y biorreguladores mitocondriales (Cheung, Guo, and Cordeiro 2008; Nucci et al. 2016; Pardue and Allen 2018). En el caso de la neuroprotección ocular, ejemplo de estas

sustancias son: el Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) (factores neurotróficos), la dexametasona (antiinflamatorio), la melatonina (antioxidante), la coenzima Q10 (CoQ10) (bioreguladores mitocondriales) y el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) (antiapoptótico). Todos estos agentes neuroprotectores, han demostrado capacidad para promover la supervivencia tanto de las CGR como de los fotorreceptores dañados (Phillips et al. 2008; Checa-Casalengua 2011; Siqueira et al. 2015; Xu et al. 2017; Papucci et al. 2003).

Dada la naturaleza multifactorial y compleja de las enfermedades neurodegenerativas oculares, es lógico pensar que una actuación neuroprotectora múltiple con diversos agentes activos dirigidos frente a una o varias dianas terapéuticas, generaría beneficios significativos desde el punto de vista clínico respecto a la monoterapia tradicional. Este nuevo enfoque terapéutico es lo que se conoce como terapia combinada o terapia de combinación.

Sin embargo, el éxito en el tratamiento de las patologías neurodegenerativas que afectan al segmento posterior del ojo requiere que las sustancias activas alcancen las zonas afectadas de la retina. Por ello, se hace necesario el empleo de vías de administración directas como la intravítrea (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). Así, la administración en el lugar de acción o en sus proximidades favorece el acceso de la sustancia activa al lugar de acción y permite, en gran medida, eliminar los efectos indeseados (V. Andrés-Guerrero 2017). No obstante, como se ha descrito en la introducción de esta memoria, esta ruta de administración no está exenta de inconvenientes, derivados en su mayoría de las inyecciones repetidas que son necesarias para el mantenimiento de concentraciones eficaces de los agentes administrados.

Los sistemas de cesión controlada representan una excelente alternativa a las inyecciones intravítreas de fármacos en solución (Bravo-Osuna et al. 2016). Dentro de ellos, los sistemas microparticulares biodegradables posibilitan el mantenimiento de concentraciones terapéuticas de las sustancias activas durante largos periodos de tiempo, minimizando el riesgo que conlleva una sobredosificación (Bravo-Osuna et al. 2018). Además, dependiendo de su

tamaño pueden administrarse en forma de suspensión empleando agujas convencionales (25-32G) y desaparecer del lugar de administración una vez ejercido el efecto (Herrero-Vanrell et al. 2014).

En este contexto se enmarcan diversos trabajos publicados por nuestro grupo de investigación y que han sido punto de partida de esta tesis. En uno de los primeros trabajos relacionados con este tema, se demostró que la administración intravítrea de microesferas de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) capaces de liberar cantidades muy pequeñas (del orden de picogramos) de GDNF, fue capaz de promover la supervivencia de las CGR en un modelo experimental de glaucoma (modelo de elevación de la presión intraocular mediante inyección episcleral de una solución hipertónica en ratas) (Checa-Casalengua 2011). En este trabajo se utilizó un método de microencapsulación basado en la extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A. Mediante el empleo de un aditivo oleoso (vitamina E) se incorporó la proteína en su estado sólido, favoreciendo así el mantenimiento de su integridad estructural. Los estudios de eficacia se llevaron a cabo en un modelo animal de glaucoma inducido mediante un aumento de la presión intraocular. La administración de esta formulación de microesferas (MSs) (0,025 mg) en los animales de experimentación, incrementó la supervivencia de las CGR 11 semanas después de su inyección, comparado con la administración de una dosis equivalente de GDNF, vitamina E o microesferas blanco. En este trabajo se postuló que tasas de liberación *in vitro* tan bajas como 0,8 pg/día de GDNF podrían resultar neuroprotectoras, ya que en trabajos anteriores se habían ensayado la administración de dosis superiores (1 – 5 µg) de una solución del factor neurotrófico (Kyhn et al. 2009). Posteriormente, con la formulación de microesferas desarrollada se llevó a cabo un estudio farmacocinético en conejos durante 6 meses tras una única administración intravítrea de 2 mg de las microesferas (García-Caballero et al. 2017). En este estudio se demostró que las concentraciones de GDNF obtenidas tras la administración de las micropartículas, resultaron superiores a los niveles basales durante los 6 meses de estudio. A continuación y dado el creciente interés en la administración simultánea de varias sustancias activas para el tratamiento de enfermedades multifactoriales, se evaluó el potencial terapéutico de una combinación de GDNF/VitE con melatonina en microesferas de PLGA sobre la supervivencia de

células fotorreceptoras en un modelo animal de degeneración de fotorreceptores (rho-/-) (García-Caballero C. 2018). La administración intravítrea de esta formulación produjo un rescate parcial, tanto a nivel funcional como estructural, de los fotorreceptores a las 9 semanas post-inyección, suponiendo así un punto de partida para la co-administración eficaz de varios agentes terapéuticos en el segmento posterior del ojo, mediante el empleo de sistemas de liberación modificada.

Partiendo de estos resultados, el desarrollo de esta tesis doctoral se ha centrado en el diseño y caracterización de varias formulaciones de terapia neuroprotectora combinada basadas en microesferas biodegradables de PLGA destinadas a una administración intraocular. En la elaboración de las mismas, se ha empleado el método de la extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión O/A combinando distintos recursos tecnológicos para la co-encapsulación de sustancias activas de muy variada naturaleza.

El **primer trabajo** que se recoge en la presente tesis doctoral ha consistido en la evaluación *in vitro* del efecto migratorio y antiangiogénico de unas microesferas de PLGA cargadas con GDNF o con una combinación de GDNF y BDNF. Este trabajo fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Navarra e Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (Dra. Patricia. Fernández Robredo y Dr. Alfredo García Layana).

De forma generalizada, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) se caracteriza por la aparición de atrofia geográfica o neovascularización coroidea, conllevando en ambos casos a la pérdida irreversible de la visión central. Se considera atrofia geográfica (AG) a la forma avanzada de la DMAE en su forma seca. En la AG se produce el deterioro y la pérdida de fotorreceptores, coriocapilares y células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Colijn et al. 2017; Li, Chintalapudi, and Jablonski 2017). Actualmente, no existe ningún tratamiento específico frente a la AG. En la neovascularización (DMAE húmeda), pequeñas venas anómalas (neovasos coroides) invaden la retina desde la coroides, destruyendo la arquitectura neural de la mácula (Campochiaro 2000b). El tratamiento más útil de esta se

basa en la terapia antiangiogénica, mediante inyecciones periódicas de anticuerpos frente al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Kwong and Mohamed 2014). Sin embargo, estadios avanzados de la DMAE húmeda cursan igualmente con una importante atrofia coroidea y del EPR. Además, algunos estudios han descrito procesos de desgarre del EPR e inflamación intraocular tras la administración de la terapia anti-VEGF (Nagiel et al. 2013; Miura, Klettner, and Roider 2010; Ford et al. 2011), viéndose incrementados con el número de inyecciones recibidas (Lois et al. 2013). Sin embargo, actualmente resulta imposible distinguir si esta atrofia es derivada del curso natural de la enfermedad o está causada por la terapia antiangiogénica (Schutze et al. 2015). Partiendo de este contexto, con las formulaciones desarrolladas en este primer trabajo se intentó abordar el desarrollo de una terapia personalizada y/o coadyuvante a las existentes, para el tratamiento de una enfermedad tan comprometedora para la visión como es la DMAE.

Las formulaciones microparticulares fueron preparadas empleando el método de elaboración antes citado, que permite la liberación de factores neurotróficos de naturaleza proteica en sus formas bioactivas debido a su encapsulación al estado sólido (técnica de extracción-evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A) (Checa-Casalengua et al. 2012). La primera formulación se elaboró a partir de una suspensión de GDNF (20 µg) y 20 µL de vitamina E (MSs-GE), en la segunda formulación se llevó a cabo una combinación de GDNF (36 µg), BDNF (20 µg) y vitamina E (40 µL) (MSs-GBE). También se prepararon microesferas control de PLGA (MSs) y de PLGA con VitE (cantidades iniciales de 20 µL (MSs-E20) o 40 µL (MSs-E40)).

El estudio morfológico de las microesferas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió la observación en detalle de la forma y superficie de las mismas. Si bien se obtuvieron partículas esféricas en todas las formulaciones, las MS control de PLGA presentaron una superficie completamente lisa mientras que el resto de las microesferas fueron porosas. Esta característica se ha descrito como consecuencia de una rápida eliminación del disolvente orgánico durante el proceso de microencapsulación y, fundamentalmente, por la inclusión de un aditivo oleoso (Vitamina E) (Al Haushey et al. 2007; Checa-Casalengua 2011). Tal y como se ha descrito

DISCUSIÓN GENERAL

anteriormente, la inclusión de la vitamina E ayuda a mantener la integridad estructural de los factores neurotróficos durante el proceso de elaboración de las MSs y permite, al mismo tiempo, prolongar la liberación de las sustancias activas en comparación con las formulaciones sin aditivo (Checa-Casalengua 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 a las neuropatías oculares (Chinsky, Besirli, and Zacks 2014; Blasiak et al. 2014).

Las MSs desarrolladas en este primer trabajo presentaron un tamaño de partícula adecuado (entre 24 y 27 μ m) para su administración intravítrea en forma de suspensión mediante agujas convencionales (25G-32G) (Herrero-Vanrell and Refojo 2001). Además, se consiguió una liberación prolongada de las sustancias activas encapsuladas. La eficacia de encapsulación de GDNF obtenida para la formulación de monoterapia (MSs-GE) fue del $21,02 \pm 3,17$ % que se corresponde a $19,2 \pm 2,9$ ng GDNF/mg MSs. Las eficacias de encapsulación de la formulación de GDNF/BDNF (MSs-GBE) fueron del $17,80 \pm 0,20$ % en GDNF que se corresponde a $27,6 \pm 0,7$ ng GDNF/mg MSs y $15,41 \pm 0,98$ % para BDNF que se corresponde con $12,9 \pm 0,8$ ng BDNF/mg MSs. Por tanto, el proceso de microencapsulación empleado permitió la co-encapsulación de las dos proteínas.

Los perfiles de liberación *in vitro* de GDNF y BDNF de estas micropartículas se caracterizaron por una elevada liberación inicial durante las primeras 24h. La formulación de carga individual cedió el $61,02 \pm 4,56$ % ($11,64 \pm 0,89$ ng GDNF/mg MSs) del GDNF incorporado en las microesferas. Las MSs de carga múltiple liberaron el $84,95 \pm 4,9$ % ($22,86 \pm 1,44$ ng GDNF/mg MSs) del GDNF y el $84,61 \pm 2,49$ % ($10,96 \pm 1,02$ ng BDNF / mg MSs) del BDNF. Así, la formulación de terapia combinada dio lugar a una liberación inicial de GDNF de aproximadamente el doble (~ 22 ng GDNF/mg MSs) de la que presentó las MSs de monoterapia (~ 11 ng GDNF/mg MSs). Tras esta primera etapa, ambas formulaciones mostraron liberaciones sostenidas de los agentes activos durante 77 días en cantidades de pg/mg de MSs, con un ligero incremento en la liberación de GDNF en ambas, entre las semanas 7 a 8.

Las microesferas elaboradas y caracterizadas fueron posteriormente evaluadas en cultivos celulares en términos de tolerancia y eficacia. Se emplearon dos tipos celulares: células del epitelio pigmentario de la retina (*Human retinal pigment epithelial cells*, ARPE-19 (ATCC® CRL-2302)) y células endoteliales de la coroides (*primary primate endothelial choroidal cell line*, RF/6A (ATCC® CRL-1780)). Las cantidades ensayadas fueron establecidas para administrar cantidades equivalentes del aditivo oleoso (vitamina E).

La supervivencia a las 24h evaluada mediante el ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) demostró que ninguna de las formulaciones cargadas con agentes activos (40 µg de MSs-GE y 20 µg de MSs-GBE) ni las MSs control, indujeron citotoxicidad en los tipos celulares ensayados (ARPE-19 y RF/6A). Además, mediante el ensayo TUNEL (TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling), que permite evaluar el índice de apoptosis en células así como el índice de células viables (Kyrylkova et al. 2012), se confirmó que incluso cantidades más altas de microesferas resultaron bien toleradas en ambos cultivos celulares.

Una vez evaluada la tolerancia, se realizaron los estudios de funcionalidad en términos de migración y angiogénesis en células ARPE-19 y RF/6A respectivamente, empleando la técnica de *Wound Healing*. El ensayo de cierre de “herida” (*Wound Healing assay*) se basa en la observación de la migración celular de una monocapa confluyente de células tras la realización de una “brecha o herida” (Jonkman et al. 2014). A las 24h de incubación tras la realización de la “brecha”, la formulación de microesferas cargadas con la combinación de GDNF/BDNF aumentó significativamente ($p < 0,01$) la migración de las células del epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19) en comparación con la formulación cargada únicamente con GDNF. Como se ha descrito anteriormente, las cantidades de MSs se ajustaron en base a un mismo contenido en vitamina E, siendo 40 µg de MS-GE y 20 µg de MSs-GBE con este ajuste y de acuerdo con los estudios de liberación, si bien la cantidad de GDNF liberada por ambos grupos de tratamiento a las 24h fue similar (~ 0.44 ng), la formulación combinada de GDNF/BDNF liberó además ~ 0.22 ng de BDNF de forma simultánea. Por otro lado, el cierre de la herida fue similar en células

endoteliales RF/6A para todos los grupos de estudio, no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

Los resultados de este primer trabajo indican el efecto beneficioso de una combinación de factores neurotróficos (GDNF y BDNF) liberados a partir de una formulación de microesferas de PLGA en la migración de células del EPR. Así, la formulación de carga múltiple desarrollada se presenta como una herramienta terapéutica interesante para la reparación del EPR, postulándose además como una posible terapia coadyuvante de la terapia antiangiogénica existente.

En el **segundo trabajo** presentado en esta tesis doctoral se propuso como objetivo el desarrollo de una formulación de microesferas de carga múltiple capaz de liberar de forma simultánea tres agentes neuroprotectores con diferentes mecanismos de acción. El estudio de eficacia de esta formulación se llevó a cabo en un modelo de hipertensión ocular por inyección hipersalina en rata, mediante la determinación de la supervivencia de las células ganglionares de la retina (CGR). Además, en este trabajo se comparó el efecto de la formulación “multi-cargada” frente a la administración de una mezcla física de microesferas de carga individual equivalente en dosis de sustancias activas. Este trabajo fue realizado en colaboración con el Institute of Ophthalmology de la University College London en Reino Unido (Dra. M. Francesca Cordeiro y Dr. Benjamin M. Davis).

Para la consecución de este trabajo se prepararon distintas formulaciones microparticulares de PLGA empleando para ello la técnica de extracción/evaporación del disolvente a partir de una emulsión O/A. Así se elaboraron tres formulaciones de microesferas (MSs) cargadas individualmente con dexametasona (DX-MSs), melatonina (MEL-MSs) o coenzima Q10 (CoQ10-MSs), y una formulación múltiple cargada con estas tres sustancias en combinación (DMQ-MSs). Las cantidades iniciales de los distintos compuestos activos fueron 80 mg de DX, 40 mg de MEL y 20 mg de CoQ10. De forma adicional y con el fin de poder establecer comparaciones, también se prepararon microesferas de PLGA no cargadas.

Desde el punto de vista tecnológico, las partículas obtenidas fueron esféricas con tamaños similares y regulares. En las imágenes obtenidas por

SEM se observaron diferencias en la superficie de las formulaciones que presentaban CoQ10 en su composición, ya que, tanto las MSs de CoQ10 como la formulación de carga múltiple, presentaron superficies porosas y rugosas. Esta morfología se atribuye a la apariencia característica del CoQ10 (Nepal, Han, and Choi 2010) asociada a la rápida eliminación del solvente orgánico que se produce en los procesos de microencapsulación.

Respecto a la morfología interna de las distintas MSs desarrolladas, la formulación de carga triple (DMQ-MSs) mostró una estructura interna compleja fruto de la encapsulación de las tres sustancias activas. Así, en esta formulación se observaron cristales de dexametasona (DX) y poros pequeños y grandes semejantes a los observados en el interior de las MSs de melatonina (MEL) y de CoQ10, respectivamente.

El tamaño medio de partícula estuvo comprendido entre 38 y 20 μm en todos los casos ($24,50 \pm 1,76 \mu\text{m}$ para la formulación de DX, $27,46 \pm 0,66 \mu\text{m}$ para la de MEL, $29,97 \pm 1,81 \mu\text{m}$ para la de CoQ10, $29,04 \pm 1,89 \mu\text{m}$ para la formulación de carga múltiple y $24,72 \pm 0,79 \mu\text{m}$ para la formulación de MSs no cargadas), siendo por tanto adecuados para su administración intravítrea al igual que se comentó en el trabajo anterior (Herrero-Vanrell and Refojo 2001).

La eficacia de encapsulación de DX en las MS de carga múltiple ($78,20 \pm 0,42\%$) se redujo en comparación con la formulación individual ($97,49 \pm 1,53\%$). Esto pudo ser debido a ciertos fenómenos de competencia con las otras sustancias activas encapsuladas durante el proceso. Por el contrario, las eficacias de encapsulación de MEL y CoQ10 mantuvieron valores similares en ambas formulaciones ($\sim 62\%$ y $\sim 96\%$ respectivamente).

El perfil de cesión de un fármaco liberado a partir de un sistema biodegradable de tipo microparticulado está condicionado por diferentes parámetros. Entre otros, la matriz polimérica empleada, las características fisicoquímicas del fármaco encapsulado y el procedimiento de elaboración de las microesferas (Yang, Chung, and Ng 2001; Huang and Brazel 2001). También hay que añadir la encapsulación conjunta de varias sustancias activas. En la formulación de MSs con carga múltiple (DMQ-MSs) la velocidad de liberación de CoQ10 y DX resultó dos ($0,63 \mu\text{g}/\text{mg MSs}/\text{día}$) y aproximadamente tres veces

(0,60 µg/mg MSs/día) más alta, en comparación con las partículas de carga individual (0,35 µg/mg MSs/día en las CoQ10-MSs y $0,26 \pm 0,02$ µg DX/mg MSs/día en las DX-MSs). Este resultado podría relacionarse con la proporción menor de polímero con respecto a una determinada cantidad de MSs que hubo en las partículas de carga múltiple. Por el contrario, en el caso de la MEL la velocidad de liberación resultó significativamente más lenta (1,66 µg/mg MSs/día) que en las microesferas de carga única ($4,30 \pm 3,96$ µg MEL/mg MSs/día). En este caso la presencia de sustancias muy poco solubles (como la CoQ10) podría ser la responsable de la modulación de la liberación de otros compuestos más solubles como la melatonina en una formulación combinada.

Desde el punto de vista tecnológico, la encapsulación de más de un compuesto activo dentro del mismo sistema microparticulado supone un reto importante. Los sistemas de administración conjunta deben ser capaces de liberar de forma controlada todos los compuestos encapsulados en el lugar de acción. Por ello, es sumamente relevante evaluar tanto el estado de las sustancias activas microencapsuladas, como las posibles interacciones que se produzcan entre ellas. En este trabajo los estudios de DSC realizados, tanto de forma individual como en mezclas físicas con el polímero PLGA, permitieron la detección de las transiciones endotérmicas características correspondientes a las sustancias activas (DX, MEL, CoQ10) y al polímero (244, 118, 55 y 53 °C respectivamente) (Farboud, Nasrollahi, and Tabbakhi 2011; Musumeci et al. 2013; Subuddhi 2014), no observándose diferencias significativas entre los componentes por separado o en mezcla con PLGA. Sin embargo, los termogramas de las formulaciones fueron diferentes. En primer lugar, la T^a de transición del PLGA se redujo ligeramente. Este hecho puede atribuirse al tamaño micrométrico y alta superficie específica de las MSs, así como al efecto plastificante que ejercen los compuesto encapsulados que han sido ya descritos por otros autores (Farboud, Nasrollahi, and Tabbakhi 2011). En la formulación de DX-MSs se observó el pico endotérmico correspondiente a la DX indicando la presencia de cristales de este fármaco en la matriz polimérica, resultado que se correlaciona con las imágenes TEM obtenidas del interior de estas micropartículas. Sin embargo, en la formulación de MEL-MSs no se registró pico correspondiente al agente activo. De acuerdo con otros autores, esto se podría deber a la incorporación a nivel molecular de la melatonina, probablemente relacionada con sus propiedades anfífilas (Musumeci et al. 2013). Por otro

lado, en la formulación de CoQ10-MSs el pico endotérmico desapareció, atribuyéndose en este caso, a la completa disolución del CoQ10 en el disolvente orgánico durante el proceso de microencapsulación (Farboud, Nasrollahi, and Tabbakhi 2011). Finalmente, en el termograma de la formulación de carga múltiple (DMQ-MSs) se observaron picos térmicos correspondientes a la DX y a la MEL. Esto indicaría la presencia de parte de estas dos sustancias al estado sólido en el interior de la formulación combinada. Así mismo, la diferencia en el estado de la MEL en esta formulación con respecto a la de carga individual, también podría explicar la distinta velocidad de liberación encontrada entre ambas, anteriormente comentada.

La actividad neuroprotectora *in vitro* de la formulación combinada se evaluó mediante un modelo de neurotoxicidad, empleando la línea celular inmortalizada de precursores neuronales R28. Dentro de los diferentes agentes de daño existentes en este trabajo se seleccionó el glutamato. Este agente de daño actúa generando excitotoxicidad por aumento de Ca^{2+} intracelular, lo cual conlleva a la despolarización de la membrana mitocondrial provocando una pérdida significativa de ATP intracelular y generando especies reactivas de oxígeno (ROS) (Vishnoi, Raisuddin, and Parvez 2016). Tras 24h de incubación conjunta con glutamato, la formulación de terapia combinada demostró un efecto neuroprotector significativo frente al agente excitotóxico ($p = 0,0061$), atribuyéndose su actividad a la presencia de CoQ10 y MEL. Se sabe que la CoQ10 estabiliza las células inhibiendo la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) y presenta además actividad antioxidante (Papucci et al. 2003; Hernandez-Camacho et al. 2018). Por otro lado, la MEL protege de la neurotoxicidad por glutamato reduciendo el estrés oxidativo a través de múltiples procesos, como la eliminación directa de radicales libres o la estimulación de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, entre otros (Reiter et al. 2003; Antolin et al. 1997).

Finalmente se evaluó la eficacia de las microesferas de carga múltiple en un modelo de hipertensión ocular por inyección hipersalina en rata. Además, se llevó a cabo una comparación entre el efecto de estas microesferas “multi-cargadas” y la administración de una mezcla física de microesferas de carga individual equivalente a la misma dosis de principios activos. Los animales se

distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento (n = 5 cada uno): MSs de PLGA sin carga (MSs blanco, 5.825% p/v), MS de carga múltiple (DMQ-MSs, 2.5% p/v), la mezcla física de MSs cargadas con cada sustancia activa (DX-MSs, MEL-MSs y CoQ10-MSs, (MSsmix), 5,825% p/v), controles sin tratamiento (OHT) y ratas sanas. La cantidad de DMQ-MSs administradas fue de 0,1 mg. Así, a fin de administrar las mismas dosis de sustancias activas, se emplearon los datos de eficacia de encapsulación para calcular las cantidades de cada formulación de carga individual que compuso la mezcla física (0,071 mg DX-MSs + 0,082 mg MEL-MSs + 0,08 mg CoQ10-MSs y que resultaron en 0,233 mg de MSs). La cantidad de MSs blanco administradas en este estudio fue la misma que la de la mezcla física de micropartículas. La administración intravítrea de las formulaciones (suspensiones de MSs en PBS), se realizó de forma previa a la inducción del modelo de hipertensión por inyección hipersalina (1,85 M) en las venas episclerales. Tres semanas después de la inducción del modelo, se cuantificó histológicamente la supervivencia de las CGR a partir de montajes completos de retina utilizando el marcador molecular Brn3a (Davis et al. 2018; Davis et al. 2017). Aunque actualmente el mecanismo fisiopatológico del glaucoma no se encuentra establecido en su totalidad, un rasgo distintivo de esta enfermedad es la degeneración de las CGR que conduce a un déficit o pérdida de la visión (Nickells et al. 2012). La cuantificación de la densidad de CGR se realizó utilizando un algoritmo automatizado desarrollado por el grupo de Londres (Davis, Guo, et al. 2016). Seguidamente se utilizó un análisis de regresión lineal (R versión 3.3.1, eq. 2) para evaluar la eficacia de los diferentes tratamientos sobre la densidad de las RGC (células/mm²). Los resultados del análisis de regresión indicaron que la administración intravítrea de DMQ-MS produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la supervivencia de las CGR en este modelo animal de glaucoma (OHT), en comparación con la administración de la mezcla de MSs de carga individual (MSsmix) o las MSs blanco. Por otro lado, la mezcla física (MSsmix) no fue capaz de proteger las CGR de la muerte, observándose una densidad media de CGR semejante a la obtenido en los animales OHT no tratados y a los tratados con las microesferas no cargadas. Este efecto podría relacionarse con la cantidad de partículas (0,233 mg) que tuvo que emplearse para administrar las mismas dosis de agentes activos que resultó ser el doble de la formulación de carga múltiple (0,1 mg). Además, si se tiene en cuenta la dosis de cada sustancia activa administrada (DX / MEL

/CoQ10 – 11,5 / 4,6 / 3,6 μ g) se puede constatar que la cantidad de polímero administrado con la mezcla física de MSs fue casi tres veces superior (213,3 μ g) a la empleada con la formulación de carga múltiple (80,3 μ g). Los resultados en este trabajo coinciden con los obtenidos en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, en el cual demostramos que la inyección intravítrea de cantidades elevadas de MSs de PLGA (0,5 mg), inducían toxicidad retiniana en ratas (Zhao, Rodriguez-Villagra, et al. 2017). Por el contrario, para cantidades inferiores de MSs (0,1 mg) no se observaron efectos de toxicidad.

El desarrollo de un sistema de liberación controlada de carga múltiple que permite el tratamiento simultáneo de distintas dianas terapéuticas reduciendo la cantidad de biomaterial (PLGA) necesaria para su administración intraocular resulta de gran interés. Este enfoque terapéutico permite la administración conjunta de diferentes sustancias activas logrando una liberación sostenida y prolongada de las mismas, manteniendo un factor crítico como es la tolerancia del sistema microparticulado a nivel de la retina. Así, este tipo de formulaciones basadas en microesferas de carga múltiple, se postulan como una estrategia neuroprotectora prometedora para el tratamiento de enfermedades retinianas multifactoriales como el glaucoma.

Tras los desarrollos previos de sistemas microparticulares de liberación controlada para la liberación simultánea de dos sustancias activas de origen biológico de elevado peso molecular (GDNF/BDNF) en el primer trabajo y de tres agentes terapéuticos de bajo peso molecular (DX, MEL y CoQ10) en el segundo, en el **tercer trabajo** se planteó la elaboración de una formulación de terapia combinada para la liberación simultánea de compuestos activos de distinta naturaleza y entidad física. Así, se llevó a cabo el desarrollo y optimización de una formulación de microesferas biodegradables de PLGA cargadas con GDNF y ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) destinadas al tratamiento de patologías neurodegenerativas del segmento posterior del ojo, tales como la retinosis pigmentaria (RP). Como se abordó en la introducción, el GDNF es un producto biotecnológico con un alto peso molecular (30.000 g/mol) y el TUDCA es un compuesto químico de bajo peso molecular (499,7036 g/mol). Por ello la complejidad de este trabajo residió en la obtención de una formulación de MSs capaces de encapsular cantidades significativas de ambas sustancias

activas, dando lugar a una liberación simultánea y controlada de las mismas. Los resultados preliminares de eficacia *in vivo* de este trabajo fueron realizado con la colaboración del Dr. M. Nicolás Cuenca y la Dra. Laura Fernández Sánchez (Departamento de Fisiología, Genética and Microbiología de la Universidad de Alicante).

Para la elaboración de las distintas formulaciones de MSs se empleó la técnica de extracción/evaporación del disolvente a partir de una emulsión S/O/A previamente citada (Checa-Casalengua, Jiang, Bravo-Osuna, Tucker, Molina-Martinez, et al. 2011). Así, al igual que en el primer trabajo, se incluyó un aditivo oleoso (vitamina E) con el fin de incorporar el factor neurotrófico (GDNF) al estado sólido. Partiendo de este procedimiento de microencapsulación se emplearon distintas estrategias tecnológicas a fin de optimizar el proceso de co-encapsulación de GDNF y TUDCA. La composición de la formulación de origen correspondió a una suspensión de GDNF (20 µg) en vitamina E (20 µL), y 10 mg de TUDCA. Así mismo, a fin de poder realizar comparaciones, se establecieron tres formulaciones control: MSs de GDNF/Vit E (20 µg/20 µL), MSs de PLGA no cargadas y MSs de vitamina E (20 µL).

Dado que el TUDCA presenta una buena solubilidad en etanol (totalmente soluble) y baja en diclorometano (prácticamente insoluble), el primer recurso tecnológico que se utilizó en el proceso de co-microencapsulación fue el empleo de etanol como co-solvente en la fase interna de la emulsión. Así, se evaluaron 3 proporciones de mezclas solventes como disolvente de fase interna: diclorometano:etanol (80:20), DCM:EtOH (75:25) y DCM:EtOH (70:30). La segunda estrategia tecnológica residió en el incremento de la viscosidad de la fase externa mediante la adición de un viscosizante (hydroxypropyl methylcellulose (HPMC (1% p/v))). Finalmente, también se evaluó el incremento tanto de la viscosidad como de la presión osmótica en la fase externa. Para ello se empleó un viscosizante (HPMC (1% p/v)) y una sal (Na Cl (5% p/v)) en la elaboración de la fase externa acuosa de la emulsión.

De acuerdo con la evaluación morfológica realizada por SEM, todas las MSs presentaron formas esféricas y distribuciones de tamaño regulares. Salvo las MSs blanco de PLGA, las cuales presentaron una superficie lisa con

ausencia de irregularidades, el resto de las formulaciones exhibieron poros en su superficie. La presencia de porosidad superficial ya ha sido previamente discutida en el primer trabajo. Las formulaciones de carga múltiple (GDNF/TUDCA) elaboradas con presencia de etanol en la fase interna, mostraron además superficies ligeramente rugosas. Es un hecho conocido que la velocidad de solidificación del polímero durante el proceso de elaboración de las micropartículas se encuentra condicionado por su solubilidad en los disolventes orgánicos empleados, afectando tanto a la morfología externa de las MSs, como a la eficacia de encapsulación y a la porosidad de la matriz (Jeyanthi 1997; Mehta 1996). En este caso, la presencia de un solvente polar (etanol) en la fase dispersa se relaciona con un aspecto rugoso superficial, fruto de su contribución a la rápida solidificación de las micropartículas.

En cuanto a la morfología interna de las matrices poliméricas, las MSs elaboradas con diclorometano como disolvente único de fase interna presentaron matrices poliméricas densas. Por el contrario, las formulaciones de terapia combinada, preparadas con la mezcla de solventes (diclorometano y etanol), mostraron matrices moderadamente densas con poros más grandes. Dicha estructura fue confirmada por microscopía confocal mediante el empleo de albúmina sérica bovina como proteína modelo y rojo Nilo como fluoróforo para marcar el polímero. Así, en las imágenes axiales se pudieron observar poros de mayor tamaño en la estructura matricial de las MSs elaborada con la mezcla DCM:EtOH que los obtenidos en las MSs preparadas en ausencia del co-solvente polar. Este tipo de morfología interna se observa cuando se produce una solidificación polimérica rápida, que como previamente se ha comentado, se puede atribuir a la presencia de EtOH en la fase orgánica. Cuando un co-solvente miscible con el agua (EtOH) forma parte de la fase interna, se produce una rápida transferencia de masa entre las fases dispersa y continua, lo que lleva a una precipitación más rápida del polímero (Jeyanthi 1997; Bodmeier 1988). Además, el EtOH no es capaz de disolver el PLGA por lo que su presencia también actúa reduciendo la solubilidad del polímero facilitando así su precipitación.

En lo referente al tamaño de partícula, todas las formulaciones presentaron distribuciones unimodales comprendidas entre 20 - 30 μm , y por

tanto adecuadas para su administración intravítrea (Herrero-Vanrell and Refojo 2001).

La eficacia de encapsulación de GDNF en las MSs de terapia combinada con TUDCA elaboradas con mezclas solventes de DCM:EtOH, resultó superior en todos los casos (>30%), que la obtenida en la formulación de monoterapia (GDNF/VitE-MSs: $21,02 \pm 3,17$ % que se corresponden a $19,19 \pm 2,9$ ng GDNF/mg MSs) y a la de formulación múltiple de GDNF/TUDCA preparada con DCM como solvente único de fase interna ($28,53 \pm 0,60$ % que se corresponden a $24,91 \pm 0,32$ ng GDNF/mg MSs). Así mismo, cabe destacar que la inclusión de EtOH en la fase interna dio lugar a eficacias de encapsulación de TUDCA (>63% (~ 27 μg TUDCA/mg MSs)) superiores a las obtenidas ($45,65 \pm 8,01$ % ($19,93 \pm 3,50$ μg TUDCA/mg MSs)) en las MSs de GDNF/TUDCA elaboradas con DCM como disolvente del polímero.

El incremento observado en la eficacia de encapsulación de las dos sustancias activas puede atribuirse a la rápida precipitación del polímero debido al empleo de la mezcla DCM:EtOH, que favorece el atrapamiento de las sustancias activas. La mezcla correspondiente a DCM:EtOH (75:25) produjo las encapsulaciones más altas de ambas moléculas activas ($56,42 \pm 2,10$ % en GDNF que se corresponden a $49,27 \pm 1,83$ ng GDNF/mg MSs y $72,50 \pm 7,50$ % en TUDCA que se corresponden a $31,66 \pm 3,28$ μg TUDCA /mg MSs), seleccionándose así como proporción óptima para el desarrollo posterior.

Con el fin de optimizar la formulación seleccionada se recurrió al empleo del incremento de la viscosidad de la fase externa de la emulsión mediante la adición de un viscosizante (HPMC (1% p/v)). Se sabe que la viscosidad de la fase continua contribuye a aumentar el gradiente de concentración del solvente orgánico a través de la misma, lo que conduce a una rápida extracción del solvente y a una rápida solidificación de las micropartículas (Ogawa 1988; Coombes 1998). En el caso de las partículas de carga múltiple desarrolladas, esta estrategia tecnológica condujo a un ligero aumento en la eficacia de encapsulación de TUDCA ($34,1 \pm 4,98$ μg TUDCA / mg MSs) respecto a la formulación de partida previamente descrita. Sin embargo, se produjo una pequeña disminución en la tasa de proteína encapsulada en las micropartículas

(42,67 ± 1,30 ng GDNF / mg MSs). Por esta razón, se recurrió a introducir otro recurso tecnológico de tal forma que se combinó el aumento de la viscosidad como el incremento de la presión osmótica de la fase externa, empleando un viscosizante (HPMC (1% p/w)) y una sal (Na Cl (5% p/w)). No obstante, si bien se incrementó ligeramente la encapsulación de la proteína (46,26 ± 0,48 ng GDNF/mg MS) se produjo una disminución en la eficiencia de encapsulación de TUDCA (27,83 ± 2,40 µg TUDCA/mg MS).

Generalmente el perfil de liberación de los productos biotecnológicos a partir de sistemas microparticulares se caracteriza por la presencia de un elevado *burst* inicial, lo que puede derivar en una formulación ineficaz tanto desde el punto de vista terapéutico como del económico (Huang and Brazel 2001). La liberación inicial más elevada se observó en la formulación de monoterapia (GDNF/VitE-MSs – 60,67 ± 4,66 % que se corresponden a 11,65 ± 0,89 ng GDNF/mg MSs). La incorporación de un segundo componente (TUDCA) en la formulación de proteína generó cambios en la cesión inicial de GDNF, reduciéndose a valores inferiores al 40% en todas las formulaciones de terapia combinada. Tanto la formulación elaborada con una mayor viscosidad de fase externa, como la preparada con una mayor viscosidad y presión osmótica de esta fase, mostraron valores inferiores de *burst* (22,03 ± 1,41 % que se corresponden a 9,40 ± 1,61 ng GDNF/mg MSs y del 21,45 ± 2,67 % que se corresponden a 9,92 ± 1,24 ng GDNF/mg MSs, respectivamente). De acuerdo con lo descrito anteriormente por otros autores, este hecho puede ser debido a una mejora de la internalización de la proteína en la matriz polimérica durante el proceso de microencapsulación, fruto de una mayor viscosidad (Löfroth J.E. 1991) o viscosidad y presión osmótica (Dorati 2008) de esta fase, respectivamente. Respecto al TUDCA, las cesiones iniciales resultaron inferiores al 6% en todos los casos. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó como formulación optimizada a la formulación de MSs elaboradas con una mezcla solvente de DCM:EtOH (75:25) en la fase interna de la emulsión y un viscosizante (HPMC (1% p/v)) en la fase externa (MSs designadas como formulación 6).

El perfil de liberación *in vitro* a largo plazo (91 días) de la formulación optimizada (formulación 6), se comparó con el de las MSs preparadas sin

DISCUSIÓN GENERAL

viscosizante de fase externa, pero con la misma proporción de mezcla solvente de fase interna (formulación 4).

Como se señaló anteriormente, las MS de la formulación optimizada mostraron un *burst* inicial de GDNF de $22,03 \pm 1,41\%$ ($9,40 \pm 1,60$ ng GDNF/mg MSs). Después de una rápida liberación durante los primeros siete días ($189,59 \pm 91,85$ pg de GDNF/mg MSs/día), se produjo una liberación controlada de la proteína a una velocidad de $47,58 \pm 3,09$ pg de GDNF/mg MSs/día hasta el final del ensayo (día 91). La cantidad de TUDCA liberada en las 24 horas representó un $4,49 \pm 2,66\%$ ($1,49 \pm 0,72$ µg TUDCA/mg MSs) seguido de una liberación lenta hasta el día 21 ($0,06 \pm 0,02$ µg TUDCA/mg MSs / día). Finalmente, se observó una liberación sostenida de TUDCA a una velocidad de $0,35 \pm 0,15$ µg de TUDCA/ mg MSs/día hasta el final del estudio de cesión (día 91).

La liberación de GDNF en la formulación sin adición de viscosizante presentó un *burst* inicial de GDNF de $36,59 \pm 3,98\%$ ($18,03 \pm 0,76$ ng GDNF/mg MSs). Tras una rápida liberación durante los primeros 7 días ($546,45 \pm 99,28$ pg de GDNF/mg MSs/día) se produjo una cesión sostenida de GDNF con una velocidad de liberación de $21,35 \pm 1,85$ pg de GDNF/mg MSs/día hasta el final del estudio (día 91). Respecto al TUDCA, se produjo una liberación lenta durante las primeras 24 horas ($3,43 \pm 0,37\%$ ($1,09 \pm 0,18$ µg de TUDCA / mg MSs / día)). Seguidamente, y al contrario que con la formulación de MSs preparadas con adición de un viscosizante, se observó un perfil de liberación trifásico del TUDCA con una velocidad de liberación de $0,02 \pm 0,00$ µg TUDCA/mg MSs/día desde el día 7 hasta el día 21, viéndose aumentada a $0,19 \pm 0,04$ µg TUDCA/mg MSs/día hasta el día 70 y a $0,63 \pm 0,25$ µg TUDCA / mg MSs / día desde el día 70 hasta el final del ensayo (día 91). Una posible explicación de este hecho podría encontrarse al analizar el efecto del viscosizante empleado durante el proceso de microencapsulación, sobre la distribución del TUDCA en el interior de la matriz polimérica de la formulación optimizada. El aumento de la viscosidad de la fase externa durante la elaboración pudo conducir a una distribución más homogénea de esta sustancia activa dentro de las micropartículas, dando lugar a una liberación del TUDCA de una manera más controlada y constante. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser confirmada en un futuro.

Finalmente se llevaron a cabo estudios preliminares de eficacia en dos modelos animales de retinosis pigmentaria en ratones (modelo de degeneración rápida: rd10 y modelo de degeneración lenta: P23H). Así en el modelo rd10, las secciones retinianas a día 30 después del nacimiento (P30) correspondientes a los ojos tratados con la formulación optimizada de GDNF/TUDCA, muestra una capa plexiforme externa mejor conservada con dendritas horizontales más prolongadas y segmentos externos bien definidos rodeados por cintas sinápticas más abundantes y bien estructuradas. Así mismo, los cortes histológicos de los ojos tratados con las microesferas de GDNF/TUDCA, presentaron una mayor abundancia del transportador vesicular de glutamato (VGLUT1), el cual contribuye a la transmisión sináptica entre los terminales de las células fotorreceptoras y las bipolares. Respecto al modelo de degeneración lenta (P23H), las imágenes obtenidas mediante Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) a P150 de las retinas tratadas con la formulación optimizada de GDNF/TUDCA, presentaron una mejor conservación de las bandas hiperreflectivas de la retina externa en comparación a los ojos no tratados. Estos datos pueden sugerir un efecto beneficioso de la formulación de terapia combinada desarrollada en la preservación de la estructura retiniana. No obstante, se necesita aumentar el número de animales para confirmar estos resultados preliminares.

Uno de los objetivos principales del desarrollo de sistemas de cesión controlada de sustancias activas para el tratamiento de enfermedades crónicas, consiste en la obtención de formulaciones capaces de liberar de forma sostenida y prolongada las moléculas encapsuladas (Kang-Mieler, Osswald, and Mieler 2014). Así, y de acuerdo con los datos preliminares de eficacia *in vivo*, las MSs de carga múltiple optimizadas en este tercer trabajo se presentan como una herramienta terapéutica sumamente interesante para el tratamiento de patologías crónicas neurodegenerativas del segmento posterior del ojo, tales como la retinosis pigmentaria (RP).

Como se ha comentado inicialmente, en las enfermedades neurodegenerativas del segmento posterior del ojo, al tratarse de patologías que presentan una etiología multifactorial, resulta especialmente interesante el tratamiento combinado con distintos agentes terapéuticos que actúen sobre los

DISCUSIÓN GENERAL

diversos mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad. De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, las tres formulaciones de MSs de terapia neuroprotectora combinada desarrolladas, GDNF/BDNF-MSs, DX/MEL/CoQ10-MSs y GDNF/TUDCA-MSs, podrían postularse como herramientas terapéuticas prometedoras para el tratamiento de estas enfermedades.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. Los métodos de microencapsulación empleados en esta tesis doctoral han permitido la obtención de tres nuevos sistemas intraoculares de administración de fármacos para terapia combinada consistentes en micropartículas poliméricas de PLGA para la liberación conjunta de varias sustancias neuroprotectoras.
2. La formulación de microesferas cargadas con una combinación de BDNF y GDNF, gracias a su capacidad regenerativa del epitelio pigmentario de la retina, presentan utilidad potencial como terapia coadyuvante en la degeneración macular asociada a la edad.
3. La liberación simultánea de tres agentes activos frente a distintas dianas terapéuticas (dexametasona, melatonina y coenzima Q10) a partir de microesferas de carga múltiple resulta una estrategia neuroprotectora prometedora para el tratamiento de enfermedades multifactoriales de la retina.
4. La estrategia terapéutica múltiple permite la incorporación conjunta de diferentes fármacos dentro de un mismo microportador reduciendo la cantidad de biomaterial requerido para su administración intraocular mejorando no sólo su tolerancia sino aumentando su eficacia.
5. El empleo de un co-solvente polar en la fase interna orgánica y un viscosizante en la fase externa acuosa durante el proceso de microencapsulación se puede considerar como un recurso tecnológico de interés en la obtención de sistemas optimizados para la liberación conjunta de productos biotecnológicos como GDNF y fármacos de bajo peso molecular como el TUDCA.
6. La asociación de GDNF/TUDCA en microesferas de carga múltiple permite su liberación simultánea de forma controlada durante al menos 91 días postulándose como una interesante herramienta terapéutica para el tratamiento

CONCLUSIONES

de patologías neurodegenerativas multifactoriales del segmento posterior del ojo.

CONCLUSIONS

1. The microencapsulation methods employed in this doctoral thesis allowed obtaining three novel intraocular drug delivery systems for combination therapy comprising PLGA polymeric microparticles for the co-delivery of several neuroprotective substances.
2. The multi-loaded microspheres' formulation containing a combination of BDNF and GDNF provides a regenerative ability of the retinal pigment epithelium suggesting a potential usefulness as coadjuvant therapy for age-related macular degeneration.
3. The simultaneous release of three active agents against different therapeutic targets (dexamethasone, melatonin and coenzyme Q10) from multi-loaded microspheres results in a promising neuroprotective strategy for the treatment of multifactorial retinal diseases.
4. The multi-therapy strategy allows the co-incorporation of different drugs into a single microcarrier thereby reducing the amount of biomaterial required for intraocular administration improving not only the tolerance but also the efficacy.
5. The presence of a water-soluble co-solvent in the inner organic phase and a viscosity enhancer in the external aqueous phase during the microencapsulation process can be considered an interesting technological resource to obtain an optimized co-delivery system of biotechnological products such as GDNF and low-molecular-weight drugs such as TUDCA.
6. The combination of GDNF/TUDCA in multi-loaded microspheres allows its simultaneous release in a controlled fashion for at least 91 days presenting as an interesting therapeutic tool for the treatment of multifactorial neurodegenerative diseases of the back of the eye.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (CHMP), COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE. 2008. 'GUIDELINE ON FIXED COMBINATION MEDICINAL PRODUCTS. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/draft-guideline-fixed-combination-medicinal-products-revision-1_en.pdf'.
- (FDA), U.S. Food and Drug Administration. 'Combination Products Guidance Documents. <https://www.fda.gov/CombinationProducts/GuidanceRegulatoryInformation/ucm109110.htm>'.
- Abbate, M., P. Cravedi, I. Iliev, G. Remuzzi, and P. Ruggenenti. 2011. 'Prevention and treatment of diabetic retinopathy: evidence from clinical trials and perspectives', *Curr Diabetes Rev*, 7: 190-200.
- Adcock, I. M. 2000. 'Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions', *Pulm Pharmacol Ther*, 13: 115-26.
- Afarid, M., M. Torabi-Nami, A. Nemati, A. Khosravi, and M. Malekzadeh. 2015. 'Brain-derived neurotrophic factor in patients with advanced age-related macular degeneration', *Int J Ophthalmol*, 8: 991-5.
- Agarwal, A., W. R. Rhoades, M. Hanout, M. K. Soliman, S. Sarwar, M. A. Sadiq, Y. J. Sepah, D. V. Do, and Q. D. Nguyen. 2015. 'Management of neovascular age-related macular degeneration: current state-of-the-art care for optimizing visual outcomes and therapies in development', *Clin Ophthalmol*, 9: 1001-15.
- Age-Related Eye Disease Study Research, Group. 2001. 'A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8', *Arch Ophthalmol*, 119: 1417-36.
- 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: 66-72.
- Aihara, M., M. Adachi, H. Matsuo, T. Togano, T. Fukuchi, N. Sasaki, and J. A. C. Study groupdagger. 2017. 'Additive effects and safety of fixed combination therapy with 1% brinzolamide and 0.5% timolol versus 1% dorzolamide and 0.5% timolol in prostaglandin-treated glaucoma patients', *Acta Ophthalmol*, 95: e720-e26.
- Al-Hussaini, H., J. H. Kam, A. Vugler, M. Semo, and G. Jeffery. 2008. 'Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate in vivo', *Mol Vis*, 14: 1784-91.
- Al Haushey, L., M. A. Bolzinger, C. Bordes, J. Y. Gouvrit, and S. Briancon. 2007. 'Improvement of a bovine serum albumin microencapsulation process by screening design', *Int J Pharm*, 344: 16-25.
- Alayoubi, A., S. Kanthala, S. D. Satyanarayanajois, J. F. Anderson, P. W. Sylvester, and S. Nazzal. 2013. 'Stability and in vitro antiproliferative activity of

- bioactive "Vitamin E" fortified parenteral lipid emulsions', *Colloids Surf B Biointerfaces*, 103: 23-30.
- 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: 34-7.
- 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 Ther*, 138: 155-75.
- Almasieh, M., Y. Zhou, M. E. Kelly, C. Casanova, and A. Di Polo. 2010. 'Structural and functional neuroprotection in glaucoma: role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors', *Cell Death Dis*, 1: e27.
- Alvarez-Lorenzo, Carmen, Soledad Anguiano-Igea, Angela Varela-García, María Vivero-Lopez, and Angel Concheiro. 2019. 'Bioinspired hydrogels for drug-eluting contact lenses', *Acta Biomaterialia*, 84: 49-62.
- Alvarez-Rivera, Fernando, Angel Concheiro, and Carmen Alvarez-Lorenzo. 2018. 'Epalrestat-loaded silicone hydrogels as contact lenses to address diabetic-eye complications', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 122: 126-36.
- Amaral, J. D., R. J. Viana, R. M. Ramalho, C. J. Steer, and C. M. Rodrigues. 2009. 'Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid', *J Lipid Res*, 50: 1721-34.
- Amrite, A. C., H. F. Edelhauser, S. R. Singh, and U. B. Kompella. 2008. 'Effect of circulation on the disposition and ocular tissue distribution of 20 nm nanoparticles after periocular administration', *Mol Vis*, 14: 150-60.
- Anderson, D. R., and A. Hendrickson. 1974. 'Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve', *Invest Ophthalmol*, 13: 771-83.
- Anderson, D. R., and Study Normal Tension Glaucoma. 2003. 'Collaborative normal tension glaucoma study', *Curr Opin Ophthalmol*, 14: 86-90.
- Andrabi, S. A., I. Sayeed, D. Siemen, G. Wolf, and T. F. Horn. 2004. 'Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin', *FASEB J*, 18: 869-71.
- Andres-Guerrero, V., P. Alarma-Estrany, I. T. Molina-Martinez, A. Peral, R. Herrero-Vanrell, and J. Pintor. 2009. 'Ophthalmic formulations of the intraocular hypotensive melatonin agent 5-MCA-NAT', *Exp Eye Res*, 88: 504-11.
- 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, E. M. Del Amo, 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: 105-17.

- 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: 1002-11.
- Antolin, I., B. Obst, S. Burkhardt, and R. Hardeland. 1997. 'Antioxidative protection in a high-melatonin organism: the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin', *J Pineal Res*, 23: 182-90.
- Apolo, A. B., F. H. Karzai, J. B. Trepel, S. Alarcon, S. Lee, M. J. Lee, Y. Tomita, L. Cao, Y. Yu, M. J. Merino, R. A. Madan, H. L. Parnes, S. M. Steinberg, B. W. Rodriguez, B. K. Seon, J. L. Gulley, P. M. Arlen, N. A. Dawson, W. D. Figg, and W. L. Dahut. 2017. 'A Phase II Clinical Trial of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Adults With Advanced/Metastatic Urothelial Carcinoma', *Clin Genitourin Cancer*, 15: 77-85.
- Arias-Alvarez, M., R. M. Garcia-Garcia, J. Lopez-Tello, P. G. Rebollar, A. Gutierrez-Adan, and P. L. Lorenzo. 2018. 'α-Tocopherol modifies the expression of genes related to oxidative stress and apoptosis during invitro maturation and enhances the developmental competence of rabbit oocytes', *Reprod Fertil Dev*.
- Arnold, J. J., C. M. Markey, N. P. Kurstjens, and R. H. Guymer. 2016. 'The role of sub-retinal fluid in determining treatment outcomes in patients with neovascular age-related macular degeneration--a phase IV randomised clinical trial with ranibizumab: the FLUID study', *BMC Ophthalmol*, 16: 31.
- Arranz-Romera, A., B. M. Davis, I. Bravo-Osuna, S. Esteban-Perez, I. T. Molina-Martinez, E. Shamsher, N. Ravindran, L. Guo, M. F. Cordeiro, and R. Herrero-Vanrell. 2019. 'Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma', *J Control Release*, 297: 26-38.
- Arthur, J. S., A. L. Fong, J. M. Dwyer, M. Davare, E. Reese, K. Obrietan, and S. Impey. 2004. 'Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins', *J Neurosci*, 24: 4324-32.
- Asaoka, R., H. Murata, M. Yanagisawa, Y. Fujino, M. Matsuura, T. Inoue, K. Inoue, and J. Yamagami. 2017. 'The association between photoreceptor layer thickness measured by optical coherence tomography and visual sensitivity in glaucomatous eyes', *PLoS One*, 12: e0184064.
- Ashimatey, B. S., B. J. King, and W. H. Swanson. 2018. 'Retinal putative glial alterations: implication for glaucoma care', *Ophthalmic Physiol Opt*, 38: 56-65.
- Atorf, J., M. Scholz, F. Garreis, J. Lehmann, L. Brauer, and J. Kremers. 2013. 'Functional protective effects of long-term memantine treatment in the DBA/2J mouse', *Doc Ophthalmol*, 126: 221-32.

- Augustin, A. J., S. Puls, and I. Offermann. 2007. 'Triple therapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration: verteporfin PDT, bevacizumab, and dexamethasone', *Retina*, 27: 133-40.
- Augustin, S., G. Rimbach, K. Augustin, R. Schliebs, S. Wolfram, and R. Cermak. 2009. 'Effect of a short- and long-term treatment with Ginkgo biloba extract on amyloid precursor protein levels in a transgenic mouse model relevant to Alzheimer's disease', *Arch Biochem Biophys*, 481: 177-82.
- Ayoub, M. A., A. Levoye, P. Delagrangé, and R. Jockers. 2004. 'Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers', *Mol Pharmacol*, 66: 312-21.
- Azzi, A., and A. Stocker. 2000. 'Vitamin E: non-antioxidant roles', *Prog Lipid Res*, 39: 231-55.
- 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: 3374-81.
- Bakall, B., J. C. Folk, H. C. Boldt, E. H. Sohn, E. M. Stone, S. R. Russell, and V. B. Mahajan. 2013. 'Aflibercept therapy for exudative age-related macular degeneration resistant to bevacizumab and ranibizumab', *Am J Ophthalmol*, 156: 15-22 e1.
- 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: 554-66.
- Bangham, A. D., and R. W. Horne. 1964. 'Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope', *J Mol Biol*, 8: 660-8.
- Bangham AD, Hill MW, Miller NG. 1974. 'Preparation and use of liposomes as models of biological membranes.' in Edward D Korn (ed.), *Methods in Membrane Biology* (New York).
- Barac, I. R., M. D. Pop, A. I. Gheorghe, and C. Taban. 2015. 'Neovascular Secondary Glaucoma, Etiology and Pathogenesis', *Rom J Ophthalmol*, 59: 24-8.
- Baranov, P., H. Lin, K. McCabe, D. Gale, S. Cai, B. Lieppman, D. Morrow, P. Lei, J. Liao, and M. Young. 2017. 'A Novel Neuroprotective Small Molecule for Glial Cell Derived Neurotrophic Factor Induction and Photoreceptor Rescue', *J Ocul Pharmacol Ther*.
- 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: 238-45.
- Barde, Y. A., D. Edgar, and H. Thoenen. 1982. 'Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain', *EMBO J*, 1: 549-53.

- 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: 2268-77.
- Bayer, A. U., O. N. Keller, F. Ferrari, and K. P. Maag. 2002. 'Association of glaucoma with neurodegenerative diseases with apoptotic cell death: Alzheimer's disease and Parkinson's disease', *Am J Ophthalmol*, 133: 135-7.
- Beaudoin, D. L., M. Kupershtok, and J. B. Demb. 2017. 'Selective synaptic connections in the retinal pathway for night vision', *J Comp Neurol*.
- Bejjani, R. A., D. BenEzra, H. Cohen, J. Rieger, C. Andrieu, J. C. Jeanny, G. Gollomb, and F. F. Behar-Cohen. 2005. 'Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells', *Mol Vis*, 11: 124-32.
- Bemelmans, A. P., P. Horellou, L. Pradier, I. Brunet, P. Colin, and J. Mallet. 1999. 'Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer', *Hum Gene Ther*, 10: 2987-97.
- Berkelaar, M., D. B. Clarke, Y. C. Wang, G. M. Bray, and A. J. Aguayo. 1994. 'Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats', *J Neurosci*, 14: 4368-74.
- Bhardwaj, M., and A. Kumar. 2016. 'Neuroprotective mechanism of Coenzyme Q10 (CoQ10) against PTZ induced kindling and associated cognitive dysfunction: Possible role of microglia inhibition', *Pharmacol Rep*, 68: 1301-11.
- Bhisitkul, R. B., T. S. Mendes, S. Rofagha, W. Enanoria, D. S. Boyer, S. R. Sadda, and K. Zhang. 2015. 'Macular atrophy progression and 7-year vision outcomes in subjects from the ANCHOR, MARINA, and HORIZON studies: the SEVEN-UP study', *Am J Ophthalmol*, 159: 915-24 e2.
- Bian, F., C. S. Shin, C. Wang, S. C. Pflugfelder, G. Acharya, and C. S. De Paiva. 2016. 'Dexamethasone Drug Eluting Nanowafers Control Inflammation in Alkali-Burned Corneas Associated With Dry Eye', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57: 3222-30.
- Binder, D. K., and H. E. Scharfman. 2004. 'Brain-derived neurotrophic factor', *Growth Factors*, 22: 123-31.
- Birch, D. G., R. G. Weleber, J. L. Duncan, G. J. Jaffe, W. Tao, and Groups Ciliary Neurotrophic Factor Retinitis Pigmentosa Study. 2013. 'Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa', *Am J Ophthalmol*, 156: 283-92 e1.
- Bitounis, D., R. Fanciullino, A. Iliadis, and J. Ciccolini. 2012. 'Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept', *ISRN Pharm*, 2012: 738432.

- 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.
- Blizzard, C., A. Desai, and A. Driscoll. 2016. 'Pharmacokinetic Studies of Sustained-Release Depot of Dexamethasone in Beagle Dogs', *J Ocul Pharmacol Ther*, 32: 595-600.
- Boatright, J. H., A. G. Moring, C. McElroy, M. J. Phillips, V. T. Do, B. Chang, N. L. Hawes, A. P. Boyd, S. S. Sidney, R. E. Stewart, S. C. Minear, R. Chaudhury, V. T. Ciavatta, C. M. Rodrigues, C. J. Steer, J. M. Nickerson, and M. T. Pardue. 2006. 'Tool from ancient pharmacopoeia prevents vision loss', *Mol Vis*, 12: 1706-14.
- Bochot, A., P. Couvreur, and E. Fattal. 2000. 'Intravitreal administration of antisense oligonucleotides: potential of liposomal delivery', *Prog Retin Eye Res*, 19: 131-47.
- Bochot, A., and E. Fattal. 2012. 'Liposomes for intravitreal drug delivery: a state of the art', *J Control Release*, 161: 628-34.
- Bochot, A., E. Fattal, V. Boutet, J. R. Deverre, J. C. Jeanny, H. Chacun, and P. Couvreur. 2002. 'Intravitreal delivery of oligonucleotides by sterically stabilized liposomes', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 253-9.
- Bodmeier, R. and McGinity, J. W. . 1988. 'Solvent selection in the preparation of PLA microspheres prepared by the solvent evaporation method.', *Int. J. Pharm.*, 43: 179-86.
- Bohn, M. C., D. A. Kozlowski, and B. Connor. 2000. 'Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) as a defensive molecule for neurodegenerative disease: a tribute to the studies of antonia vernadakis on neuronal-glia interactions', *Int J Dev Neurosci*, 18: 679-84.
- Bonnefont-Rousselot, D., F. Collin, D. Jore, and M. Gardes-Albert. 2011. 'Reaction mechanism of melatonin oxidation by reactive oxygen species in vitro', *J Pineal Res*, 50: 328-35.
- Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg. 1999. 'Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms', *Science*, 286: 1358-62.
- Borrelli, E., S. Balasubramanian, G. Triolo, P. Barboni, S. R. Sadda, and A. A. Sadun. 2018. 'Topographic Macular Microvascular Changes and Correlation With Visual Loss in Chronic Leber Hereditary Optic Neuropathy', *Am J Ophthalmol*, 192: 217-28.
- Bourges, J. L., C. Bloquel, A. Thomas, F. Froussart, A. Bochot, F. Azan, R. Gurny, D. BenEzra, and F. Behar-Cohen. 2006. 'Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications', *Adv Drug Deliv Rev*, 58: 1182-202.
- Bourges, J. L., S. E. Gautier, F. Delie, R. A. Bejjani, J. C. Jeanny, R. Gurny, D. BenEzra, and F. F. Behar-Cohen. 2003. 'Ocular drug delivery targeting

- the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44: 3562-9.
- Boyer, D. S. 2013. 'Drug Delivery to the Posterior Segment: An Update', *Retina Today*: 52-56.
- Boyer, D. S., U. Schmidt-Erfurth, M. van Lookeren Campagne, E. C. Henry, and C. Brittain. 2017. 'The Pathophysiology of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration and the Complement Pathway as a Therapeutic Target', *Retina*, 37: 819-35.
- Bozzuto, G., and A. Molinari. 2015. 'Liposomes as nanomedical devices', *Int J Nanomedicine*, 10: 975-99.
- Brady, C. J., A. C. Villanti, H. A. Law, E. Rahimy, R. Reddy, P. C. Sieving, S. J. Garg, and J. Tang. 2016. 'Corticosteroid implants for chronic non-infectious uveitis', *Cochrane Database Syst Rev*, 2: CD010469.
- Brar, V. S., R. K. Sharma, R. K. Murthy, and K. V. Chalam. 2010. 'Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells', *Mol Vis*, 16: 1848-53.
- Bravo-Osuna, I., V. Andres-Guerrero, A. Arranz-Romera, S. Esteban-Perez, I. T. Molina-Martinez, and R. Herrero-Vanrell. 2018. 'Microspheres as intraocular therapeutic tools in chronic diseases of the optic nerve and retina', *Adv Drug Deliv Rev*.
- 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: 686-707.
- Bressler, S. B. 2009. 'Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration', *Ophthalmology*, 116: S1-7.
- Brown, D. M., Q. D. Nguyen, D. M. Marcus, D. S. Boyer, S. Patel, L. Feiner, P. G. Schlottmann, A. C. Rundle, J. Zhang, R. G. Rubio, A. P. Adamis, J. S. Ehrlich, J. J. Hopkins, Ride, and Rise Research Group. 2013. 'Long-term outcomes of ranibizumab therapy for diabetic macular edema: the 36-month results from two phase III trials: RISE and RIDE', *Ophthalmology*, 120: 2013-22.
- Brunet, A., S. R. Datta, and M. E. Greenberg. 2001. 'Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway', *Curr Opin Neurobiol*, 11: 297-305.
- Budni, J., T. Bellettini-Santos, F. Mina, M. L. Garcez, and A. I. Zugno. 2015. 'The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease', *Aging Dis*, 6: 331-41.
- Bueno, M. . 1994. *Deficiencia visual: aspectos psicoevolutivos y educativos*.
- Bungenburg de Jong, H. and A. Kaas. 1931. 'Zar Kennetus komplex koazeration, V. Mitteilung: relative verschiebumer im elektrischen gleichstromfeide von fllussigkeitseinschliebungen in komplex-kooazervattropfehen', *Biochem Pharmacol*, Z 232: 338-45.

- C.J. Barnstable, J. Tombran-Tink. 2004. 'Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential', *Prog. Retin. Eye Res.*, 23: 561-77.
- 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: 275-82.
- Cahill, G. M., and J. C. Besharse. 1993. 'Circadian clock functions localized in xenopus retinal photoreceptors', *Neuron*, 10: 573-7.
- Campochiaro, P. A., G. Hafiz, S. M. Shah, S. Bloom, D. M. Brown, M. Busquets, T. Ciulla, L. Feiner, N. Sabates, K. Billman, B. Kapik, K. Green, F. Kane, and Group Famous Study. 2010. 'Sustained ocular delivery of fluocinolone acetonide by an intravitreal insert', *Ophthalmology*, 117: 1393-9 e3.
- Campochiaro, P. A., R. Sophie, J. Pearlman, D. M. Brown, D. S. Boyer, J. S. Heier, D. M. Marcus, L. Feiner, A. Patel, and Retain Study Group. 2014. 'Long-term outcomes in patients with retinal vein occlusion treated with ranibizumab: the RETAIN study', *Ophthalmology*, 121: 209-19.
- Campochiaro, P.A. 2000a. 'Retinal and choroidal neovascularization', *J. Cell. Physiol.*, 184: 301-10.
- . 2000b. 'Retinal and choroidal neovascularization.', *J. Cell. Physiol.* : 301-10.
- Campos, C., N. B. Rocha, E. Lattari, F. Paes, A. E. Nardi, and S. Machado. 2016. 'Exercise-induced neuroprotective effects on neurodegenerative diseases: the key role of trophic factors', *Expert Rev Neurother*, 16: 723-34.
- Cardenas, E., and R. Ghosh. 2013. 'Vitamin E: a dark horse at the crossroad of cancer management', *Biochem Pharmacol*, 86: 845-52.
- 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: 675-7, 79-81.
- Carelli, V., C. La Morgia, F. N. Ross-Cisneros, and A. A. Sadun. 2017. 'Optic neuropathies: the tip of the neurodegeneration iceberg', *Hum Mol Genet*, 26: R139-R50.
- Carmeliet, P., F. De Smet, S. Loges, and M. Mazzone. 2009. 'Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way', *Nat Rev Clin Oncol*, 6: 315-26.
- Carneiro, A., and J. P. Andrade. 2017. 'Nutritional and Lifestyle Interventions for Age-Related Macular Degeneration: A Review', *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 6469138.
- Carrasco Salas, P., C. Palma Milla, J. Lopez Montiel, C. Benito, S. Franco Freire, and J. Lopez Siles. 2016. '[Leber hereditary optic neuropathy: Usefulness of next generation sequencing to study mitochondrial mutations on apparent homoplasmy]', *Med Clin (Barc)*, 146: 163-6.

- Carrion-Garcia, C. J., E. J. Guerra-Hernandez, B. Garcia-Villanova, and E. Molina-Montes. 2017. 'Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) estimated by two different dietary assessment methods and its relationship with NEAC plasma levels', *Eur J Nutr*, 56: 1561-76.
- 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: 791-805.
- Cash, J. G., D. G. Kuhel, J. E. Basford, A. Jaeschke, T. K. Chatterjee, N. L. Weintraub, and D. Y. Hui. 2012. 'Apolipoprotein E4 impairs macrophage efferocytosis and potentiates apoptosis by accelerating endoplasmic reticulum stress', *J Biol Chem*, 287: 27876-84.
- Casson, R. J. 2006. 'Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma', *Clin Exp Ophthalmol*, 34: 54-63.
- Cellerino, A., and K. Kohler. 1997. 'Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina', *J Comp Neurol*, 386: 149-60.
- Chadderton, N., S. Millington-Ward, A. Palfi, M. O'Reilly, G. Tuohy, M. M. Humphries, T. Li, P. Humphries, P. F. Kenna, and G. J. Farrar. 2009. 'Improved retinal function in a mouse model of dominant retinitis pigmentosa following AAV-delivered gene therapy', *Mol Ther*, 17: 593-9.
- Chakravarthy, U., S. P. Harding, C. A. Rogers, S. M. Downes, A. J. Lotery, L. A. Culliford, B. C. Reeves, and Ivan study investigators. 2013. 'Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial', *Lancet*, 382: 1258-67.
- Chang, B., N. L. Hawes, R. E. Hurd, M. T. Davisson, S. Nusinowitz, and J. R. Heckenlively. 2002. 'Retinal degeneration mutants in the mouse', *Vision Res*, 42: 517-25.
- Checa-Casalengua, P., C. Jiang, I. Bravo-Osuna, B. A. Tucker, I. T. Molina-Martinez, 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: 92-100.
- . 2012. 'Preservation of biological activity of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) after microencapsulation and sterilization by gamma irradiation', *Int J Pharm*, 436: 545-54.
- Checa-Casalengua, P., C. Jiang, I. Bravo-Osuna, I. Tucker, B. A. Molina-Martinez, I. T. Young, M. J., Herrero-Vanrell, R. 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: 92-100.
- Checa-Casalengua, Patricia, Caihui Jiang, Irene Bravo-Osuna, Budd A. Tucker, Irene T. Molina-Martínez, Michael J. Young, and Rocío Herrero-Vanrell.

2011. 'Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure', *Journal of Controlled Release*, 156: 92-100.
- Chen, J.L., Chiang, C.H., Yeh, M.K. . 2002. 'The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method', *J. Microencapsul.* , 19: 333-46.
- Chen, S., G. Liu, M. Long, H. Zou, and H. Cui. 2018. 'Alpha lipoic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity via the mitochondrial apoptotic pathways in rat', *J Inorg Biochem*, 184: 19-26.
- Cheung, L. K., and A. Eaton. 2013. 'Age-related macular degeneration', *Pharmacotherapy*, 33: 838-55.
- Cheung, W., L. Guo, and M. F. Cordeiro. 2008. 'Neuroprotection in glaucoma: drug-based approaches', *Optom Vis Sci*, 85: 406-16.
- Chew, E. Y., T. E. Clemons, E. Agron, R. D. Sperduto, J. P. Sangiovanni, N. Kurinij, M. D. Davis, and Group Age-Related Eye Disease Study Research. 2013. 'Long-term effects of vitamins C and E, beta-carotene, and zinc on age-related macular degeneration: AREDS report no. 35', *Ophthalmology*, 120: 1604-11 e4.
- Chichagova, V., D. Hallam, J. Collin, D. Zerti, B. Dorgau, M. Felemban, M. Lako, and D. H. Steel. 2018. 'Cellular regeneration strategies for macular degeneration: past, present and future', *Eye (Lond)*, 32: 946-71.
- Chinsky, N. D., C. G. Besirli, and D. N. Zacks. 2014. 'Retinal cell death and current strategies in retinal neuroprotection', *Curr Opin Ophthalmol*, 25: 228-33.
- Cho, S.W., Song, S.I., Choi, Y.W. 2000. ' Effects of solvent selection and fabrication method on the characteristics of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin. ', *Arch. Pharm. Res*, 23: 385-90.
- Cholkar, K., A. Patel, A. D. Vadlapudi, and A. K. Mitra. 2012. 'Novel Nanomicellar Formulation Approaches for Anterior and Posterior Segment Ocular Drug Delivery', *Recent Pat Nanomed*, 2: 82-95.
- 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: 2219-39.
- Chow, C. K. . 1991. 'Vitamin E and oxidative stress.', *Free Radic. Biol. Med.*, 11: 215-32.
- 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: 279-85.
- Chung, H. S., A. Harris, J. K. Kristinsson, T. A. Ciulla, C. Kagemann, and R. Ritch. 1999. 'Ginkgo biloba extract increases ocular blood flow velocity', *J Ocul Pharmacol Ther*, 15: 233-40.

- clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01944839.
'<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01944839>.'
- Cohen, L. P., and L. R. Pasquale. 2014. 'Clinical characteristics and current treatment of glaucoma', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4.
- Colafrancesco, V., Parisi, V., Sposato, V., Rossi, S., Russo, M.A., Coassin, M., Lambiase, A., Aloe, L. 2010. 'Ocular application of nerve growth factor protects degenerating retinal ganglion cells in a rat model of glaucoma.', *Journal of Glaucoma*.
- Colijn, J. M., G. H. S. Buitendijk, E. Prokofyeva, D. Alves, M. L. Cachulo, A. P. Khawaja, A. Cougnard-Gregoire, B. M. J. Merle, C. Korb, M. G. Erke, A. Bron, E. Anastasopoulos, M. A. Meester-Smoor, T. Segato, S. Piermarocchi, Ptm de Jong, J. R. Vingerling, F. Topouzis, C. Creuzot-Garcher, G. Bertelsen, N. Pfeiffer, A. E. Fletcher, P. J. Foster, R. Silva, J. F. Korobelnik, C. Delcourt, C. C. W. Klaver, Eye-Risk consortium, and consortium European Eye Epidemiology. 2017. 'Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future', *Ophthalmology*, 124: 1753-63.
- Colthurst, M. J., R. L. Williams, P. S. Hiscott, and I. Grierson. 2000. 'Biomaterials used in the posterior segment of the eye', *Biomaterials*, 21: 649-65.
- Conti, B., Bucolo, C., Giannavola, C., Puglisi, G., Giunchedi, P., Conte, U. 1997. 'Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: in vitro/in vivo evaluation.', *Eur. J. Pharm. Sci.*, 5: 287e93.
- Coombes, A. G. ., Yeh, M.-K., Lavelle, E. ., & Davis, S. . 1998. 'The control of protein release from poly(dl-lactide co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in-oil-in water method.', *Journal of Controlled Release*, 52: 311-20.
- Coombes, A. G., M. K. Yeh, E. C. Lavelle, and S. S. Davis. 1998. 'The control of protein release from poly(DL-lactide co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in-oil-in water method', *J Control Release*, 52: 311-20.
- Coronato, S., W. Di Girolamo, M. Salas, O. Spinelli, and G. Laguens. 1999. '[Biology of heat shock proteins]', *Medicina (B Aires)*, 59: 477-86.
- Cosío B.G. , Torrego A. e Adcock I.M. . 2004. 'Mecanismos moleculares de los glucocorticoides', *Arch Bronconeumol.*, 41: 34-41.
- Coursey, T. G., J. T. Henriksson, D. C. Marcano, C. S. Shin, L. C. Isenhardt, F. Ahmed, C. S. De Paiva, S. C. Pflugfelder, and G. Acharya. 2015. 'Dexamethasone nanowafer as an effective therapy for dry eye disease', *J Control Release*, 213: 168-74.
- Cuenca, N., L. Fernandez-Sanchez, 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: 17-75.
- Cuenca, N., L. Fernandez-Sanchez, Y. Sauve, F. J. Segura, G. Martinez-Navarrete, J. M. Tamarit, L. Fuentes-Broto, A. Sanchez-Cano, and I. Pinilla. 2014. 'Correlation between SD-OCT, immunocytochemistry and functional

- findings in an animal model of retinal degeneration', *Front Neuroanat*, 8: 151.
- Cuenca, N., I. Ortuno-Lizaran, and I. Pinilla. 2018. 'Cellular Characterization of OCT and Outer Retinal Bands Using Specific Immunohistochemistry Markers and Clinical Implications', *Ophthalmology*, 125: 407-22.
- Cui, Q., and A. R. Harvey. 2000. 'NT-4/5 reduces cell death in inner nuclear as well as ganglion cell layers in neonatal rat retina', *Neuroreport*, 11: 3921-4.
- Cunningham, C. 2013. 'Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation', *Glia*, 61: 71-90.
- Curran, M. P., and J. S. Orman. 2009. 'Bimatoprost/timolol: a review of its use in glaucoma and ocular hypertension', *Drugs Aging*, 26: 169-84.
- Cvetkovic, R. S., and C. M. Perry. 2003. 'Brinzolamide : a review of its use in the management of primary open-angle glaucoma and ocular hypertension', *Drugs Aging*, 20: 919-47.
- D.F. Martin, M.G. Maguire, S.L. Fine, G. Ying, G.J. Jaffe, et al.,. 2012. 'Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group', *Ophthalmology.*, 119: 1388-98.
- Daiger, S. P., L. S. Sullivan, and S. J. Bowne. 2013. 'Genes and mutations causing retinitis pigmentosa', *Clin Genet*, 84: 132-41.
- Davis, B. M., L. Crawley, M. Pahlitzsch, F. Javaid, and M. F. Cordeiro. 2016. 'Glaucoma: the retina and beyond', *Acta Neuropathol*, 132: 807-26.
- Davis, B. M., L. Guo, J. Brenton, L. Langley, E. M. Normando, and M. F. Cordeiro. 2016. 'Automatic quantitative analysis of experimental primary and secondary retinal neurodegeneration: implications for optic neuropathies', *Cell Death Discov*, 2: 16031.
- Davis, B. M., M. Pahlitzsch, L. Guo, S. Balendra, P. Shah, N. Ravindran, G. Malaguarnera, C. Sisa, E. Shamsher, H. Hamze, A. Noor, A. Sornsute, S. Somavarapu, and M. F. Cordeiro. 2018. 'Topical Curcumin Nanocarriers are Neuroprotective in Eye Disease', *Sci Rep*, 8: 11066.
- Davis, B. M., K. Tian, M. Pahlitzsch, J. Brenton, N. Ravindran, G. Butt, G. Malaguarnera, E. M. Normando, L. Guo, and M. F. Cordeiro. 2017. 'Topical Coenzyme Q10 demonstrates mitochondrial-mediated neuroprotection in a rodent model of ocular hypertension', *Mitochondrion*, 36: 114-23.
- de Andrade, F. L., F. S. Lopes, G. C. de Andrade, T. S. Prata, and A. Maia. 2016. 'Simultaneous Therapy with Intravitreal Dexamethasone Implant and Bevacizumab for the Treatment of Macular Edema', *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*, 5: 4-9.
- Dehdashtian, E., S. Mehrzadi, B. Yousefi, A. Hosseinzadeh, R. J. Reiter, M. Safa, H. Ghaznavi, and M. Naseripour. 2018. 'Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress', *Life Sci*, 193: 20-33.

- 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 Pde6brd1 mouse model of retinal degeneration', *Glia*, 59: 821-32.
- Delyfer, M. N., V. Forster, N. Neveux, S. Picaud, T. Leveillard, and J. A. Sahel. 2005. 'Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina', *Mol Vis*, 11: 688-96.
- Deobhakta, A., and L. K. Chang. 2013. 'Inflammation in retinal vein occlusion', *Int J Inflam*, 2013: 438412.
- Derrickson, GERARD J. Tortora; BRYAN. 2013. *PRINCIPIOS DE ANATOMIA Y FISILOGIA (PANAMERICANA)*.
- Di Polo, A., L. Cheng, G. M. Bray, and A. J. Aguayo. 2000. 'Colocalization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 4014-21.
- Dibas, A., M. H. Yang, S. He, J. Bobich, and T. Yorio. 2008. 'Changes in ocular aquaporin-4 (AQP4) expression following retinal injury', *Mol Vis*, 14: 1770-83.
- Diebold, Y., and M. Calonge. 2010. 'Applications of nanoparticles in ophthalmology', *Prog Retin Eye Res*, 29: 596-609.
- Dionisio, P. A., J. D. Amaral, M. F. Ribeiro, A. C. Lo, R. D'Hooge, and C. M. Rodrigues. 2015. 'Amyloid-beta pathology is attenuated by tauroursodeoxycholic acid treatment in APP/PS1 mice after disease onset', *Neurobiol Aging*, 36: 228-40.
- Do, D. V., Q. D. Nguyen, D. Boyer, U. Schmidt-Erfurth, D. M. Brown, R. Vitti, A. J. Berliner, B. Gao, O. Zeitz, R. Ruckert, T. Schmelter, R. Sandbrink, J. S. Heier, and Group da Vinci Study. 2012. 'One-year outcomes of the da Vinci Study of VEGF Trap-Eye in eyes with diabetic macular edema', *Ophthalmology*, 119: 1658-65.
- Doble, A. 1999. 'The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy', *Pharmacol Ther*, 81: 163-221.
- 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: e115579.
- Dong, C. J., Y. Guo, P. Agey, L. Wheeler, and W. A. Hare. 2008. 'Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49: 4515-22.
- Dong, X., W. Shi, G. Yuan, L. Xie, S. Wang, and P. Lin. 2006. 'Intravitreal implantation of the biodegradable cyclosporin A drug delivery system for experimental chronic uveitis', *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 244: 492-7.
- Doonan, F., and T. G. Cotter. 2004. 'Apoptosis: a potential therapeutic target for retinal degenerations', *Curr Neurovasc Res*, 1: 41-53.

- Dorati, R., I. Genta, L. Montanari, F. Cilurzo, A. Buttafava, A. Faucitano, and B. Conti. 2005. 'The effect of gamma-irradiation on PLGA/PEG microspheres containing ovalbumin', *J Control Release*, 107: 78-90.
- Dorati, R., Genta, I., Tomasi, C., Modena, T., Colonna, C., Pavanetto, F., Perugini, B., Conti, B. 2008. 'Polyethyleneglycol-co-poly-D,L-lactide copolymer based microspheres: preparation, characterization and delivery of a model protein. ', *J. Microencapsul.*, 25: 330-38.
- Drew, P. D., and J. A. Chavis. 2000. 'Inhibition of microglial cell activation by cortisol', *Brain Res Bull*, 52: 391-6.
- Dreyfuss, J. L., C. V. Regatieri, T. R. Jarrouge, R. P. Cavalheiro, L. O. Sampaio, and H. B. Nader. 2009. 'Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling', *An Acad Bras Cienc*, 81: 409-29.
- Dugel, P. U., F. Bandello, and A. Loewenstein. 2015. 'Dexamethasone intravitreal implant in the treatment of diabetic macular edema', *Clin Ophthalmol*, 9: 1321-35.
- Dunn, E. N., S. M. Hariprasad, and V. S. Sheth. 2017. 'An Overview of the Fovista and Rinucumab Trials and the Fate of Anti-PDGF Medications', *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, 48: 100-04.
- 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: 264-74.
- E.M., Cohen. 1973. ' Dexamethasone.' in K. Florey. (ed.), *Analytical Profile of Drug Substances* (Academic Press: New York).
- 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: 5901-10.
- el-Asrar, A.M., Morse, P.H., Maimone, D., Torczynski, E., Reder, A.T. 1992. 'MK-801 protects retinal neurons from hypoxia and the toxicity of glutamate and aspartate. ', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 33: 3463-68.
- El Zaoui, I., F. Behar-Cohen, and A. Torriglia. 2015. 'Glucocorticoids exert direct toxicity on microvasculature: analysis of cell death mechanisms', *Toxicol Sci*, 143: 441-53.
- Eljarrat-Binstock, E., J. Pe'er, and A. J. Domb. 2010. 'New techniques for drug delivery to the posterior eye segment', *Pharm Res*, 27: 530-43.
- Engin, K. N. 2009. 'Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant', *Mol Vis*, 15: 855-60.
- Eto, T., and R. K. Tompkins. 1985. 'Inhibition of pepsin activity by ursodeoxycholic acids and chenodeoxycholic acids', *Am J Surg*, 150: 564-7.
- 'European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 4th Edition - Chapter 3: Treatment principles and options Supported by the

- EGS Foundation: Part 1: Foreword; Introduction; Glossary; Chapter 3 Treatment principles and options'. 2017. *Br J Ophthalmol*, 101: 130-95.
- Evans, J. R. 2013. 'Ginkgo biloba extract for age-related macular degeneration', *Cochrane Database Syst Rev*: CD001775.
- Evans, J. R., and J. G. Lawrenson. 2017. 'Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration', *Cochrane Database Syst Rev*, 7: CD000254.
- Fahim, A. 2018. 'Retinitis pigmentosa: recent advances and future directions in diagnosis and management', *Curr Opin Pediatr*.
- Fan, W., R. Crawford, and Y. Xiao. 2011. 'The ratio of VEGF/PEDF expression in bone marrow mesenchymal stem cells regulates neovascularization', *Differentiation*, 81: 181-91.
- Farboud, E. S., S. A. Nasrollahi, and Z. Tabbakhi. 2011. 'Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies', *Int J Nanomedicine*, 6: 611-7.
- Farjo, R., J. Skaggs, A. B. Quiambao, M. J. Cooper, and M. I. Naash. 2006. 'Efficient non-viral ocular gene transfer with compacted DNA nanoparticles', *PLoS One*, 1: e38.
- Fernandez-Araque, A., A. Giaquinta Aranda, C. Laudo Pardo, and A. Rojo Aragues. 2017. 'The antioxidants in the process of ocular pathology', *Nutr Hosp*, 34: 469-78.
- Fernandez-Robredo, P., D. Moya, J. A. Rodriguez, and A. Garcia-Layana. 2005. 'Vitamins C and e reduce retinal oxidative stress and nitric oxide metabolites and prevent ultrastructural alterations in porcine hypercholesterolemia', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 1140-6.
- Fernandez-Sanchez, L., I. Bravo-Osuna, P. Lax, A. Arranz-Romera, V. Maneu, S. Esteban-Perez, I. Pinilla, M. D. M. Puebla-Gonzalez, R. Herrero-Vanrell, and N. Cuenca. 2017. 'Controlled delivery of tauroursodeoxycholic acid from biodegradable microspheres slows retinal degeneration and vision loss in P23H rats', *PLoS One*, 12: e0177998.
- Fernandez-Sanchez, L., G. Esquiva, I. Pinilla, P. Lax, and N. Cuenca. 2018. 'Retinal Vascular Degeneration in the Transgenic P23H Rat Model of Retinitis Pigmentosa', *Front Neuroanat*, 12: 55.
- Fernandez-Sanchez, L., P. Lax, G. Esquiva, J. Martin-Nieto, I. Pinilla, and N. Cuenca. 2012. 'Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats', *PLoS One*, 7: e43074.
- Fernandez-Sanchez, L., P. Lax, C. Isiegas, E. Ayuso, J. M. Ruiz, P. de la Villa, F. Bosch, E. J. de la Rosa, and N. Cuenca. 2012. 'Proinsulin slows retinal degeneration and vision loss in the P23H rat model of retinitis pigmentosa', *Hum Gene Ther*, 23: 1290-300.
- Fernandez-Sanchez, L., P. Lax, A. Noailles, A. Angulo, V. Maneu, and N. Cuenca. 2015. 'Natural Compounds from Saffron and Bear Bile Prevent Vision Loss and Retinal Degeneration', *Molecules*, 20: 13875-93.

- Fernandez-Sanchez, L., P. Lax, I. Pinilla, J. Martin-Nieto, and N. Cuenca. 2011. 'Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52: 4998-5008.
- Finkel, T., and N. J. Holbrook. 2000. 'Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing', *Nature*, 408: 239-47.
- Finsterer, J., M. Mancuso, D. Pareyson, J. M. Burgunder, and T. Klopstock. 2018. 'Mitochondrial disorders of the retinal ganglion cells and the optic nerve', *Mitochondrion*, 42: 1-10.
- Fix, A.S., Horn, J.W., Wightman, K.A., Johnson, C.A., Long, G.G., Storts, R.W., Farber, N., Wozniak, D.F., Olney, J.W. 1993. 'Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(p)801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex.', *Experimental Neurology*, 123: 204-15.
- Flaxman, S. R., R. R. A. Bourne, S. Resnikoff, P. Ackland, T. Braithwaite, M. V. Cicinelli, A. Das, J. B. Jonas, J. Keeffe, J. H. Kempen, J. Leasher, H. Limburg, K. Naidoo, K. Pesudovs, A. Silvester, G. A. Stevens, N. Tahhan, T. Y. Wong, H. R. Taylor, and Study Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease. 2017. 'Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis', *Lancet Glob Health*, 5: e1221-e34.
- Ford, K. M., M. Saint-Geniez, T. Walshe, A. Zahr, and P. A. D'Amore. 2011. 'Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52: 9478-87.
- Forsmark-Andree, P., C. P. Lee, G. Dallner, and L. Ernster. 1997. 'Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles', *Free Radic Biol Med*, 22: 391-400.
- Frank, R. N. 2015. 'Diabetic retinopathy and systemic factors', *Middle East Afr J Ophthalmol*, 22: 151-6.
- 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: 2724-34.
- Fritsche, L. G., W. Chen, M. Schu, B. L. Yaspan, Y. Yu, G. Thorleifsson, D. J. Zack, S. Arakawa, V. Cipriani, S. Ripke, R. P. Igo, Jr., G. H. Buitendijk, X. Sim, D. E. Weeks, R. H. Guymer, J. E. Merriam, P. J. Francis, G. Hannum, A. Agarwal, A. M. Armbrecht, I. Audo, T. Aung, G. R. Barile, M. Benchaboune, A. C. Bird, P. N. Bishop, K. E. Branham, M. Brooks, A. J. Brucker, W. H. Cade, M. S. Cain, P. A. Campochiaro, C. C. Chan, C. Y. Cheng, E. Y. Chew, K. A. Chin, I. Chowers, D. G. Clayton, R. Cojocar, Y. P. Conley, B. K. Cornes, M. J. Daly, B. Dhillon, A. O. Edwards, E. Evangelou, J. Fagerness, H. A. Ferreyra, J. S. Friedman, A. Geirsdottir, R. J. George, C. Gieger, N. Gupta, S. A. Hagstrom, S. P. Harding, C. Haritoglou, J. R. Heckenlively, F. G. Holz, G. Hughes, J. P. Ioannidis, T.

- Ishibashi, P. Joseph, G. Jun, Y. Kamatani, N. Katsanis, N. Keilhauer C, J. C. Khan, I. K. Kim, Y. Kiyohara, B. E. Klein, R. Klein, J. L. Kovach, I. Kozak, C. J. Lee, K. E. Lee, P. Lichtner, A. J. Lotery, T. Meitinger, P. Mitchell, S. Mohand-Said, A. T. Moore, D. J. Morgan, M. A. Morrison, C. E. Myers, A. C. Naj, Y. Nakamura, Y. Okada, A. Orlin, M. C. Ortube, M. I. Othman, C. Pappas, K. H. Park, G. J. Pauer, N. S. Peachey, O. Poch, R. R. Priya, R. Reynolds, A. J. Richardson, R. Ripp, G. Rudolph, E. Ryu, J. A. Sahel, D. A. Schaumberg, H. P. Scholl, S. G. Schwartz, W. K. Scott, H. Shahid, H. Sigurdsson, G. Silvestri, T. A. Sivakumaran, R. T. Smith, L. Sobrin, E. H. Souied, D. E. Stambolian, H. Stefansson, G. M. Sturgill-Short, A. Takahashi, N. Tosakulwong, B. J. Truitt, E. E. Tsiroli, A. G. Uitterlinden, C. M. van Duijn, L. Vijaya, J. R. Vingerling, E. N. Vithana, A. R. Webster, H. E. Wichmann, T. W. Winkler, T. Y. Wong, A. F. Wright, D. Zelenika, M. Zhang, L. Zhao, K. Zhang, M. L. Klein, G. S. Hageman, G. M. Lathrop, K. Stefansson, R. Allikmets, P. N. Baird, M. B. Gorin, J. J. Wang, C. C. Klaver, J. M. Seddon, M. A. Pericak-Vance, S. K. Iyengar, J. R. Yates, A. Swaroop, B. H. Weber, M. Kubo, M. M. Deangelis, T. Leveillard, U. Thorsteinsdottir, J. L. Haines, L. A. Farrer, I. M. Heid, G. R. Abecasis, and A. M. D. Gene Consortium. 2013. 'Seven new loci associated with age-related macular degeneration', *Nat Genet*, 45: 433-9, 39e1-2.
- G. de Rezende Corrêa, V.H.P. Soares, L. de Araújo-Martins, A.A. Dos Santos, E. Giestal-de-Araujo. 2015. 'Ouabain and BDNF Crosstalk on Ganglion Cell Survival in Mixed Retinal Cell Cultures.', *Cell. Mol. Neurobiol*, 35: 651-60.
- G.G. Giordano, P. Chevez-Barrios, M.F. Refojo, C.A. Garcia. 1995. 'Biodegradation and tissue reaction to intravitreal biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microspheres', *Curr. Eye Res.*, 14: 761-8.
- Gabelt, B. T., C. A. Rasmussen, O. Y. Tektas, C. B. Kim, J. C. Peterson, T. M. Nork, J. N. Ver Hoeve, E. Lutjen-Drecoll, and P. L. Kaufman. 2012. 'Structure/function studies and the effects of memantine in monkeys with experimental glaucoma', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53: 2368-76.
- 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: 6551-9.
- Galindo-Romero, C., F. J. Valiente-Soriano, M. Jimenez-Lopez, D. Garcia-Ayuso, M. P. Villegas-Perez, M. Vidal-Sanz, and M. Agudo-Barriuso. 2013. 'Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54: 974-85.
- Galkin, I., O. Y. Pletjushkina, R. A. Zinovkin, V. V. Zakharova, I. S. Birjukov, B. V. Chernyak, and E. N. Popova. 2014. 'Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF α -induced endothelial cell damage', *Biochemistry (Mosc)*, 79: 124-30.
- Garbayo, E., C. N. Montero-Menei, E. Ansorena, J. L. Lanciego, M. S. Aymerich, and M. J. Blanco-Prieto. 2009. 'Effective GDNF brain delivery using

- microspheres--a promising strategy for Parkinson's disease', *J Control Release*, 135: 119-26.
- García-Caballero C., Lieppman B., Arranz-Romera A., Molina-Martínez I.T., Bravo-Osuna I., Young M., Baranov P., Herrero-Vanrell R. 2018. 'Photoreceptor preservation induced by intravitreal controlled delivery of GDNF and GDNF/melatonin in rhodopsin knockout mice', *Molecular Vision*, 24: 733-45
- García-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*, 103: 19-26.
- García-García, L., S. Recalde, M. Hernandez, J. Bezunartea, J. R. Rodríguez-Madoz, S. Johnen, S. Diarra, C. Marie, Z. Izsvak, Z. Ivics, D. Scherman, M. Kropp, G. Thumann, F. Prosper, P. Fernandez-Robredo, and A. Garcia-Layana. 2017. 'Long-Term PEDF Release in Rat Iris and Retinal Epithelial Cells after Sleeping Beauty Transposon-Mediated Gene Delivery', *Mol Ther Nucleic Acids*, 9: 1-11.
- García, T. B., M. Hollborn, and A. Bringmann. 2017. 'Expression and signaling of NGF in the healthy and injured retina', *Cytokine Growth Factor Rev*, 34: 43-57.
- Gargini, C., E. Terzibasí, F. Mazzoni, and E. Strettoi. 2007. 'Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study', *J Comp Neurol*, 500: 222-38.
- Gaspar, J. M., A. Martins, R. Cruz, C. M. Rodrigues, A. F. Ambrosio, and A. R. Santiago. 2013. 'Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose', *Neuroscience*, 253: 380-8.
- Gass, J. D. 1973. 'Drusen and disciform macular detachment and degeneration', *Arch Ophthalmol*, 90: 206-17.
- Gaudana, R., J. Jwala, S. H. Boddu, and A. K. Mitra. 2009. 'Recent perspectives in ocular drug delivery', *Pharm Res*, 26: 1197-216.
- Gerding, H., J. Mones, R. Tadayoni, F. Boscia, I. Pearce, and S. Priglinger. 2015. 'Ranibizumab in retinal vein occlusion: treatment recommendations by an expert panel', *Br J Ophthalmol*, 99: 297-304.
- Geroski, D. H., and H. F. Edelhauser. 2000. 'Drug delivery for posterior segment eye disease', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 961-4.
- . 2001. 'Transscleral drug delivery for posterior segment disease', *Adv Drug Deliv Rev*, 52: 37-48.
- Gerriets, T., E. Stolz, M. Walberer, M. Kaps, G. Bachmann, and M. Fisher. 2003. 'Neuroprotective effects of MK-801 in different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion: adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance', *Stroke*, 34: 2234-9.

- Ghaffariyeh, A., N. Honarpisheh, M. H. Heidari, S. Puyan, and F. Abasov. 2011. 'Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker in primary open-angle glaucoma', *Optom Vis Sci*, 88: 80-5.
- Ghaffariyeh, A., N. Honarpisheh, Y. Shakiba, S. Puyan, T. Chamacham, F. Zahedi, and M. Zarrineghbal. 2009. 'Brain-derived neurotrophic factor in patients with normal-tension glaucoma', *Optometry*, 80: 635-8.
- Ghanbari, H., F. Kianersi, S. A. Sonbolestan, M. A. Abtahi, M. Akbari, Z. A. Abtahi, and S. H. Abtahi. 2017. 'Intravitreal Diclofenac plus Bevacizumab versus Bevacizumab alone in treatment-naive diabetic macular edema: a randomized double-blind clinical trial', *Int Ophthalmol*, 37: 867-74.
- Gillies, M. C., L. L. Lim, A. Campain, G. J. Quin, W. Salem, J. Li, S. Goodwin, C. Aroney, I. L. McAllister, and S. Fraser-Bell. 2014. 'A randomized clinical trial of intravitreal bevacizumab versus intravitreal dexamethasone for diabetic macular edema: the BEVORDEX study', *Ophthalmology*, 121: 2473-81.
- 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: 2743-51.
- Goldblum, D., Kipfer-Kauer, A., Sarra, G.M., Wolf, S., Frueh, B.E. . 2007. 'Distribution of amyloid precursor protein and amyloid-beta immunoreactivity in DBA/2J glaucomatous mouse retinas.', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48: 5085-90.
- Gong, J., A. Jellali, J. Mutterer, J. A. Sahel, A. Rendon, and S. Picaud. 2006. 'Distribution of vesicular glutamate transporters in rat and human retina', *Brain Res*, 1082: 73-85.
- Gragg, M., and P. S. Park. 2018. 'Misfolded rhodopsin mutants display variable aggregation properties', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864: 2938-48.
- Gray, J. M., H. O. Orlans, M. Shanks, P. Clouston, and R. E. MacLaren. 2018. 'Slowly progressive retinitis pigmentosa caused by two novel mutations in the MAK gene', *Ophthalmic Genet*, 39: 508-11.
- 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: P35-42.
- Gross, R. L., S. H. Hensley, F. Gao, and S. M. Wu. 1999. 'Retinal ganglion cell dysfunction induced by hypoxia and glutamate: potential neuroprotective effects of beta-blockers', *Surv Ophthalmol*, 43 Suppl 1: S162-70.
- Guler, E., Y. Totan, and F. Betul Guragac. 2017. 'Intravitreal bevacizumab and dexamethasone implant for treatment of chronic diabetic macular edema', *Cutan Ocul Toxicol*, 36: 180-84.
- 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: 13444-9.

- Guo, L., T. E. Salt, A. Maass, V. Luong, S. E. Moss, F. W. Fitzke, and M. F. Cordeiro. 2006. 'Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47: 626-33.
- Gupta, V., Y. You, J. Li, V. Gupta, M. Golzan, A. Klistorner, M. van den Buuse, and S. Graham. 2014. 'BDNF impairment is associated with age-related changes in the inner retina and exacerbates experimental glaucoma', *Biochim Biophys Acta*, 1842: 1567-78.
- Güven Yılmaz, S., C. Degirmenci, Y. E. Karakoyun, E. Yusifov, and H. Ates. 2018. 'The efficacy and safety of bimatoprost/timolol maleate, latanoprost/timolol maleate, and travoprost/timolol maleate fixed combinations on 24-h IOP', *Int Ophthalmol*, 38: 1425-31.
- Hackett, S. F., Z. Friedman, J. Freund, C. Schoenfeld, R. Curtis, P. S. DiStefano, and P. A. Campochiaro. 1998. 'A splice variant of trkB and brain-derived neurotrophic factor are co-expressed in retinal pigmented epithelial cells and promote differentiated characteristics', *Brain Res*, 789: 201-12.
- Hadayer, A., and S. Schaal. 2016. 'Delivery of steroids into the eye for the treatment of macular edema', *Expert Opin Drug Deliv*, 13: 1083-91.
- Hall, J.E. 2011. *GUYTON Y HALL. TRATADO DE FISIOLOGÍA MÉDICA + STUDENTCONSULT* (S.A. ELSEVIER ESPAÑA).
- Hammond, B. R., Jr., and L. M. Fletcher. 2012. 'Influence of the dietary carotenoids lutein and zeaxanthin on visual performance: application to baseball', *Am J Clin Nutr*, 96: 1207S-13S.
- Han, Y., H. Tian, P. He, X. Chen, and X. Jing. 2009. 'Insulin nanoparticle preparation and encapsulation into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres by using an anhydrous system', *Int J Pharm*, 378: 159-66.
- 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: 16799-805.
- Hansen, M. V., A. K. Danielsen, I. Hageman, J. Rosenberg, and I. Gogenur. 2014. 'The therapeutic or prophylactic effect of exogenous melatonin against depression and depressive symptoms: a systematic review and meta-analysis', *Eur Neuropsychopharmacol*, 24: 1719-28.
- Hardy, J. R., E. Rees, J. Ling, R. Burman, D. Feuer, K. Broadley, and P. Stone. 2001. 'A prospective survey of the use of dexamethasone on a palliative care unit', *Palliat Med*, 15: 3-8.
- Hargreaves, I. P. 2014. 'Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease', *Int J Biochem Cell Biol*, 49: 105-11.
- Harper, M. M., S. D. Grozdanic, B. Blits, M. H. Kuehn, D. Zamzow, J. E. Buss, R. H. Kardon, and D. S. Sakaguchi. 2011. 'Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52: 4506-15.

- 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: 633-9.
- 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: 2746-57.
- Hayreh, S.S., March, W., Anderson, D.R. 1979. 'Pathogenesis of block of rapid orthograde axonal transport by elevated intraocular pressure', *Experimental Eye Research*, 28: 515-23.
- He, C., Z. Tang, H. Tian, and X. Chen. 2016. 'Co-delivery of chemotherapeutics and proteins for synergistic therapy', *Adv Drug Deliv Rev*, 98: 64-76.
- He, Y., Liu, Y., Wang, J., Zhang, X., Lu, W., Ma, Z., Zhu, X., Zhang, Q. 2006. 'Cyclosporine-loaded microspheres for treatment of uveitis: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetic study', *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47: 3983-88.
- He, Y., Y. Zhang, and G. Su. 2015. 'Recent advances in treatment of retinitis pigmentosa', *Curr Stem Cell Res Ther*, 10: 258-65.
- Heier, J. S., P. A. Campochiaro, L. Yau, Z. Li, N. Saroj, R. G. Rubio, and P. Lai. 2012. 'Ranibizumab for macular edema due to retinal vein occlusions: long-term follow-up in the HORIZON trial', *Ophthalmology*, 119: 802-9.
- Hendrick, A. M., M. V. Gibson, and A. Kulshreshtha. 2015. 'Diabetic Retinopathy', *Prim Care*, 42: 451-64.
- Heng, L. Z., O. Comyn, T. Peto, C. Tadros, E. Ng, S. Sivaprasad, and P. G. Hykin. 2013. 'Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments', *Diabet Med*, 30: 640-50.
- Hernandez-Bel, L., E. Cervera-Taulet, C. Navarro-Palop, V. Castro-Navarro, C. Chiarri-Toumit, and J. Montero-Hernandez. 2018. 'Sequential Dexamethasone and Aflibercept Treatment in Patients with Diabetic Macular Edema: Structural and Functional Outcomes at 52 Weeks', *Ophthalmologica*: 1-7.
- Hernandez-Camacho, J. D., M. Bernier, G. Lopez-Lluch, and P. Navas. 2018. 'Coenzyme Q10 Supplementation in Aging and Disease', *Front Physiol*, 9: 44.
- 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.
- Herrero-Vanrell, R., J. A. Cardillo, and B. D. Kuppermann. 2011. 'Clinical applications of the sustained-release dexamethasone implant for treatment of macular edema', *Clin Ophthalmol*, 5: 139-46.
- Herrero-Vanrell, R., and M. F. Refojo. 2001. 'Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery', *Adv Drug Deliv Rev*, 52: 5-16.
- 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: 153-7.
- Holden, C. A., P. Tyagi, A. Thakur, R. Kadam, G. Jadhav, U. B. Kompella, and H. Yang. 2012. 'Polyamidoamine dendrimer hydrogel for enhanced delivery of antiglaucoma drugs', *Nanomedicine*, 8: 776-83.
- Hollo, G., F. Topouzis, and R. D. Fechtner. 2014. 'Fixed-combination intraocular pressure-lowering therapy for glaucoma and ocular hypertension: advantages in clinical practice', *Expert Opin Pharmacother*, 15: 1737-47.
- Hollo, G., J. Vuorinen, J. Tuominen, T. Huttunen, A. Ropo, and N. Pfeiffer. 2014. 'Fixed-dose combination of tafluprost and timolol in the treatment of open-angle glaucoma and ocular hypertension: comparison with other fixed-combination products', *Adv Ther*, 31: 932-44.
- Hommer, A., D. A. Hubatsch, and J. Cano-Parra. 2015. 'Safety and Efficacy of Adding Fixed-Combination Brinzolamide/Timolol Maleate to Prostaglandin Therapy for Treatment of Ocular Hypertension or Glaucoma', *J Ophthalmol*, 2015: 131970.
- Honda, M., T. Asai, N. Oku, Y. Araki, M. Tanaka, and N. Ebihara. 2013. 'Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets', *Int J Nanomedicine*, 8: 495-503.
- Hosta-Rigau, L., Y. Zhang, B. M. Teo, A. Postma, and B. Stadler. 2013. 'Cholesterol--a biological compound as a building block in bionanotechnology', *Nanoscale*, 5: 89-109.
- Hsu, K. H., B. E. Carbia, C. Plummer, and A. Chauhan. 2015. 'Dual drug delivery from vitamin E loaded contact lenses for glaucoma therapy', *Eur J Pharm Biopharm*, 94: 312-21.
- Huang, X., and C. S. Brazel. 2001. 'On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems', *J Control Release*, 73: 121-36.
- Huete-Toral, F., A. Crooke, A. Martinez-Aguila, and J. Pintor. 2015. 'Melatonin receptors trigger cAMP production and inhibit chloride movements in nonpigmented ciliary epithelial cells', *J Pharmacol Exp Ther*, 352: 119-28.
- Hui, A. 2017. 'Contact lenses for ophthalmic drug delivery', *Clin Exp Optom*, 100: 494-512.
- Hui, J. O., G. Woo, D. T. Chow, V. Katta, T. Osslund, and M. Haniu. 1999. 'The intermolecular disulfide bridge of human glial cell line-derived neurotrophic factor: its selective reduction and biological activity of the modified protein', *J Protein Chem*, 18: 585-93.
- 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: 365-74.
- Igartua, M., Hernandez, R. M., Esquisabel, A., Gascon, A. R., Calvo, M. B., and Pedraz, J. L. 1997. 'Influence of formulation variables on the in vitro

- release of albumin from biodegradable microparticulate systems', *J. Microencapsulation*, 14: 349-56.
- Inana, G., C. Murat, W. An, X. Yao, I. R. Harris, and J. Cao. 2018. 'RPE phagocytic function declines in age-related macular degeneration and is rescued by human umbilical tissue derived cells', *J Transl Med*, 16: 63.
- Inanc Tekin, M., M. A. Sekeroglu, C. Demirtas, K. Tekin, S. Doguizi, S. Bayraktar, and P. Yilmazbas. 2018. 'Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients With Age-Related Macular Degeneration and Its Correlation With Retinal Layer Thicknesses', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 59: 2833-40.
- Ishii, Y., J. M. Kwong, and J. Caprioli. 2003. 'Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44: 1982-92.
- Ito, F., H. Fujimori, and K. Makino. 2007. 'Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres', *Colloids Surf B Biointerfaces*, 54: 173-8.
- Ito, K., K. F. Chung, and I. M. Adcock. 2006. 'Update on glucocorticoid action and resistance', *J Allergy Clin Immunol*, 117: 522-43.
- Jaffe, G. J., T. A. Ciulla, A. P. Ciardella, F. Devin, P. U. Dugel, C. M. Eandi, H. Masonson, J. Mones, J. A. Pearlman, M. Quaranta-El Maftouhi, F. Ricci, K. Westby, and S. C. Patel. 2017. 'Dual Antagonism of PDGF and VEGF in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Phase IIb, Multicenter, Randomized Controlled Trial', *Ophthalmology*, 124: 224-34.
- Jaffe, G. J., D. Martin, D. Callanan, P. A. Pearson, B. Levy, T. Comstock, and Group Fluocinolone Acetonide Uveitis Study. 2006. 'Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis: thirty-four-week results of a multicenter randomized clinical study', *Ophthalmology*, 113: 1020-7.
- Jager, R. D., L. P. Aiello, S. C. Patel, and E. T. Cunningham, Jr. 2004. 'Risks of intravitreal injection: a comprehensive review', *Retina*, 24: 676-98.
- Jain, K. K. 2014. 'Current status and future prospects of drug delivery systems', *Methods Mol Biol*, 1141: 1-56.
- Janoria, K. G., S. Gunda, S. H. Boddu, and A. K. Mitra. 2007. 'Novel approaches to retinal drug delivery', *Expert Opin Drug Deliv*, 4: 371-88.
- Jeffery, H., S. S. Davis, and D. T. O'Hagan. 1993. 'The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique', *Pharm Res*, 10: 362-8.
- Jeyanthi, R., Mehta, R. C., Thanoo, B. C., and DeLuca, P. P. . 1997. 'Effect of processing parameters on the properties of peptide containing PLGA microspheres', *J. Microencapsulation*, 14: 163-74.
- 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: 1783-92.
- Jiang, S., Y. L. Franco, Y. Zhou, and J. Chen. 2018. 'Nanotechnology in retinal drug delivery', *Int J Ophthalmol*, 11: 1038-44.

- Jing, L., M. T. He, Y. Chang, S. L. Mehta, Q. P. He, J. Z. Zhang, and P. A. Li. 2015. 'Coenzyme Q10 protects astrocytes from ROS-induced damage through inhibition of mitochondria-mediated cell death pathway', *Int J Biol Sci*, 11: 59-66.
- 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: 1113-24.
- Jing, S., Y. Yu, M. Fang, Z. Hu, P. L. Holst, T. Boone, J. Delaney, H. Schultz, R. Zhou, and G. M. Fox. 1997. 'GFRalpha-2 and GFRalpha-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family', *J Biol Chem*, 272: 33111-7.
- 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: 946-54.
- Jo, D. H., J. H. Kim, W. Yang, H. Kim, S. Chang, D. Kim, M. Chang, K. Lee, J. Chung, and J. H. Kim. 2017. 'Anti-complement component 5 antibody targeting MG4 domain inhibits choroidal neovascularization', *Oncotarget*, 8: 45506-16.
- Jockers, R., P. Maurice, J. A. Boutin, and P. Delagrèe. 2008. 'Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?', *Br J Pharmacol*, 154: 1182-95.
- Johnsen-Soriano, S., J. M. Genoves, B. Romero, S. Garcia-Delpech, M. Muriach, M. Sancho-Tello, F. Bosch-Morell, and F. J. Romero. 2007. '[Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the rat retina: treatment with the antioxidant ebselen]', *Arch Soc Esp Oftalmol*, 82: 757-62.
- Johnson, J., R. T. Fremeau, Jr., J. L. Duncan, R. C. Renteria, H. Yang, Z. Hua, X. Liu, M. M. LaVail, R. H. Edwards, and D. R. Copenhagen. 2007. 'Vesicular glutamate transporter 1 is required for photoreceptor synaptic signaling but not for intrinsic visual functions', *J Neurosci*, 27: 7245-55.
- Johnson, L.V., Leitner, W.P., Rivest, A.J., Staples, M.K., Radeke, M.J., Anderson, D.H. 2002. 'The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 11830-35.
- Jonkman, J. E., J. A. Cathcart, F. Xu, M. E. Bartolini, J. E. Amon, K. M. Stevens, and P. Colarusso. 2014. 'An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy', *Cell Adh Migr*, 8: 440-51.
- Joseph, R. R., and S. S. Venkatraman. 2017. 'Drug delivery to the eye: what benefits do nanocarriers offer?', *Nanomedicine (Lond)*, 12: 683-702.
- Jumnongprakhon, P., S. Sivasinprasasn, P. Govitrapong, C. Tocharus, and J. Tocharus. 2017. 'Activation of melatonin receptor (MT1/2) promotes P-gp transporter in methamphetamine-induced toxicity on primary rat brain microvascular endothelial cells', *Toxicol In Vitro*, 41: 42-48.

- Junemann, A. G. M., B. Michalke, M. Lucio, A. Chaudhri, U. Schlotzer-Schrehardt, R. Rejdak, M. Rekas, and B. Hohberger. 2018. 'Aqueous humor selenium level and open-angle glaucoma', *J Trace Elem Med Biol*, 50: 67-72.
- Kaempfen, S., R. P. Neumann, K. Jost, and S. M. Schulzke. 2018. 'Beta-blockers for prevention and treatment of retinopathy of prematurity in preterm infants', *Cochrane Database Syst Rev*, 3: CD011893.
- Kane, F. E., J. Burdan, A. Cutino, and K. E. Green. 2008. 'Iluvien: a new sustained delivery technology for posterior eye disease', *Expert Opin Drug Deliv*, 5: 1039-46.
- 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: 1647-60.
- Kaplon, H., and J. M. Reichert. 2018. 'Antibodies to watch in 2018', *MAbs*, 10: 183-203.
- 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: 1051-64.
- Kaur, C., V. Sivakumar, R. Robinson, W. S. Foulds, C. D. Luu, and E. A. Ling. 2013. 'Neuroprotective effect of melatonin against hypoxia-induced retinal ganglion cell death in neonatal rats', *J Pineal Res*, 54: 190-206.
- Kaur, I. P., and S. Kakkar. 2014. 'Nanotherapy for posterior eye diseases', *J Control Release*, 193: 100-12.
- Kaviarasan, K., M. Jithu, M. Arif Mulla, T. Sharma, S. Sivasankar, U. N. Das, and N. Angayarkanni. 2015. 'Low blood and vitreal BDNF, LXA4 and altered Th1/Th2 cytokine balance are potential risk factors for diabetic retinopathy', *Metabolism*, 64: 958-66.
- Keene, C. D., C. M. Rodrigues, T. Eich, M. S. Chhabra, C. J. Steer, and W. C. Low. 2002. 'Tauroursodeoxycholic acid, a bile acid, is neuroprotective in a transgenic animal model of Huntington's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10671-6.
- 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: 3245-67.
- Kholodilov, N., S. R. Kim, O. Yarygina, T. Kareva, J. W. Cho, A. Baohan, and R. E. Burke. 2011. 'Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-alpha1 expressed in striatum in trans regulates development and injury response of dopamine neurons of the substantia nigra', *J Neurochem*, 116: 486-98.
- Kilic, E., D. M. Hermann, S. Isenmann, and M. Bahr. 2002. 'Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice', *J Pineal Res*, 32: 106-11.

- Kim, G. H., J. E. Kim, S. J. Rhie, and S. Yoon. 2015. 'The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases', *Exp Neurol*, 24: 325-40.
- Kim, T.W., Kim, D.M., Park, K.H., Kim, H. . 2002. 'Neuroprotective effect of memantine in a rabbit model of optic nerve ischemia. ', *Korean Journal of Ophthalmology*, 16: 1-7.
- Kim, U. S., N. Jurkute, and P. Yu-Wai-Man. 2018. 'Leber Hereditary Optic Neuropathy-Light at the End of the Tunnel?', *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 7: 242-45.
- 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.
- 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: 7446-51.
- Klettner, A., N. Tahmaz, M. Dithmer, E. Richert, and J. Roeder. 2014. 'Effects of aflibercept on primary RPE cells: toxicity, wound healing, uptake and phagocytosis', *Br J Ophthalmol*, 98: 1448-52.
- Klocker, N., F. Braunling, S. Isenmann, and M. Bahr. 1997. 'In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells', *Neuroreport*, 8: 3439-42.
- Koc, A., S. Onal, O. Yenice, and H. Kazokoglu. 2010. 'Pars Plana Vitrectomy and Intravitreal Liposomal Amphotericin B in the Treatment of Candida Endophthalmitis', *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*: 1-3.
- Koeberle, P. D., and M. Bahr. 2008. 'The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS', *Cell Death Differ*, 15: 471-83.
- Koeva, Y. A., S. T. Sivkov, V. H. Akabaliev, R. Y. Ivanova, T. I. Deneva, L. S. Grozleikova, and V. Georgieva. 2014. 'Brain-derived neurotrophic factor and its serum levels in schizophrenic patients', *Folia Med (Plovdiv)*, 56: 20-3.
- Kokkinopoulos, I., G. Shahabi, A. Colman, and G. Jeffery. 2011. 'Mature peripheral RPE cells have an intrinsic capacity to proliferate; a potential regulatory mechanism for age-related cell loss', *PLoS One*, 6: e18921.
- 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: 11300-5.
- 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: 172-98.
- 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: 1192-201.

- Kompella, U. B., R. S. Kadam, and V. H. Lee. 2010. 'Recent advances in ophthalmic drug delivery', *Ther Deliv*, 1: 435-56.
- Konareva-Kostianeva, M. 2005. 'Neovascular glaucoma', *Folia Med (Plovdiv)*, 47: 5-11.
- Kong, J. N., Z. Zhu, Y. Itokazu, G. Wang, M. B. Dinkins, L. Zhong, H. P. Lin, A. Elsherbini, S. Leanhart, X. Jiang, H. Qin, W. Zhi, S. D. Spassieva, and E. Bieberich. 2018. 'Novel function of ceramide for regulation of mitochondrial ATP release in astrocytes', *J Lipid Res*, 59: 488-506.
- Konstas, A. G., M. C. Mocan, A. Katsanos, I. C. Voudouragkaki, and M. Irkec. 2013. 'Latanoprost/timolol fixed combination for the treatment of glaucoma', *Expert Opin Pharmacother*, 14: 1815-27.
- Kousal, B., H. Kolarova, M. Meliska, J. Bydzovsky, P. Diblik, J. Kulhanek, M. Votruba, T. Honzik, and P. Liskova. 2018. 'Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy', *Acta Ophthalmol*.
- Krueger-Naug, A. M., J. G. Emsley, T. L. Myers, R. W. Currie, and D. B. Clarke. 2003. 'Administration of brain-derived neurotrophic factor suppresses the expression of heat shock protein 27 in rat retinal ganglion cells following axotomy', *Neuroscience*, 116: 49-58.
- 'Krzysztof Palczewski, Case Western Reserve University (n.d.). Retrieved from <https://www.jax.org/strain/017628>'.
- Kumar, S., R. Rao, A. Kumar, S. Mahant, and S. Nanda. 2016. 'Novel Carriers for Coenzyme Q10 Delivery', *Curr Drug Deliv*, 13: 1184-204.
- Kuno, N., and S. Fujii. 2010. 'Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date', *Drugs Aging*, 27: 117-34.
- Kuno N., Fujii S. 2012. 'Ocular drug delivery systems for the posterior segment: a review', *Retinal Today*: 54-59.
- 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: 198-203.
- Kuppermann, B. D., and A. Loewenstein. 2010. 'Drug delivery to the posterior segment of the eye', *Dev Ophthalmol*, 47: 59-72.
- Kwak, H. W., and D. J. D'Amico. 1992. 'Evaluation of the retinal toxicity and pharmacokinetics of dexamethasone after intravitreal injection', *Arch Ophthalmol*, 110: 259-66.
- Kwong, T. Q., and M. Mohamed. 2014. 'Anti-vascular endothelial growth factor therapies in ophthalmology: current use, controversies and the future', *Br J Clin Pharmacol*, 78: 699-706.
- 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: 1012-20.
- Kyrylkova, K., S. Kyryachenko, M. Leid, and C. Kioussi. 2012. 'Detection of apoptosis by TUNEL assay', *Methods Mol Biol*, 887: 41-7.

- L.M. Sádaba, P. Fernández-Robredo, J.A. Rodríguez, A. García-Layana. 2008. 'Antioxidant effects of vitamins C and E, multivitamin-mineral complex and flavonoids in a model of retinal oxidative stress: The ApoE-deficient mouse', *Exp. Eye Res.*, 86: 470-79.
- Laengle, U. W., R. Markstein, V. Schneider, B. Greiner, and D. Roman. 2005. 'Effects of antiglaucoma drugs timolol and GLC756, a novel dopamine D2 agonist and D1 antagonist, on endotoxin-induced-uveitis in rats', *Exp Eye Res*, 80: 847-52.
- Laengle, U. W., R. Markstein, V. Schneider, and D. Roman. 2006. 'Effects of antiglaucoma drugs GLC756, a novel dopamine D2 agonist and D1 antagonist, and timolol on endotoxin-induced TNF-alpha release in serum of rats', *Eur J Ophthalmol*, 16: 401-6.
- Laengle, U. W., A. U. Trendelenburg, R. Markstein, V. Nogues, A. Provencher-Bollinger, and D. Roman. 2006. 'GLC756 decreases TNF-alpha via an alpha2 and beta2 adrenoceptor related mechanism', *Exp Eye Res*, 83: 1246-51.
- Lai, T. Y., S. Liu, S. Das, and D. S. Lam. 2015. 'Intravitreal Injection--Technique and Safety', *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 4: 321-8.
- Lambert, N. G., H. Elshelmani, M. K. Singh, F. C. Mansergh, M. A. Wride, M. Padilla, D. Keegan, R. E. Hogg, and B. K. Ambati. 2016. 'Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration', *Prog Retin Eye Res*, 54: 64-102.
- Lambiase, A., L. Aloe, M. Centofanti, V. Parisi, S. N. Bao, F. Mantelli, V. Colafrancesco, G. L. Manni, M. G. Bucci, S. Bonini, and R. Levi-Montalcini. 2009. 'Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 13469-74.
- 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: 1030-5.
- Lashkari. 6 May 2014. "VEGF-C and VEGF-D blockade by VGX-300 inhibits choroidal neovascularization and leakage in a mouse model of wet AMD." In *ARVO*.
- . 9 May 2013. "Expression of VEGF-C, VEGF-D and their cognate receptors in experimental and clinical choroidal neovascularization." In *ARVO*.
- Lawlor, M., H. Danesh-Meyer, L. A. Levin, I. Davagnanam, E. De Vita, and G. T. Plant. 2017. 'Glaucoma and the brain: Trans-synaptic degeneration, structural change, and implications for neuroprotection', *Surv Ophthalmol*.
- Lawson, E. C., S. K. Bhatia, M. K. Han, M. H. Aung, V. Ciavatta, J. H. Boatright, and M. T. Pardue. 2016. 'Tauroursodeoxycholic Acid Protects Retinal Function and Structure in rd1 Mice', *Adv Exp Med Biol*, 854: 431-6.

- Le, J. T., B. Rouse, and G. Gazzard. 2018. 'Iridotomy to slow progression of visual field loss in angle-closure glaucoma', *Cochrane Database Syst Rev*, 6: CD012270.
- Leach, W. T., D. T. Simpson, T. N. Val, Z. Yu, K. T. Lim, E. J. Park, R. O. Williams, 3rd, and K. P. Johnston. 2005. 'Encapsulation of protein nanoparticles into uniform-sized microspheres formed in a spinning oil film', *AAPS PharmSciTech*, 6: E605-17.
- 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: 603-14.
- 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: 993-1005.
- Lee, E. J., M. C. Song, H. J. Kim, E. J. Lim, I. B. Kim, S. J. Oh, J. I. Moon, and M. H. Chun. 2005. 'Brain-derived neurotrophic factor modulates the dopaminergic network in the rat retina after axotomy', *Cell Tissue Res*, 322: 191-9.
- Lee, M. Y., Y. H. Kuan, H. Y. Chen, T. Y. Chen, S. T. Chen, C. C. Huang, I. P. Yang, Y. S. Hsu, T. S. Wu, and E. J. Lee. 2007. 'Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats', *J Pineal Res*, 42: 297-309.
- Lee, Ping-Yu, Hui Shao, Carl B. Camras, and Steven M. Podos. 1991. 'Additivity of Prostaglandin F2 α -1-Isopropyl Ester to Timolol in Glaucoma Patients', *Ophthalmology*, 98: 1079-82.
- 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: 2043-53.
- Levivier, M., S. Przedborski, C. Bencsics, and U. J. Kang. 1995. 'Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease', *J Neurosci*, 15: 7810-20.
- 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: 1530-44.
- Lewis, R. A., B. Levy, N. Ramirez, C. C. Kopczynski, D. W. Usner, G. D. Novack, and Pg Cs Study Group. 2016. 'Fixed-dose combination of AR-13324 and latanoprost: a double-masked, 28-day, randomised, controlled study in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension', *Br J Ophthalmol*, 100: 339-44.
- Li, H., S. R. Chintalapudi, and M. M. Jablonski. 2017. 'Current drug and molecular therapies for the treatment of atrophic age-related macular

- degeneration: phase I to phase III clinical development', *Expert Opin Investig Drugs*, 26: 1103-14.
- Li, S., A. Hu, W. Wang, X. Ding, and L. Lu. 2017. 'Combinatorial treatment with topical NSAIDs and anti-VEGF for age-related macular degeneration, a meta-analysis', *PLoS One*, 12: e0184998.
- Li, Y., C. Peng, X. Guo, J. J. You, and H. P. Yadav. 2015. 'Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor and Tyrosine Kinase B in Cerebellum of Poststroke Depression Rat Model', *Chin Med J (Engl)*, 128: 2926-31.
- Li, Y., F. Xu, H. Xiao, and F. Han. 2018. 'Long noncoding RNA BDNF-AS inversely regulated BDNF and modulated high-glucose induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells', *J Cell Biochem*, 119: 817-23.
- 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: 1011-4.
- Lin, H. Y., C. Y. Lee, J. Y. Huang, S. F. Yang, and S. C. Chao. 2017. 'Concurrent injection of dexamethasone intravitreal implant and anti-angiogenic agent in patients with macular edema: A retrospective cohort study', *Medicine (Baltimore)*, 96: e8868.
- 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: 1130-2.
- Lindqvist, N., P. Peinado-Ramonn, M. Vidal-Sanz, and F. Hallbook. 2004. 'GDNF, Ret, GFRalpha1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection', *Exp Neurol*, 187: 487-99.
- 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: 7340-6.
- Lipton, S.A. 1993. 'Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: openchannel blockers and alternative redox states of nitric oxide', *Trends in Neuroscience*, 16: 527-32.
- . 2006. 'Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond.', *Nature Reviews Drug Discovery*, 5: 160-70.
- Littarru, G. P., and L. Tiano. 2010. 'Clinical aspects of coenzyme Q10: an update', *Nutrition*, 26: 250-4.
- Liu, K., Y. Song, G. Xu, J. Ye, Z. Wu, X. Liu, X. Dong, M. Zhang, Y. Xing, S. Zhu, X. Chen, Y. Shen, H. Huang, L. Yu, Z. Ke, P. J. Rosenfeld, P. K. Kaiser, G. Ying, X. Sun, X. Xu, and Phoenix study group. 2018. 'Conbercept for Treatment of Neovascular Age-related Macular Degeneration: Results of the Randomized Phase 3 PHOENIX study', *Am J Ophthalmol*.
- Liu, K., Y. Wang, Z. Yin, C. Weng, and Y. Zeng. 2013. 'Changes in glutamate homeostasis cause retinal degeneration in Royal College of Surgeons rats', *Int J Mol Med*, 31: 1075-80.

- Liu, M., L. Guo, T. E. Salt, and M. F. Cordeiro. 2014. 'Dendritic changes in rat visual pathway associated with experimental ocular hypertension', *Curr Eye Res*, 39: 953-63.
- Lobo, A. M., L. Sobrin, and G. N. Papaliodis. 2010. 'Drug delivery options for the treatment of ocular inflammation', *Semin Ophthalmol*, 25: 283-8.
- Löfroth J.E., Johansson L., Norman A.C., Wettström K. . 1991. 'Interactions between surfactants and polymers. I: HPMC.' in Mallamace F. Corti M. (ed.), *Trends in Colloid and Interface Science V. Progress in Colloid & Polymer Science* (Steinkopff, Heidelberg).
- Lois, N., V. McBain, E. Abdelkader, N. W. Scott, and R. Kumari. 2013. 'Retinal pigment epithelial atrophy in patients with exudative age-related macular degeneration undergoing anti-vascular endothelial growth factor therapy', *Retina*, 33: 13-22.
- Lonngren, U., U. Napankangas, M. Lafuente, S. Mayor, N. Lindqvist, M. Vidal-Sanz, and F. Hallbook. 2006. 'The growth factor response in ischemic rat retina and superior colliculus after brimonidine pre-treatment', *Brain Res Bull*, 71: 208-18.
- Lorenzo, A., and B. A. Yankner. 1994. 'Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 12243-7.
- Lundmark, P. O., S. R. Pandi-Perumal, V. Srinivasan, and D. P. Cardinali. 2006. 'Role of melatonin in the eye and ocular dysfunctions', *Vis Neurosci*, 23: 853-62.
- Lundmark, P. O., S. R. Pandi-Perumal, V. Srinivasan, D. P. Cardinali, and R. E. Rosenstein. 2007. 'Melatonin in the eye: implications for glaucoma', *Exp Eye Res*, 84: 1021-30.
- Luo, X., V. Heidinger, S. Picaud, G. Lambrou, H. Dreyfus, J. Sahel, and D. Hicks. 2001. 'Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells in vitro', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 1096-106.
- Ma D, Djemai A, Gendron CM, et al. . 2013. 'Development of a HPMCbased controlled release formulation with hot melt extrusion (HME).', *Drug Dev Ind Pharm*, 39: 1070-83.
- Ma, G. 2014. 'Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: strategy, preparation, and applications', *J Control Release*, 193: 324-40.
- Machalinska, A., M. P. Kawa, E. Pius-Sadowska, D. Roginska, P. Klos, B. Baumert, B. Wiszniewska, and B. Machalinski. 2013. 'Endogenous regeneration of damaged retinal pigment epithelium following low dose sodium iodate administration: an insight into the role of glial cells in retinal repair', *Exp Eye Res*, 112: 68-78.
- Makar, T. K., C. T. Bever, I. S. Singh, W. Royal, S. N. Sahu, T. P. Sura, S. Sultana, K. T. Sura, N. Patel, S. Dhib-Jalbut, and D. Trisler. 2009. 'Brain-derived neurotrophic factor gene delivery in an animal model of multiple sclerosis using bone marrow stem cells as a vehicle', *J Neuroimmunol*, 210: 40-51.

- Malek, M., M. E. Khamseh, R. Aghili, Z. Emami, L. Najafi, and H. R. Baradaran. 2012. 'Medical management of diabetic retinopathy: an overview', *Arch Iran Med*, 15: 635-40.
- Manish Nagpal, Pravin Jain, Jainendra Rahud, Navneet Mehrotra. 2014. 'Outcomes of combination therapy with dexamethasone implant and bevacizumab in macular edema related to vascular occlusions', 4: 77-81.
- Mantopoulos, D., Y. Murakami, J. Comander, A. Thanos, M. Roh, J. W. Miller, and D. G. Vavvas. 2011. 'Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) protects photoreceptors from cell death after experimental retinal detachment', *PLoS One*, 6: e24245.
- Mantravadi, A. V., and N. Vadhar. 2015. 'Glaucoma', *Prim Care*, 42: 437-49.
- 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: 137-48.
- Marquette, S., C. Peerboom, A. Yates, L. Denis, J. Goole, and K. Amighi. 2014. 'Encapsulation of immunoglobulin G by solid-in-oil-in-water: effect of process parameters on microsphere properties', *Eur J Pharm Biopharm*, 86: 393-403.
- Marsh, S. E., and M. Blurton-Jones. 2017. 'Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support', *Neurochem Int*.
- Marshall, L. L., R. L. Hayslett, and G. A. Stevens. 2018. 'Therapy for Open-Angle Glaucoma', *Consult Pharm*, 33: 432-45.
- Martin-Sabroso, C., A. I. Fraguas-Sanchez, J. Aparicio-Blanco, M. F. Cano-Abad, and A. I. Torres-Suarez. 2015. 'Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles', *Int J Pharm*, 480: 27-36.
- Martinez-Aguila, A., B. Fonseca, M. J. Perez de Lara, and J. Pintor. 2016. 'Effect of Melatonin and 5-Methoxycarbonylamino-N-Acetyltryptamine on the Intraocular Pressure of Normal and Glaucomatous Mice', *J Pharmacol Exp Ther*, 357: 293-9.
- Martínez Pacheco, Ramón (editor). 2016. *Tratado de Tecnología Farmacéutica. Volumen II: Operaciones básicas*.
- Martins, L. G., N. M. Khalil, and R. M. Mainardes. 2017. 'Plga Nanoparticles and Polysorbate-80-Coated Plga Nanoparticles Increase in the Vitro Antioxiant Activity of Melatonin', *Curr Drug Deliv*.
- Mateovic, T., M. Ratnik, M. Bogataj, and A. Mrhar. 2005. 'Determination of microsphere solidification time in the solvent evaporation process', *J Microencapsul*, 22: 81-90.
- Maturi, R. K., L. Bleau, J. Saunders, M. Mubasher, and M. W. Stewart. 2015. 'A 12-Month, Single-Masked, Randomized Controlled Study of Eyes with Persistent Diabetic Macular Edema after Multiple Anti-Vegf Injections to Assess the Efficacy of the Dexamethasone-Delayed Delivery System

- as an Adjunct to Bevacizumab Compared with Continued Bevacizumab Monotherapy', *Retina*, 35: 1604-14.
- Mayer, W. J., A. Wolf, M. Kernt, D. Kook, A. Kampik, M. Ulbig, and C. Haritoglou. 2013. 'Twelve-month experience with Ozurdex for the treatment of macular edema associated with retinal vein occlusion', *Eye (Lond)*, 27: 816-22.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz, P. Gonzalez-Menendez, D. Hevia, and R. Cernuda-Cernuda. 2017. 'Melatonin transport into mitochondria', *Cell Mol Life Sci*, 74: 3927-40.
- McElroy, G. S., and N. S. Chandel. 2017. 'Mitochondria control acute and chronic responses to hypoxia', *Exp Cell Res*, 356: 217-22.
- McMonnies, C. 2018. 'Reactive oxygen species, oxidative stress, glaucoma and hyperbaric oxygen therapy', *J Optom*, 11: 3-9.
- McMurtrey, J. J., and M. O. M. Tso. 2018. 'A review of the immunologic findings observed in retinitis pigmentosa', *Surv Ophthalmol*, 63: 769-81.
- Mehta, A., M. Prabhakar, P. Kumar, R. Deshmukh, and P. L. Sharma. 2013. 'Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders', *Eur J Pharmacol*, 698: 6-18.
- Mehta, R. C., Thanoo, B. C., and DeLuca, P. P. . 1996. 'Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(D,L-lactide-co-glycolide)', *J. Controlled Release*, 41: 249-57.
- Meisner D, Mezei M. 1995. 'Liposome ocular delivery systems', *Advanced Drug Delivery reviews*, 16: 75-93.
- Merodio, M., A. Arnedo, M. J. Renedo, and J. M. Irache. 2001. 'Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties', *Eur J Pharm Sci*, 12: 251-9.
- Merodio, M., J. M. Irache, F. Valamanesh, and M. Mirshahi. 2002. 'Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats', *Biomaterials*, 23: 1587-94.
- Mi, X. S., T. F. Yuan, and K. F. So. 2014. 'The current research status of normal tension glaucoma', *Clin Interv Aging*, 9: 1563-71.
- Miller, J. W., S. Bagheri, and D. G. Vavvas. 2017. 'Advances in Age-related Macular Degeneration Understanding and Therapy', *US Ophthalmic Rev*, 10: 119-30.
- Millet, A., P. Bouzat, T. Trouve-Buisson, C. Batandier, K. Pernet-Gallay, L. Gaide-Chevronnay, E. L. Barbier, T. Debillon, E. Fontaine, and J. F. Payen. 2016. 'Erythropoietin and Its Derivates Modulate Mitochondrial Dysfunction after Diffuse Traumatic Brain Injury', *J Neurotrauma*, 33: 1625-33.
- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. 2015. *Real Farmacopea Española. 5ª ed.* (Madrid).
- Mitchell, P. 2011. 'A systematic review of the efficacy and safety outcomes of anti-VEGF agents used for treating neovascular age-related macular degeneration: comparison of ranibizumab and bevacizumab', *Curr Med Res Opin*, 27: 1465-75.

- Mitra, R. N., M. Zheng, E. R. Weiss, and Z. Han. 2018. 'Genomic form of rhodopsin DNA nanoparticles rescued autosomal dominant Retinitis pigmentosa in the P23H knock-in mouse model', *Biomaterials*, 157: 26-39.
- Miura, Y., A. Klettner, and J. Roider. 2010. 'VEGF antagonists decrease barrier function of retinal pigment epithelium in vitro: possible participation of intracellular glutathione', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51: 4848-55.
- Miyake, H., Tazuma S., Miura H., Yamashita G., Kajiyama G. 1999. 'Partial Characterization of Mechanisms of Cytoprotective Action of Hydrophilic Bile Salts Against Hydrophobic Bile Salts in Rats (Relation to Canalicular Membrane Fluidity and Packing Density)', *Dig. Dis. Sci.*, 44: 197-202.
- Moisseiev, E., and A. Loewenstein. 2017a. 'Diabetic Macular Edema: Emerging Strategies and Treatment Algorithms', *Dev Ophthalmol*, 60: 165-74.
- . 2017b. 'Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye', *Dev Ophthalmol*, 58: 87-101.
- Moon, S. Y., K. H. Cho, S. J. Woo, S. P. Park, and Y. K. Kim. 2018. 'Bevacizumab versus Dexamethasone Implant Followed by Bevacizumab for the Treatment of Macula Edema Associated with Branch Retinal Vein Occlusion', *Korean J Ophthalmol*, 32: 29-37.
- Moritera, T., Y. Ogura, Y. Honda, R. Wada, S. H. Hyon, and Y. Ikada. 1991. 'Microspheres of biodegradable polymers as a drug-delivery system in the vitreous', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32: 1785-90.
- 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: 3125-30.
- Morrison, J. C., W. O. Cepurna, and E. C. Johnson. 2015. 'Modeling glaucoma in rats by sclerosing aqueous outflow pathways to elevate intraocular pressure', *Exp Eye Res*, 141: 23-32.
- Morrison, J. C., DeFrank, M. P. & Van Buskirk, E. M. . 1987. 'Comparative microvascular anatomy of mammalian ciliary processes', *IOVS*, 28: 1325-40.
- Morrison, J. C., C. G. Moore, L. M. Deppmeier, B. G. Gold, C. K. Meshul, and E. C. Johnson. 1997. 'A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage', *Exp Eye Res*, 64: 85-96.
- Mozaffarieh, M., M. C. Grieshaber, S. Orgul, and J. Flammer. 2008. 'The potential value of natural antioxidative treatment in glaucoma', *Surv Ophthalmol*, 53: 479-505.
- Musumeci, T., C. Bucolo, C. Carbone, R. Pignatello, F. Drago, and G. Puglisi. 2013. 'Polymeric nanoparticles augment the ocular hypotensive effect of melatonin in rabbits', *Int J Pharm*, 440: 135-40.
- Mysona, B. A., J. Zhao, S. Smith, and K. E. Bollinger. 2018. 'Relationship between Sigma-1 receptor and BDNF in the visual system', *Exp Eye Res*, 167: 25-30.

- Nadal-Nicolas, F. M., M. Jimenez-Lopez, M. Salinas-Navarro, P. Sobrado-Calvo, J. J. Alburquerque-Bejar, M. Vidal-Sanz, and M. Agudo-Barriuso. 2012. 'Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats', *PLoS One*, 7: e49830.
- Nadal-Nicolas, F. M., E. Rodriguez-Villagra, I. Bravo-Osuna, P. Sobrado-Calvo, I. Molina-Martinez, M. P. Villegas-Perez, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso, and R. Herrero-Vanrell. 2016. 'Ketorolac Administration Attenuates Retinal Ganglion Cell Death After Axonal Injury', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57: 1183-92.
- Nagahara, A. H., D. A. Merrill, G. Coppola, S. Tsukada, B. E. Schroeder, G. M. Shaked, L. Wang, A. Blesch, A. Kim, J. M. Conner, E. Rockenstein, M. V. Chao, E. H. Koo, D. Geschwind, E. Masliah, A. A. Chiba, and M. H. Tuszynski. 2009. 'Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease', *Nat Med*, 15: 331-7.
- Nagahara, A. H., and M. H. Tuszynski. 2011. 'Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders', *Nat Rev Drug Discov*, 10: 209-19.
- Nagiel, A., K. B. Freund, R. F. Spaide, I. C. Munch, M. Larsen, and D. Sarraf. 2013. 'Mechanism of retinal pigment epithelium tear formation following intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy revealed by spectral-domain optical coherence tomography', *Am J Ophthalmol*, 156: 981-88 e2.
- Nakajima, Y., Y. Inokuchi, M. Nishi, M. Shimazawa, K. Otsubo, and H. Hara. 2008. 'Coenzyme Q10 protects retinal cells against oxidative stress in vitro and in vivo', *Brain Res*, 1226: 226-33.
- Nakamoto, K., M. Takeshi, T. Hiraoka, M. Eguchi, Y. Nakano, N. Otsuka, H. Hizaki, H. Akai, and M. Hashimoto. 2018. 'The 24-hour intraocular pressure control by tafluprost/timolol fixed combination after switching from the concomitant use of tafluprost and timolol gel-forming solution, in patients with primary open-angle glaucoma', *Clin Ophthalmol*, 12: 359-67.
- Nakano, T., S. Mizoue, N. Fuse, A. Iwase, S. Matsumoto, and K. Yoshikawa. 2015. 'Fixed Combination of Travoprost and Timolol Maleate Reduces Intraocular Pressure in Japanese Patients with Primary Open-Angle Glaucoma or Ocular Hypertension: A Prospective Multicenter Open-Label Study', *Adv Ther*, 32: 823-37.
- Nakazawa, T., M. Tamai, and N. Mori. 2002. 'Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 3319-26.
- Narayan, D. S., J. P. Wood, G. Chidlow, and R. J. Casson. 2016. 'A review of the mechanisms of cone degeneration in retinitis pigmentosa', *Acta Ophthalmol*, 94: 748-54.

- Natesan, S., S. Pandian, C. Ponnusamy, R. Palanichamy, S. Muthusamy, and R. Kandasamy. 2017. 'Co-encapsulated resveratrol and quercetin in chitosan and peg modified chitosan nanoparticles: For efficient intra ocular pressure reduction', *Int J Biol Macromol*, 104: 1837-45.
- Nepal, P. R., H. K. Han, and H. K. Choi. 2010. 'Enhancement of solubility and dissolution of coenzyme Q10 using solid dispersion formulation', *Int J Pharm*, 383: 147-53.
- Neto, H. O., C. V. Regatieri, M. J. Nobrega, C. Muccioli, A. M. Casella, R. E. Andrade, M. Maia, V. Kniggendorf, M. Ferreira, A. C. Branco, and R. Belfort, Jr. 2017. 'Multicenter, Randomized Clinical Trial to Assess the Effectiveness of Intravitreal Injections of Bevacizumab, Triamcinolone, or Their Combination in the Treatment of Diabetic Macular Edema', *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, 48: 734-40.
- Netter, Frank H. 2015. *NETTER. ATLAS DE ANATOMÍA HUMANA (MASSON)*.
- Ngo, W. K., and C. S. Tan. 2017. 'Efficacy of Ozurdex implant in recalcitrant diabetic macular edema: a single-center experience', *Int Ophthalmol*, 37: 465-66.
- Nickells, R. W. 1999. 'Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death', *Surv Ophthalmol*, 43 Suppl 1: S151-61.
- Nickells, R. W., G. R. Howell, I. Soto, and S. W. John. 2012. 'Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy', *Annu Rev Neurosci*, 35: 153-79.
- Niki, E. 1987. 'Lipid antioxidants: how they may act in biological systems', *Br J Cancer Suppl*, 8: 153-7.
- Niki, E., and M. G. Traber. 2012. 'A history of vitamin E', *Ann Nutr Metab*, 61: 207-12.
- 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: 1333-40.
- Nita, M., and A. Grzybowski. 2016. 'The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults', *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 3164734.
- Noh, Y. H., K. Y. Kim, M. S. Shim, S. H. Choi, S. Choi, M. H. Ellisman, R. N. Weinreb, G. A. Perkins, and W. K. Ju. 2013. 'Inhibition of oxidative stress by coenzyme Q10 increases mitochondrial mass and improves bioenergetic function in optic nerve head astrocytes', *Cell Death Dis*, 4: e820.
- Normando, E. M., K. M. Coxon, L. Guo, and M. F. Cordeiro. 2009. 'Focus on: amyloid beta', *Exp Eye Res*, 89: 446-7.
- Nosjean, O., M. Ferro, F. Coge, P. Beauverger, J. M. Henlin, F. Lefoulon, J. L. Fauchere, P. Delagrance, E. Canet, and J. A. Boutin. 2000. 'Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2', *J Biol Chem*, 275: 31311-7.

- Novack, G. D. 2009. 'Ophthalmic drug delivery: development and regulatory considerations', *Clin Pharmacol Ther*, 85: 539-43.
- Novak, S. D., Kuhelj, V., Vrečer, F., & Baumgartner, S. . 2011. ' The influence of HPMC viscosity as FRC parameter on the release of low soluble drug from hydrophylic matrix tablets.', *Pharmaceutical Development and Technology*, 18: 343-47.
- Nucci, C., R. Russo, A. Martucci, C. Giannini, F. Garaci, R. Floris, G. Bagetta, and L. A. Morrone. 2016. 'New strategies for neuroprotection in glaucoma, a disease that affects the central nervous system', *Eur J Pharmacol*, 787: 119-26.
- Nucci, C., R. Tartaglione, A. Cerulli, R. Mancino, A. Spano, F. Cavaliere, L. Rombola, G. Bagetta, M. T. Corasaniti, and L. A. Morrone. 2007. 'Retinal damage caused by high intraocular pressure-induced transient ischemia is prevented by coenzyme Q10 in rat', *Int Rev Neurobiol*, 82: 397-406.
- O'Neil, Maryadele J. (ed). 2013. *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals* (Cambridge : The Royal Society of Chemistry).
- Ogawa, Y., Yamamoto, M., Okada, H., Yashiki, T., and Shimamoto, T. 1988. 'A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid', *Chem. Pharm. Bull.*, 36: 1095-130.
- 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: 1047-53.
- Oli, A., and D. Balakrishnan. 2018. 'Characteristics of Neovascularization in Early Stages of Proliferative Diabetic Retinopathy by Optical Coherence Tomography Angiography', *Am J Ophthalmol*, 194: 190.
- Osaadon, P., X. J. Fagan, T. Lifshitz, and J. Levy. 2014. 'A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy', *Eye (Lond)*, 28: 510-20.
- Osanai, M., N. Nishikiori, G. H. Lee, and N. Sawada. 2010. 'Emerging novel treatment strategies for diabetic eye diseases', *Curr Diabetes Rev*, 6: 35-41.
- Osborne, N. N., G. Chidlow, C. J. Layton, J. P. Wood, R. J. Casson, and J. Melena. 2004. 'Optic nerve and neuroprotection strategies', *Eye (Lond)*, 18: 1075-84.
- 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: S102-28.
- Osswald, C. R., and J. J. Kang-Mieler. 2016. 'Controlled and Extended In Vitro Release of Bioactive Anti-Vascular Endothelial Growth Factors from a Microsphere-Hydrogel Drug Delivery System', *Curr Eye Res*, 41: 1216-22.
- Oveson, B. C., T. Iwase, S. F. Hackett, S. Y. Lee, S. Usui, T. W. Sedlak, S. H. Snyder, P. A. Campochiaro, and J. U. Sung. 2011. 'Constituents of bile, bilirubin

- and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration', *J Neurochem*, 116: 144-53.
- P.D. Koeberle, A.K. Ball, N 2002. 'Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor', *euroscience*, 110: 555-67.
- Paasonen, L., T. Laaksonen, C. Johans, M. Yliperttula, K. Kontturi, and A. Urtti. 2007. 'Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes', *J Control Release*, 122: 86-93.
- Paganelli, F., J. A. Cardillo, L. A. Melo, Jr., D. R. Lucena, A. A. Silva, Jr., A. G. Oliveira, A. L. Hofling-Lima, Q. D. Nguyen, B. D. Kuppermann, R. Belfort, Jr., Pharmacology Brazilian Ocular, and Group Pharmaceutical Technology Research. 2009. 'A single intraoperative sub-tenon's capsule injection of triamcinolone and ciprofloxacin in a controlled-release system for cataract surgery', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 3041-7.
- 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: 1033-8.
- Pan, Q., Q. Xu, N. J. Boylan, N. W. Lamb, D. G. Emmert, J. C. Yang, L. Tang, T. Heflin, S. Alwadani, C. G. Eberhart, W. J. Stark, and J. Hanes. 2015. 'Corticosteroid-loaded biodegradable nanoparticles for prevention of corneal allograft rejection in rats', *J Control Release*, 201: 32-40.
- Pang, J. J., X. Dai, S. E. Boye, I. Barone, S. L. Boye, S. Mao, D. Everhart, A. Dinculescu, L. Liu, Y. Umino, B. Lei, B. Chang, R. Barlow, E. Strettoi, and W. W. Hauswirth. 2011. 'Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa', *Mol Ther*, 19: 234-42.
- Papadopoulos, N., J. Martin, Q. Ruan, A. Rafique, M. P. Rosconi, E. Shi, E. A. Pyles, G. D. Yancopoulos, N. Stahl, and S. J. Wiegand. 2012. 'Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab', *Angiogenesis*, 15: 171-85.
- Papahadjopoulos D, Kimelberg HK. 1973. 'Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: their properties and interactions with cholesterol and proteins', *Progress in Surface Science*, Oxford: Pergamon: 141-49.
- Papucci, L., N. Schiavone, E. Witort, M. Donnini, A. Lapucci, A. Tempestini, L. Formigli, S. Zecchi-Orlandini, G. Orlandini, G. Carella, R. Brancato, and S. Capaccioli. 2003. 'Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property', *J Biol Chem*, 278: 28220-8.
- Pardue, M. T., and R. S. Allen. 2018. 'Neuroprotective strategies for retinal disease', *Prog Retin Eye Res*.

- Paredes, S. D., K. A. Forman, C. Garcia, E. Vara, G. Escames, and J. A. Tresguerres. 2014. 'Protective actions of melatonin and growth hormone on the aged cardiovascular system', *Horm Mol Biol Clin Investig*, 18: 79-88.
- Park, J. H., C. Yoo, J. Park, and Y. Y. Kim. 2017. 'Visual Field Defects in Young Patients With Open-angle Glaucoma: Comparison Between High-tension and Normal-tension Glaucoma', *J Glaucoma*, 26: 541-47.
- Park, K. 2014. 'Controlled drug delivery systems: past forward and future back', *J Control Release*, 190: 3-8.
- 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: 116-22.
- Park, T. G., Lee, H. Y., and Nam, Y. S. 1998. 'A new preparation method for protein loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study', *J. Controlled Release*, 55: 181-91.
- Pasantes-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: 183-97.
- Pascale, A., F. Drago, and S. Govoni. 2012. 'Protecting the retinal neurons from glaucoma: lowering ocular pressure is not enough', *Pharmacol Res*, 66: 19-32.
- Patel, A., K. Cholkar, V. Agrahari, and A. K. Mitra. 2013. 'Ocular drug delivery systems: An overview', *World J Pharmacol*, 2: 47-64.
- Patel, K., and S. Patel. 2014. 'Angle-closure glaucoma', *Dis Mon*, 60: 254-62.
- Patino, P., E. Parada, V. Farre-Alins, S. Molz, R. Cacabelos, J. Marco-Contelles, M. G. Lopez, C. I. Tasca, E. Ramos, A. Romero, and J. Egea. 2016. 'Melatonin protects against oxygen and glucose deprivation by decreasing extracellular glutamate and Nox-derived ROS in rat hippocampal slices', *Neurotoxicology*, 57: 61-68.
- Paulus, Y. M., and J. P. Campbell. 2016. 'Neuroprotection and Retinal Diseases', *Dev Ophthalmol*, 55: 322-9.
- 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: 764-74.
- Pease, M. E., D. J. Zack, C. Berlinicke, K. Bloom, F. Cone, Y. Wang, R. L. Klein, W. W. Hauswirth, and H. A. Quigley. 2009. 'Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 2194-200.
- 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: 489-500.

- Pellegrini, J.W., Lipton, S.A. 1993. 'Delayed administration of memantine prevents Nmethyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity.', *Annals of Neurology*, 33: 403-07.
- Pennington, K. L., and M. M. DeAngelis. 2016. 'Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors', *Eye Vis (Lond)*, 3: 34.
- Pepys, M. B. 2006. 'Amyloidosis', *Annu Rev Med*, 57: 223-41.
- Pernet, V., and A. Di Polo. 2006. 'Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy in vivo', *Brain*, 129: 1014-26.
- Pescosolido, N., R. Giannotti, A. M. Plateroti, A. Pascarella, and M. Nebbioso. 2014. 'Curcumin: therapeutical potential in ophthalmology', *Planta Med*, 80: 249-54.
- Petrs-Silva, H., and R. Linden. 2014. 'Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa', *Clin Ophthalmol*, 8: 127-36.
- Phillips, M. J., T. A. Walker, H. Y. Choi, A. E. Faulkner, M. K. Kim, S. S. Sidney, A. P. Boyd, J. M. Nickerson, J. H. Boatright, and M. T. Pardue. 2008. 'Tauroursodeoxycholic acid preservation of photoreceptor structure and function in the rd10 mouse through postnatal day 30', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49: 2148-55.
- Pinilla, I., L. Fernandez-Sanchez, F. J. Segura, A. I. Sanchez-Cano, J. M. Tamarit, L. Fuentes-Broto, J. T. Eells, P. Lax, and N. Cuenca. 2016. 'Long time remodeling during retinal degeneration evaluated by optical coherence tomography, immunocytochemistry and fundus autofluorescence', *Exp Eye Res*, 150: 122-34.
- Pisal, D. S., M. P. Kosloski, and S. V. Balu-Iyer. 2010. 'Delivery of therapeutic proteins', *J Pharm Sci*, 99: 2557-75.
- 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: 3008-15.
- 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: 974-8.
- Portt, L., G. Norman, C. Clapp, M. Greenwood, and M. T. Greenwood. 2011. 'Anti-apoptosis and cell survival: a review', *Biochim Biophys Acta*, 1813: 238-59.
- Prince, C. S., A. Maloyan, and L. Myatt. 2017. 'Maternal obesity alters brain derived neurotrophic factor (BDNF) signaling in the placenta in a sexually dimorphic manner', *Placenta*, 49: 55-63.
- Qu, J., D. Wang, and C. L. Grosskreutz. 2010. 'Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma', *Exp Eye Res*, 91: 48-53.
- 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: 3460-6.
- R. Herrero-Vanrell, M. Vicario de la Torre, V. Andrés-Guerrero, D. Barbosa-Alfaro, I.T. Molina-Martínez, I. Bravo-Osuna. 2013. 'Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview ', *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 23: 75-102.
- Raghava, S., M. Hammond, and U. B. Kompella. 2004. 'Periocular routes for retinal drug delivery', *Expert Opin Drug Deliv*, 1: 99-114.
- Ramdas, W. D., R. C. Wolfs, J. C. Kieffe-de Jong, A. Hofman, P. T. de Jong, J. R. Vingerling, and N. M. Jansonius. 2012. 'Nutrient intake and risk of open-angle glaucoma: the Rotterdam Study', *Eur J Epidemiol*, 27: 385-93.
- Ramirez, A. I., R. de Hoz, E. Salobar-Garcia, J. J. Salazar, B. Rojas, D. Ajoy, I. Lopez-Cuenca, P. Rojas, A. Trivino, and J. M. Ramirez. 2017. 'The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma', *Front Aging Neurosci*, 9: 214.
- 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: 42-48.
- Rasheed, M. Z., H. Tabassum, and S. Parvez. 2017. 'Mitochondrial permeability transition pore: a promising target for the treatment of Parkinson's disease', *Protoplasma*, 254: 33-42.
- Ratican, S. E., A. Osborne, and K. R. Martin. 2018. 'Progress in Gene Therapy to Prevent Retinal Ganglion Cell Loss in Glaucoma and Leber's Hereditary Optic Neuropathy', *Neural Plast*, 2018: 7108948.
- Read, S. P., S. M. Cashman, and R. Kumar-Singh. 2010. 'POD nanoparticles expressing GDNF provide structural and functional rescue of light-induced retinal degeneration in an adult mouse', *Mol Ther*, 18: 1917-26.
- Reisberg, B., R. Doody, A. Stoffler, F. Schmitt, S. Ferris, H. J. Mobius, and Group Memantine Study. 2003. 'Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease', *N Engl J Med*, 348: 1333-41.
- Reiter, R. J., D. Acuna-Castroviejo, D. X. Tan, and S. Burkhardt. 2001. 'Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system', *Ann N Y Acad Sci*, 939: 200-15.
- Reiter, R. J., S. Rosales-Corral, D. X. Tan, M. J. Jou, A. Galano, and B. Xu. 2017. 'Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas', *Cell Mol Life Sci*, 74: 3863-81.
- 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: 1129-46.

- Reiter, R. J., D. X. Tan, C. Osuna, and E. Gitto. 2000. 'Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review', *J Biomed Sci*, 7: 444-58.
- Reme, C. E., C. Grimm, F. Hafezi, A. Marti, and A. Wenzel. 1998. 'Apoptotic cell death in retinal degenerations', *Prog Retin Eye Res*, 17: 443-64.
- Rezar-Dreindl, S., K. Eibenberger, W. Buehl, M. Georgopoulos, G. Weigert, C. Krall, R. Dunavoelgyi, U. Schmidt-Erfurth, and S. Sacu. 2017. 'ROLE OF ADDITIONAL DEXAMETHASONE FOR THE MANAGEMENT OF PERSISTENT OR RECURRENT NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION UNDER RANIBIZUMAB TREATMENT', *Retina*, 37: 962-70.
- Rhee, K. D., S. Nusinowitz, K. Chao, F. Yu, D. Bok, and X. J. Yang. 2013. 'CNTF-mediated protection of photoreceptors requires initial activation of the cytokine receptor gp130 in Muller glial cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E4520-9.
- Riazi-Esfahani, M., H. Riazi-Esfahani, A. Ahmadraji, R. Karkhaneh, A. Mahmoudi, R. Roohipoor, F. Ghasemi, and M. Yaseri. 2018. 'Intravitreal bevacizumab alone or combined with 1 mg triamcinolone in diabetic macular edema: a randomized clinical trial', *Int Ophthalmol*, 38: 585-98.
- Richard L. Drake, Adam M.W. Mitchell, A. Wayne Vogl PhD FAAA. 2015. *GRAY ANATOMÍA PARA ESTUDIANTES* (Elsevier).
- Rincon Alarcon, A. and I. T. Molina Martinez. 2006. 'Intraocular drug delivery systems', *Arch Soc Esp Oftalmol*, 81: 57-59.
- Rivera, J. C., R. Dabouz, B. Noueihed, S. Omri, H. Tahiri, and S. Chemtob. 2017. 'Ischemic Retinopathies: Oxidative Stress and Inflammation', *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 3940241.
- Rodrigues, C. M., S. Sola, J. C. Sharpe, J. J. Moura, and C. J. Steer. 2003. 'Tauroursodeoxycholic acid prevents Bax-induced membrane perturbation and cytochrome C release in isolated mitochondria', *Biochemistry*, 42: 3070-80.
- Rodrigues, E. B., M. E. Farah, J. M. Bottos, and F. Bom Aggio. 2016. 'Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Treatment of Retinal Diseases', *Dev Ophthalmol*, 55: 212-20.
- Rodrigues, E. B., M. E. Farah, M. Maia, F. M. Penha, C. Regatieri, G. B. Melo, M. M. Pinheiro, and C. R. Zanetti. 2009. 'Therapeutic monoclonal antibodies in ophthalmology', *Prog Retin Eye Res*, 28: 117-44.
- Rodriguez-Agirretxe, I., S. C. Vega, R. Rezola, E. Vecino, J. Mendicutte, T. Suarez-Cortes, and A. Acera. 2013. 'The PLGA implant as an antimetabolic delivery system after experimental trabeculectomy', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54: 5227-35.
- Rodriguez Villanueva, J., I. Bravo-Osuna, R. Herrero-Vanrell, I. T. Molina Martinez, and M. Guzman Navarro. 2016. 'Optimising the controlled release of dexamethasone from a new generation of PLGA-based microspheres intended for intravitreal administration', *Eur J Pharm Sci*, 92: 287-97.

- Rohrer, B., J. I. Korenbrot, M. M. LaVail, L. F. Reichardt, and B. Xu. 1999. 'Role of neurotrophin receptor TrkB in the maturation of rod photoreceptors and establishment of synaptic transmission to the inner retina', *J Neurosci*, 19: 8919-30.
- 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: 3057-68.
- Rosa, A. I., I. Fonseca, M. J. Nunes, S. Moreira, E. Rodrigues, A. N. Carvalho, C. M. P. Rodrigues, M. J. Gama, and M. Castro-Caldas. 2017. 'Novel insights into the antioxidant role of tauroursodeoxycholic acid in experimental models of Parkinson's disease', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863: 2171-81.
- Rudzinski, M., T. P. Wong, and H. U. Saragovi. 2004. 'Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension', *J Neurobiol*, 58: 341-54.
- Rush, S. W., D. Vu, and R. B. Rush. 2015. 'The Safety and Efficacy of Routine Administration of Intracameral Vancomycin during Cataract Surgery', *J Ophthalmol*, 2015: 813697.
- Russelakis-Carneiro, M., Silveira, L.C., Perry, V.H. 1996. 'Factors affecting the survival of cat retinal ganglion cells after optic nerve injury', *Journal of Neurocytology*, 25: 393-402.
- Russo, R., Cavaliere, F., Berliocchi, L., Nucci, C., Gliozzi, M., Mazzei, C., Tassorelli, C., Corasaniti, M.T., Rotiroti, D., Bagetta, G., Morrone, L.A. 2008. 'Modulation of prosurvival and death-associated pathways under retinal ischemia/reperfusion: effects of NMDA receptor blockade', *Journal of Neurochemistry*, 107: 1347-57.
- Russo, R., G. P. Varano, A. Adornetto, C. Nucci, M. T. Corasaniti, G. Bagetta, and L. A. Morrone. 2016. 'Retinal ganglion cell death in glaucoma: Exploring the role of neuroinflammation', *Eur J Pharmacol*, 787: 134-42.
- Sacchetti, M., F. Mantelli, M. L. Rocco, A. Micera, L. Brandolini, L. Focareta, C. Pisano, L. Aloe, and A. Lambiase. 2017. 'Recombinant Human Nerve Growth Factor Treatment Promotes Photoreceptor Survival in the Retinas of Rats with Retinitis Pigmentosa', *Curr Eye Res*, 42: 1064-68.
- Sadiq, M. A., M. Hanout, S. Sarwar, M. Hassan, A. Agarwal, Y. J. Sepah, D. V. Do, and Q. D. Nguyen. 2016. 'Platelet-Derived Growth Factor Inhibitors: A Potential Therapeutic Approach for Ocular Neovascularization', *Dev Ophthalmol*, 55: 310-6.
- Saint-Geniez, M., A. S. Maharaj, T. E. Walshe, B. A. Tucker, E. Sekiyama, T. Kurihara, D. C. Darland, M. J. Young, and P. A. D'Amore. 2008. 'Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors', *PLoS One*, 3: e3554.
- 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: 4989-93.
- Sakamoto, K., C. Liu, and G. Tosini. 2004. 'Circadian rhythms in the retina of rats with photoreceptor degeneration', *J Neurochem*, 90: 1019-24.
- Sakurai, E., H. Ozeki, N. Kunou, and Y. Ogura. 2001. 'Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics', *Ophthalmic Res*, 33: 31-6.
- Sanchez-Lopez, E., M. A. Egea, B. M. Davis, L. Guo, M. Espina, A. M. Silva, A. C. Calpena, E. M. B. Souto, N. Ravindran, M. Ettcheto, A. Camins, M. L. Garcia, and M. F. Cordeiro. 2018. 'Memantine-Loaded PEGylated Biodegradable Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma', *Small*, 14.
- Sancho-Pelluz, J., B. Arango-Gonzalez, S. Kustermann, F. J. Romero, T. van Veen, E. Zrenner, P. Ekstrom, and F. Paquet-Durand. 2008. 'Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration', *Mol Neurobiol*, 38: 253-69.
- Sandhu, J. K., S. Pandey, M. Ribocco-Lutkiewicz, R. Monette, H. Borowy-Borowski, P. R. Walker, and M. Sikorska. 2003. 'Molecular mechanisms of glutamate neurotoxicity in mixed cultures of NT2-derived neurons and astrocytes: protective effects of coenzyme Q10', *J Neurosci Res*, 72: 691-703.
- Saraiya, N. V., and D. A. Goldstein. 2011. 'Dexamethasone for ocular inflammation', *Expert Opin Pharmacother*, 12: 1127-31.
- Sariola, H., and M. Saarna. 2003. 'Novel functions and signalling pathways for GDNF', *J Cell Sci*, 116: 3855-62.
- Sarwar, S., E. Clearfield, M. K. Soliman, M. A. Sadiq, A. J. Baldwin, M. Hanout, A. Agarwal, Y. J. Sepah, D. V. Do, and Q. D. Nguyen. 2016. 'Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration', *Cochrane Database Syst Rev*, 2: CD011346.
- Schabitz, W. R., S. Schwab, M. Spranger, and W. Hacke. 1997. 'Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats', *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 500-6.
- Schain, M., and W. C. Kreisl. 2017. 'Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review', *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17: 25.
- Schizas, N., N. Konig, B. Andersson, S. Vasylovska, J. Hoeber, E. N. Kozlova, and N. P. Hailer. 2018. 'Neural crest stem cells protect spinal cord neurons from excitotoxic damage and inhibit glial activation by secretion of brain-derived neurotrophic factor', *Cell Tissue Res*, 372: 493-505.
- Schmid, M. K., L. M. Bachmann, L. Fas, A. G. Kessels, O. M. Job, and M. A. Thiel. 2015. 'Efficacy and adverse events of aflibercept, ranibizumab and bevacizumab in age-related macular degeneration: a trade-off analysis', *Br J Ophthalmol*, 99: 141-6.
- Schmidt-Erfurth, U., G. E. Lang, F. G. Holz, R. O. Schlingemann, P. Lanzetta, P. Massin, O. Gerstner, A. S. Bouazza, H. Shen, A. Osborne, P. Mitchell, and Restore Extension Study Group. 2014. 'Three-year outcomes of

- individualized ranibizumab treatment in patients with diabetic macular edema: the RESTORE extension study', *Ophthalmology*, 121: 1045-53.
- Schmidt, K. G., H. Bergert, and R. H. Funk. 2008. 'Neurodegenerative diseases of the retina and potential for protection and recovery', *Curr Neuropharmacol*, 6: 164-78.
- Schmitz, F., A. Königstorfer, and T. C. Südhof. 2000. 'RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function', *Neuron*, 28: 857-72.
- Schori, H., J. Kipnis, E. Yoles, E. WoldeMussie, G. Ruiz, L. A. Wheeler, and M. Schwartz. 2001. 'Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3398-403.
- Schutze, C., M. Wedl, B. Baumann, M. Pircher, C. K. Hitzenberger, and U. Schmidt-Erfurth. 2015. 'Progression of retinal pigment epithelial atrophy in antiangiogenic therapy of neovascular age-related macular degeneration', *Am J Ophthalmol*, 159: 1100-14 e1.
- Seddon, J. M. 2017. 'Macular Degeneration Epidemiology: Nature-Nurture, Lifestyle Factors, Genetic Risk, and Gene-Environment Interactions - The Weisenfeld Award Lecture', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58: 6513-28.
- Seddon, J. M., J. Cote, N. Davis, and B. Rosner. 2003. 'Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio', *Arch Ophthalmol*, 121: 785-92.
- Seigel, G. M. 2014. 'Review: R28 retinal precursor cells: the first 20 years', *Mol Vis*, 20: 301-6.
- Sen, C. K., S. Khanna, and S. Roy. 2004. 'Tocotrienol: the natural vitamin E to defend the nervous system?', *Ann N Y Acad Sci*, 1031: 127-42.
- Sercombe, L., T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, and S. Hua. 2015. 'Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery', *Front Pharmacol*, 6: 286.
- Services, U S Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human. 'Frequently Asked Questions About Combination Products. <https://www.fda.gov/CombinationProducts/ucm101496.htm>'.
- Seyfoddin, A., J. Shaw, and R. Al-Kassas. 2010. 'Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery', *Drug Deliv*, 17: 467-89.
- Shah, R. B., and S. P. Schwendeman. 2014. 'A biomimetic approach to active self-microencapsulation of proteins in PLGA', *J Control Release*, 196: 60-70.
- Sheikh, S., Safia, E. Haque, and S. S. Mir. 2013. 'Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions', *J Neurodegener Dis*, 2013: 563481.
- Shen, J., C. Durairaj, T. Lin, Y. Liu, and J. Burke. 2014. 'Ocular pharmacokinetics of intravitreally administered brimonidine and dexamethasone in animal models with and without blood-retinal barrier breakdown', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55: 1056-66.

- Sherif, Z., and U. Pleyer. 2002. 'Corticosteroids in ophthalmology: past-present-future', *Ophthalmologica*, 216: 305-15.
- Shi, W., T. Liu, L. Xie, and S. Wang. 2005. 'FK506 in a biodegradable glycolide-co-clatide-co-caprolactone polymer for prolongation of corneal allograft survival', *Curr Eye Res*, 30: 969-76.
- Shimazawa, M., Y. Inokuchi, T. Okuno, Y. Nakajima, G. Sakaguchi, A. Kato, H. Oku, T. Sugiyama, T. Kudo, T. Ikeda, M. Takeda, and H. Hara. 2008. 'Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-d-aspartate receptor signaling', *J Neurochem*, 107: 279-90.
- Shive, M. S., and J. M. Anderson. 1997. 'Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres', *Adv Drug Deliv Rev*, 28: 5-24.
- Shojaei, S., S. Ghavami, M. R. Panjehshahin, and A. A. Owji. 2015. 'Effects of Ethanol on the Expression Level of Various BDNF mRNA Isoforms and Their Encoded Protein in the Hippocampus of Adult and Embryonic Rats', *Int J Mol Sci*, 16: 30422-37.
- Short, B. G. 2008. 'Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations', *Toxicol Pathol*, 36: 49-62.
- Sieving, P. A., R. C. Caruso, W. Tao, H. R. Coleman, D. J. Thompson, K. R. Fullmer, and R. A. Bush. 2006. 'Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 3896-901.
- Singer, M. A., D. J. Bell, P. Woods, J. Pollard, T. Boord, A. Herro, and S. Porbandarwalla. 2012. 'Effect of combination therapy with bevacizumab and dexamethasone intravitreal implant in patients with retinal vein occlusion', *Retina*, 32: 1289-94.
- Sinha, V. R., and A. Trehan. 2003. 'Biodegradable microspheres for protein delivery', *J Control Release*, 90: 261-80.
- Siqueira, R. C., W. F. Dos Santos, I. U. Scott, A. Messias, M. N. Rosa, G. M. Fernandes Cunha, A. da Silva Cunha, Jr., and R. Jorge. 2015. 'Neuroprotective effects of intravitreal triamcinolone acetonide and dexamethasone implant in rabbit retinas after pars plana vitrectomy and silicone oil injection', *Retina*, 35: 364-70.
- Siu, A. W., M. Maldonado, M. Sanchez-Hidalgo, D. X. Tan, and R. J. Reiter. 2006. 'Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases', *J Pineal Res*, 40: 101-9.
- Siu, A. W., G. G. Ortiz, G. Benitez-King, C. H. To, and R. J. Reiter. 2004. 'Effects of melatonin on the nitric oxide treated retina', *Br J Ophthalmol*, 88: 1078-81.
- Siu, A. W., and C. H. To. 2002. 'Nitric oxide and hydroxyl radical-induced retinal lipid peroxidation in vitro', *Clin Exp Optom*, 85: 378-82.
- Solberg, Y., Rosner, M., Turetz, J., Belkin, M. 1997. 'MK-801 has neuroprotective and antiproliferative effects in retinal laser injury', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 38: 1380-89.

- Soti, C., E. Nagy, Z. Giricz, L. Vigh, P. Csermely, and P. Ferdinandy. 2005. 'Heat shock proteins as emerging therapeutic targets', *Br J Pharmacol*, 146: 769-80.
- Souza, M. C., S. L. Fialho, P. A. Souza, G. O. Fulgencio, G. R. Da Silva, and A. Silva-Cunha. 2014. 'Tacrolimus-loaded PLGA implants: in vivo release and ocular toxicity', *Curr Eye Res*, 39: 99-102.
- Stahl, K., M. N. Mylonakou, O. Skare, M. Amiry-Moghaddam, and R. Torp. 2011. 'Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease', *Brain Res*, 1378: 105-18.
- Stanislaw Slomkowski, José V. Alemán, Robert G. Gilbert, Michael Hess, Kazuyuki Horie, Richard G. Jones, Przemyslaw Kubisa, Ingrid Meisel, Werner Mormann, Stanislaw Penczek, Robert F. T. Stepto. 2011. 'Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems', *Pure and Applied Chemistry*, 83: 2229-59.
- Stewart, M. W. 2012. 'Clinical and differential utility of VEGF inhibitors in wet age-related macular degeneration: focus on aflibercept', *Clin Ophthalmol*, 6: 1175-86.
- Subuddhi, Subhraseema Das and Usharani. 2014. 'Controlled delivery of dexamethasone to the intestine from poly(vinyl alcohol)-poly(acrylic acid) microspheres containing drug-cyclodextrin complexes: influence of method of preparation of inclusion complex', *RSC Advances*, 4: 24222-31.
- Sullivan, A. M., and G. W. O'Keefe. 2016. 'Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease: past, present and future', *Neural Regen Res*, 11: 205-7.
- Takahashi, V. K. L., J. T. Takiuti, R. Jauregui, and S. H. Tsang. 2018. 'Gene therapy in inherited retinal degenerative diseases, a review', *Ophthalmic Genet*, 39: 560-68.
- Tamura, Y., Sato, Y., Yokota, T., Akaike, A., Sasa, M., Takaori, S. 1993. 'Ifenprodil prevents glutamate cytotoxicity via polyamine modulatory sites of N-methyl-D-aspartate receptors in cultured cortical neurons', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265: 1017-25.
- Tanna, A. P., and M. Johnson. 2018. 'Rho Kinase Inhibitors as a Novel Treatment for Glaucoma and Ocular Hypertension', *Ophthalmology*, 125: 1741-56.
- Tao, Y., H. Chen, N. N. Tian, D. T. Huo, G. Li, Y. H. Zhang, Y. Liu, F. G. Fang, J. P. Ding, and X. R. Zhang. 2010. 'Effects of L-ascorbic acid, alpha-tocopherol and co-culture on in vitro developmental potential of porcine cumulus cells free oocytes', *Reprod Domest Anim*, 45: 19-25.
- 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: 13-26.
- Tatton, W. G., R. M. Chalmers-Redman, A. Sud, S. M. Podos, and T. W. Mittag. 2001. 'Maintaining mitochondrial membrane impermeability. an

- opportunity for new therapy in glaucoma?', *Surv Ophthalmol*, 45 Suppl 3: S277-83; discussuin S95-6.
- Taylor, D. J., A. E. Hobby, A. M. Binns, and D. P. Crabb. 2016. 'How does age-related macular degeneration affect real-world visual ability and quality of life? A systematic review', *BMJ Open*, 6: e011504.
- Ten Berge, J. C., Z. Fazil, I. van den Born, R. C. W. Wolfs, M. W. J. Schreurs, W. A. Dik, and A. Rothova. 2018. 'Intraocular cytokine profile and autoimmune reactions in retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, glaucoma and cataract', *Acta Ophthalmol*.
- Tezel, G. 2006. 'Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences', *Prog Retin Eye Res*, 25: 490-513.
- . 2011. 'The immune response in glaucoma: a perspective on the roles of oxidative stress', *Exp Eye Res*, 93: 178-86.
- Tezel, G., Chauhan, B.C., LeBlanc, R.P., Wax, M.B. 2003. 'Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma.', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44: 3025-33.
- Tezel, G., and X. Yang. 2004. 'Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 4049-59.
- Thanos, C., and D. Emerich. 2005. 'Delivery of neurotrophic factors and therapeutic proteins for retinal diseases', *Expert Opin Biol Ther*, 5: 1443-52.
- Thanos, S., M. R. Bohm, M. Meyer zu Horste, V. Prokosch-Willing, M. Hennig, D. Bauer, and A. Heiligenhaus. 2014. 'Role of crystallins in ocular neuroprotection and axonal regeneration', *Prog Retin Eye Res*, 42: 145-61.
- Thiagarajan, G., S. Chandani, S. Harinarayana Rao, A. M. Samuni, K. Chandrasekaran, and D. Balasubramanian. 2002. 'Molecular and cellular assessment of ginkgo biloba extract as a possible ophthalmic drug', *Exp Eye Res*, 75: 421-30.
- 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: 270-7.
- Tombran-Tink, J. 2010. 'PEDF in angiogenic eye diseases', *Curr Mol Med*, 10: 267-78.
- Trujillo, J., L. F. Granados-Castro, C. Zazueta, A. C. Anderica-Romero, Y. I. Chirino, and J. Pedraza-Chaverri. 2014. 'Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin', *Arch Pharm (Weinheim)*, 347: 873-84.
- Tsuda, K. 2004. 'Neuroprotective effects of MK-801 and catecholamine release in the central nervous system', *Stroke*, 35: 9.
- Turunen, M., J. Olsson, and G. Dallner. 2004. 'Metabolism and function of coenzyme Q', *Biochim Biophys Acta*, 1660: 171-99.

- Unsicker, K. 2013. 'Neurotrophic molecules in the treatment of neurodegenerative disease with focus on the retina: status and perspectives', *Cell Tissue Res*, 353: 205-18.
- Urata, Y., S. Honma, S. Goto, S. Todoroki, T. Iida, S. Cho, K. Honma, and T. Kondo. 1999. 'Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells', *Free Radic Biol Med*, 27: 838-47.
- V. Andrés-Guerrero, I. Bravo-Osuna, P. Pastoriza, I.T. Molina-Martinez, Rocí. Herrero-Vanrell. 2017. 'Novel technologies for the delivery of ocular therapeutics in glaucoma', *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 42: 181-92.
- Vaishya, R. D., M. Gokulgandhi, S. Patel, M. Minocha, and A. K. Mitra. 2014. 'Novel dexamethasone-loaded nanomicelles for the intermediate and posterior segment uveitis', *AAPS PharmSciTech*, 15: 1238-51.
- Valvassori, S. S., C. O. Arent, A. V. Steckert, R. B. Varela, L. K. Jornada, P. T. Tonin, J. Budni, E. Mariot, F. Kapczinski, and J. Quevedo. 2015. 'Intracerebral Administration of BDNF Protects Rat Brain Against Oxidative Stress Induced by Ouabain in an Animal Model of Mania', *Mol Neurobiol*, 52: 353-62.
- van Lookeren Campagne, M., J. LeCouter, B. L. Yaspan, and W. Ye. 2014. 'Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities', *J Pathol*, 232: 151-64.
- Vang, S., K. Longley, C. J. Steer, and W. C. Low. 2014. 'The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases', *Glob Adv Health Med*, 3: 58-69.
- Vardimon, L., I. Ben-Dror, N. Avisar, A. Oren, and L. Shifan. 1999. 'Glucocorticoid control of glial gene expression', *J Neurobiol*, 40: 513-27.
- Vellonen, K. S., E. M. Soini, E. M. Del Amo, and A. Urtti. 2016. 'Prediction of Ocular Drug Distribution from Systemic Blood Circulation', *Mol Pharm*, 13: 2906-11.
- 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: 665-75.
- Vercesi, A. E., R. F. Castilho, A. J. Kowaltowski, H. C. F. de Oliveira, N. C. de Souza-Pinto, T. R. Figueira, and E. N. B. Busanello. 2018. 'Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition', *Free Radic Biol Med*, 129: 1-24.
- Verteporfin Roundtable, Participants. 2005. 'Guidelines for using verteporfin (Visudyne) in photodynamic therapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration and other causes: update', *Retina*, 25: 119-34.
- 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: 273-82.

- Vingolo, E. M., M. Rocco, P. Grenga, S. Salvatore, and P. Pelaia. 2008. 'Slowing the degenerative process, long lasting effect of hyperbaric oxygen therapy in retinitis pigmentosa', *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246: 93-8.
- Virmani, A., F. Gaetani, and Z. Binienda. 2005. 'Effects of metabolic modifiers such as carnitines, coenzyme Q10, and PUFAs against different forms of neurotoxic insults: metabolic inhibitors, MPTP, and methamphetamine', *Ann N Y Acad Sci*, 1053: 183-91.
- Vishnoi, S., S. Raisuddin, and S. Parvez. 2016. 'Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress in Epilepsy: Modulatory Role of Melatonin', *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 35: 365-74.
- Vohra, R., J. C. Tsai, and M. Kolko. 2013. 'The role of inflammation in the pathogenesis of glaucoma', *Surv Ophthalmol*, 58: 311-20.
- Walton, K. M. 1999. 'GDNF: a novel factor with therapeutic potential for neurodegenerative disorders', *Mol Neurobiol*, 19: 43-59.
- Wang, H. M., Y. X. Zhao, S. Zhang, G. D. Liu, W. Y. Kang, H. D. Tang, J. Q. Ding, and S. D. Chen. 2010. 'PPARgamma agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes', *J Alzheimers Dis*, 20: 1189-99.
- Wang, N., and X. S. Wu. 1997. 'Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid oligomers: Part II. Biodegradation and drug delivery application', *J Biomater Sci Polym Ed*, 9: 75-87.
- Wang, X., and P. J. Quinn. 1999. 'Vitamin E and its function in membranes', *Prog Lipid Res*, 38: 309-36.
- 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: 1514-27.
- 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: 558-68.
- Wassmer, S., M. Rafat, W. G. Fong, A. N. Baker, and C. Tsilfidis. 2013. 'Chitosan microparticles for delivery of proteins to the retina', *Acta Biomater*, 9: 7855-64.
- Weijtens, O., R. C. Schoemaker, A. F. Cohen, F. P. Romijn, E. G. Lentjes, J. van Rooij, and J. C. van Meurs. 1998. 'Dexamethasone concentration in vitreous and serum after oral administration', *Am J Ophthalmol*, 125: 673-9.
- Weinreb, R. N., T. Aung, and F. A. Medeiros. 2014. 'The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review', *JAMA*, 311: 1901-11.
- Weinreb, R. N., J. M. Liebmann, G. A. Cioffi, I. Goldberg, J. D. Brandt, C. A. Johnson, L. M. Zangwill, S. Schneider, H. Badger, and M. Bejanian. 2018. 'Oral Memantine for the Treatment of Glaucoma: Design and Results of 2 Randomized, Placebo-Controlled, Phase 3 Studies', *Ophthalmology*.

- 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: 300-8.
- Victorin, K., and H. Widner. 2016. 'Memantine and reduced time with dyskinesia in Parkinson's Disease', *Acta Neurol Scand*, 133: 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: 137-60.
- Wilkinson-Berka, J. L., and A. G. Miller. 2008. 'Update on the treatment of diabetic retinopathy', *ScientificWorldJournal*, 8: 98-120.
- Wong, P. 1994. 'Apoptosis, retinitis pigmentosa, and degeneration', *Biochem Cell Biol*, 72: 489-98.
- Wongprayoon, P., and P. Govitrapong. 2017. 'Melatonin as a mitochondrial protector in neurodegenerative diseases', *Cell Mol Life Sci*, 74: 3999-4014.
- Woo, S. J., J. H. Kim, and H. G. Yu. 2010. 'Ursodeoxycholic acid and tauroursodeoxycholic acid suppress choroidal neovascularization in a laser-treated rat model', *J Ocul Pharmacol Ther*, 26: 223-9.
- 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: 249-56.
- 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: 575-91.
- 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: 3906-12.
- Xia, H., Y. Nan, X. Huang, J. Gao, and M. Pu. 2015. 'Effects of Tauroursodeoxycholic Acid and Alpha-Lipoic-Acid on the Visual Response Properties of Cat Retinal Ganglion Cells: An In Vitro Study', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56: 6638-45.
- 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: 527-40.
- Xu, X. J., S. M. Wang, Y. Jin, Y. T. Hu, K. Feng, and Z. Z. Ma. 2017. 'Melatonin delays photoreceptor degeneration in a mouse model of autosomal recessive retinitis pigmentosa', *J Pineal Res*, 63.

- Yamada, N., and T. W. Olsen. 2016. 'Routes for Drug Delivery to the Retina: Topical, Transscleral, Suprachoroidal and Intravitreal Gas Phase Delivery', *Dev Ophthalmol*, 55: 71-83.
- 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: 382-90.
- Yang, C., L. Jiang, S. Bu, L. Zhang, X. Xie, Q. Zeng, D. Zhu, and Y. Zheng. 2013. 'Intravitreal administration of dexamethasone-loaded PLGA-TPGS nanoparticles for the treatment of posterior segment diseases', *J Biomed Nanotechnol*, 9: 1617-23.
- Yang, P. B., M. J. Seiler, R. B. Aramant, F. Yan, M. J. Mahoney, L. M. Kitzes, and H. S. Keirstead. 2010. 'Trophic factors GDNF and BDNF improve function of retinal sheet transplants', *Exp Eye Res*, 91: 727-38.
- Yang, Y. Y., T. S. Chung, and N. P. Ng. 2001. 'Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method', *Biomaterials*, 22: 231-41.
- 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: 1041-50.
- Yasukawa, T., and Y. Ogura. 2010. 'Medical devices for the treatment of eye diseases', *Handb Exp Pharmacol*: 469-89.
- Yasukawa, T., Y. Ogura, E. Sakurai, Y. Tabata, and H. Kimura. 2005. 'Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices', *Adv Drug Deliv Rev*, 57: 2033-46.
- Yazdi, M. H., M. A. Faramarzi, S. Nikfar, K. G. Falavarjani, and M. Abdollahi. 2015. 'Ranibizumab and aflibercept for the treatment of wet age-related macular degeneration', *Expert Opin Biol Ther*, 15: 1349-58.
- Ye, Z., Y. L. Ji, X. Ma, J. G. Wen, W. Wei, and S. M. Huang. 2015. 'Pharmacokinetics and distributions of bevacizumab by intravitreal injection of bevacizumab-PLGA microspheres in rabbits', *Int J Ophthalmol*, 8: 653-8.
- Yeo, Y., O. A. Basaran, and K. Park. 2003. 'A new process for making reservoir-type microcapsules using ink-jet technology and interfacial phase separation', *J Control Release*, 93: 161-73.
- Yeo, Y., and K. Park. 2004. 'Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems', *Arch Pharm Res*, 27: 1-12.
- Young, M., L. Chui, N. Fallah, C. Or, A. B. Merkur, A. W. Kirker, D. A. Albiani, and F. Forooghian. 2014. 'Exacerbation of choroidal and retinal pigment epithelial atrophy after anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular age-related macular degeneration', *Retina*, 34: 1308-15.

- Zarbin, M. A., R. P. Casaroli-Marano, and P. J. Rosenfeld. 2014. 'Age-related macular degeneration: clinical findings, histopathology and imaging techniques', *Dev Ophthalmol*, 53: 1-32.
- Zeng A, Yuan B, Fu Q, et al. . 2009. 'Influence of sodium dodecyl sulfate on swelling, erosion and release behavior of HPMC matrix tablets containing a poorly water-soluble drug.', *Pharm Dev Technol*, 14: 499-505.
- Zhang, G., S. Liu, L. Yang, and Y. Li. 2018. 'The role of Dexamethasone in clinical pharmaceutical treatment for patients with cataract surgery', *Exp Ther Med*, 15: 2177-81.
- 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: 6241-5.
- Zhang, L., X. Cui, R. Jauregui, K. S. Park, S. Justus, Y. T. Tsai, J. K. Duong, C. W. Hsu, W. H. Wu, C. L. Xu, C. S. Lin, and S. H. Tsang. 2018. 'Genetic Rescue Reverses Microglial Activation in Preclinical Models of Retinitis Pigmentosa', *Mol Ther*, 26: 1953-64.
- 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: 791-9.
- Zhang, Q. 2016. 'Retinitis Pigmentosa: Progress and Perspective', *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 5: 265-71.
- Zhang, T., W. Baehr, and Y. Fu. 2012. 'Chemical chaperone TUDCA preserves cone photoreceptors in a mouse model of Leber congenital amaurosis', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53: 3349-56.
- Zhang, T., M. C. Gillies, M. C. Madigan, W. Shen, J. Du, U. Grunert, F. Zhou, M. Yam, and L. Zhu. 2018. 'Disruption of De Novo Serine Synthesis in Muller Cells Induced Mitochondrial Dysfunction and Aggravated Oxidative Damage', *Mol Neurobiol*, 55: 7025-37.
- Zhao, L., G. Chen, J. Li, Y. Fu, T. A. Mavlyutov, A. Yao, R. W. Nickells, S. Gong, and L. W. Guo. 2017. 'An intraocular drug delivery system using targeted nanocarriers attenuates retinal ganglion cell degeneration', *J Control Release*, 247: 153-66.
- Zhao, M., E. Rodriguez-Villagra, L. Kowalczyk, M. Le Normand, M. Berdugo, R. Levy-Boukris, I. El Zaoui, B. Kaufmann, R. Gurny, I. Bravo-Osuna, I. T. Molina-Martinez, R. Herrero-Vanrell, and F. Behar-Cohen. 2017. 'Tolerance of high and low amounts of PLGA microspheres loaded with mineralocorticoid receptor antagonist in retinal target site', *J Control Release*, 266: 187-97.
- Zhou, L., W. Liao, H. Zeng, Y. Yao, X. Chen, and K. Ding. 2018. 'A pectin from fruits of *Lycium barbarum* L. decreases beta-amyloid peptide production through modulating APP processing', *Carbohydr Polym*, 201: 65-74.

ANEXO

APPENDIX

**COMBINATION THERAPY AND CO-DELIVERY STRATEGIES
TO OPTIMIZE TREATMENT OF POSTERIOR SEGMENT
NEURODEGENERATIVE DISEASES**

Arranz-Romera A^{a,b}, Esteban-Pérez S. ^{a,b}, Garcia-Herranz D. ^{a,b}, Aragón-Navas A. ^{a,b}, Bravo-Osuna I. ^{a,b}, Herrero-Vanrell R. ^{a,b,*}

^aPharmaceutical Innovation in Ophthalmology (InnOftal). Research Group (UCM 920415), Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain.

^bRed Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria en Enfermedades Oculares (Oftared) e Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC).

***Corresponding author:**

Rocío Herrero-Vanrell, Department of Pharmaceutics and Food Technology, Faculty of Pharmacy, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: rociohv@farm.ucm.es.

Tel.: +34 91 394 1739

Fax: +34 91 394 1736

Keywords

Eye; posterior segment; combination therapy; co-delivery; intraocular drug delivery systems; neuroprotection.

Word teaser

Combination therapy and co-delivery from multi-loaded drug delivery systems take advantage of the strengths of each monotherapy to achieve optimal outcomes with few repeated administrations.

Abstract

Neurodegenerative diseases affecting the posterior segment of the eye are one of the major causes of irreversible blindness worldwide. The pathogenesis of these retinal pathologies is characterized by a multifactorial aetiology, involving a complex interaction of different apoptotic mechanisms suggesting that effective treatments may require a multi-modal approach. Thus, combination therapy based on the potential synergistic activities of drugs with different mechanisms of action, is currently receiving considerable attention. In this review we summarize several kinds of strategies for co-administration of different drugs to the posterior segment of the eye highlighting those which involve co-delivery from multi-loaded drug delivery systems.

Introduction

Neurodegenerative diseases affecting the posterior segment of the eye are one of the major causes of irreversible blindness worldwide. These pathologies include glaucoma, age-related macular degeneration (AMD), diabetic retinopathy (DR) or diabetic macular edema (DME), among others (Flaxman et al. 2017). By 2020, the number of people affected by AMD is expected to rise to 8.8 million, by glaucoma to 4.5 million, and by DR to 3.2 million (Flaxman et al. 2017). The damage occurring in these neurodegenerative pathologies is not confined to the primary insulted neurons, as the following secondary injuries affect neighbouring neurons as well (Osborne et al. 2004). The pathogenesis of retinal diseases is characterized by a multifactorial aetiology, that involves a complex interaction of metabolic, functional, genetic, and environmental factors (Carelli et al. 2017). The apoptotic cascade of neuronal cells includes several mechanisms such as excitotoxicity, protein misfolding, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, inflammation and neurotrophin deprivation (Pardue and Allen 2018; Baltmr et al. 2010; Schain and Kreisl 2017; Finsterer et al. 2018). Moreover, the events involving retinal cell death can interact and compound, suggesting that an effective treatment may require a multi-modal approach.

Until now, most used monotherapies have been insufficiently effective at preventing neurodegenerative progression. Attributed to the potential synergistic activities of drugs with different mechanisms of action, combination therapy is currently receiving considerable attention. This is the case of several therapeutic combinations based on anti-inflammatory drugs and anti-VEGF molecules, aim at increasing the control over the inflammatory pathways and vascular disorders (Hussain and Ciulla 2016). Inflammation has shown a main role in the ischemic retinopathies such as diabetic retinopathy (DR), age-related macular degeneration (AMD) and other vascular disorders of the retina such as retinal vein occlusion (RVO) (Rivera et al. 2017; Deobhakta and Chang 2013). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) has also a main role in these diseases, not only as a mediating cytokine in inflammation but also as a disrupter of the blood-retinal barrier leading to an increase of vascular permeability (Deobhakta and Chang 2013; Gerding et al. 2015). Likewise, fixed-combination therapies of topical antiglaucomatous drugs currently used in the clinical practice. Nevertheless, despite the clinical efficacy obtained by simultaneous administration of drugs administered topically, there are some limitations when

the target site is located in the posterior segment such as short half-lives of drugs, *in vivo* pharmacokinetics or intraocular distribution of the drugs, which may compromise this therapeutic strategy (V. Andrés-Guerrero 2017).

Intraocular Drug Delivery Systems (IODDSs) may address the aforementioned critical issues for optimal therapy. Thus, the use of IODDs based on implants, nano- and microsystems to vitreoretinal disorders treatment has been widely investigated.

Taking into account the main characteristics of the neurodegenerative diseases affecting the optic nerve and the retina (chronicity, multifactorial, aetiology and progressive degeneration) novel therapeutic strategies based on combined therapy and co-delivery of drugs from IODDS are being developed.

This review article briefly covers several kinds of strategies for co-administration of different drugs to the posterior segment of the eye, which are under clinical use, or under investigation. We have also discussed recent combination therapy-based strategies involving drug delivery systems and future possibilities in this field (Table 1) (Figure 1).



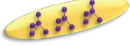

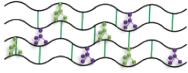
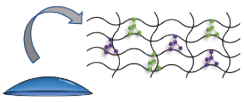

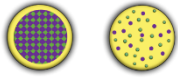
COMBINATION THERAPY STRATEGIES			
CO-ADMINISTRATION:		CO-DELIVERY FROM OCULAR DRUG DELIVERY SYSTEMS:	
FREE DRUGS	IMPLANTS + FREE DRUGS	HYDROGELS THERAPEUTIC CONTACT LENSES	MULTI-LOADED NANOPARTICLES AND MICROPARTICLES
<p>Active substance A</p>  <p>Active substance B</p> 	<p>Implant</p>  <p>Antibody</p> 	<p>Hydrogels</p>  <p>Contact lenses</p> 	<p>Nanoparticles (1 – 1000 nm)</p>  <p>Microparticles (1 – 1000 µm)</p> 

Figure 1. Combination therapies based on fixed-combination of free drugs, implant+free drug and co-delivery from ocular drug delivery systems (hydrogels, contact lenses, nanoparticles and microparticles) for the treatment of retinal diseases and other intraocular pathologies.

Combination therapy using free drugs

Combination therapy through the simultaneous administration of multiple therapeutic agents has emerged as a crucial approach to achieving enhanced activity through synergistic effects (Hommer, Hubatsch, and Cano-Parra 2015; Nakano et al. 2015; Nakamoto et al. 2018).

Simultaneous administration of active substances has demonstrated to have benefits in comparison to monotherapy. As cited previously, several fixed combinations are now used to reduce intraocular pressure (IOP) in patients with glaucoma. This is the case of prostaglandins (bimatoprost, latanoprost or travoprost) with timolol maleate (TM) (Guyen Yilmaz et al. 2018; Konstas et al. 2013; Curran and Orman 2009) which act through different mechanisms. While prostaglandins analogues increase the uveoscleral outflow drainage mediated by the Prostaglandin F receptor (FP) receptor activation, TM reduces aqueous humour production by adrenergic receptors blockage. Thanks to the combination therapy an additive effect is obtained (Lee et al. 1991). Due to the benefits observed in IOP reduction, this therapeutic strategy has been extended to a triple combination of drugs (prostaglandin analogues combined with brinzolamide/timolol maleate fixed combination) (Hommer, Hubatsch, and Cano-Parra 2015). Brinzolamide is a specific carbonic anhydrase (CA) inhibitor which lowers IOP by reducing the rate of aqueous humour formation (Cvetkovic and Perry 2003).

However, these antiglaucoma fixed-combination therapies require at least twice-daily dosing, which often leads to decreased patient adherence. Novel fixed-dose combination products such as Roclatan™ simplify dosing regimens by providing comparable efficacy with a once-daily eye drop regimen. Roclatan™ is a fixed-dose combination product for IOP reduction comprising latanoprost alongside a Rho kinase inhibitor (netarsudil) (Lewis et al. 2016). Inhibitors of Rho kinase have emerged as a new class of IOP lowering drugs capable of increasing outflow through the trabecular meshwork (Tanna and Johnson 2018).

Combination therapy has been extended to other ocular disorders. This is the case of diabetic macular edema (DME). The pathogenesis of DME is complex and includes multiple mechanisms, the most notable of which are angiogenesis and inflammation (Moisseiev and Loewenstein 2017a). Although intravitreal

injections of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) are still this first-line treatment, not all patients respond optimally to anti-VEGF therapy (Gillies et al. 2014). In these cases, according to several clinical trials' data, combinations of anti-VEGF with corticosteroids or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) are emerging as promising therapeutic alternatives (Neto et al. 2017; Ghanbari et al. 2017; Riazi-Esfahani et al. 2018). Also, other novel options are under investigation to explore the benefit of combination therapy. The oral curcumin formulation (DIABEC (2 tablets/day) – curcuma solid extract with 20% of curcuminoids) in combination with dexamethasone intravitreal injection (700 µg) on morphological retinal characteristics and retreatment times in patients with DME is under clinical trial (NCT03598205). Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid with potent anti-inflammatory activity via inhibition of inflammatory cells and suppression of inflammatory mediators' expression and immunosuppressive effects. Curcumin has been described as an antioxidant, anti-inflammatory and antitumor agent (Pescosolido et al. 2014). In ophthalmic disorders, curcumin has been found to attenuate several mechanisms implicated in the pathogenesis including mitochondrial-mediated oxidative stress, inflammatory responses via PPAR-γ agonist activity, down-regulation of COX-2 cyclooxygenase-2, enzyme relating to inflammatory response) and iNOS (Inducible nitric oxide synthase, key enzyme generating nitric oxide) and anti-angiogenic activity via modulation of the VEGF/VEGFR/K-ras pathway (Davis et al. 2018; Trujillo et al. 2014; Wang et al. 2010).

In AMD, combination of aflibercept injection (Eylea®, 2mg) and topical non-steroidal anti-inflammatory (bromfenac) (Yellox® 0.09%) has resulted in higher efficacy in terms of visual acuity improvement compared to a single anti-VEGF therapy (Eylea®, 2mg) (Wyględowska-Promienska et al. 2015; Papadopoulos et al. 2012; Rodrigues et al. 2016) According to authors, the inclusion of an NSAID might lead to a decrease of injections leading to an economic benefit. Also, combined therapy by using a platelet-derived growth factor (PDGF) antagonist (E10030. Fovista) and ranibizumab (Lucentis®) has been tested in patients (phase IIb clinical studies NCT01089517). Authors speculated about the fact that VEGF and PDGF inhibition would cause a neovascular regression. In this study, patients were randomized in 3 groups receiving E10030 (0.3 mg) with 0.5 mg of ranibizumab; E10030 (1.5 mg) with 0.5 mg of ranibizumab; and 0.5 mg of ranibizumab as monotherapy. All groups received monthly intravitreal injection

with a total administration of 6 doses (24 weeks). The combined therapy resulted well tolerated and patients receiving the combined therapy experienced a considerable improvement in visual acuity as well as neovascular regression. However, according to the two pivotal phase 3 clinical trials (OPH1002 and OPH1003) the addition of the anti-PDGF therapy to a monthly ranizumab regimen did not result in benefit compared to anti-VEGF monotherapy for the wet AMD after 1 year of treatment. Likewise, a phase 3 clinical trial (OPH1004) demonstrated that Fovista (anti-PDGF therapy) in combination with Eylea (afibercept) or Avastin (bevacizumab) did not result in any clinically meaningful visual benefit compared to anti-VEGF monotherapy for the treatment of wet AMD after 12 months of treatment. Although safety profile of both combination therapy and monotherapy remained unchanged from prior trials, the ocular adverse events were more frequently reported in the combination treatment. These were mainly related to the injection procedure, which was performed as two separate intravitreal injections, may contribute to the treatment failure (Dunn, Hariprasad, and Sheth 2017). The data have helped put into perspective how important in finding other potential combination targets.

Several studies have evaluated combination therapies based on other therapeutic modalities, such as photodynamic therapy (PDT) with anti-VEGF and anti-inflammatory agents. A pilot study of the triple therapy was carried out in choroidal neovascularization (CNV) secondary to AMD (Augustin, Puls, and Offermann 2007). Intravitreal dexamethasone (800 µg) and bevacizumab (1.5 mg) were administered 16 hours after verteporfin PDT. The triple combination therapy addresses three main targets of CNV development: the CNV itself, VEGF expression (which promotes CNV growth) and inflammation (which exacerbates the disease process) (Augustin, Puls, and Offermann 2007). In this study, 104 patients received a single triple therapy cycle (5 patients received a second triple treatment due to remaining CNV activity and 18 patients the triple therapy was complemented by an additional intravitreal injection of bevacizumab). In most patients, no serious adverse events were observed, resulting in significant ($P < 0.01$) and sustained visual acuity improvement after one cycle of treatment.

It has been described that complement dysregulation induces the pathogenesis of AMD since upon the activation of the complement system, activation fragments (such as C3a and C5a) can amplify and exacerbate inflammation and

tissue injury. Moreover, the presence of C5 components has been described in the drusen and RPE cells overlying or directly adjacent to the drusen (Jo et al. 2017). Based on this fact a combination of a complement factor C5 inhibitor (ZIMURA™) plus anti-VEGF agent ranibizumab (Lucentis®; 0.5 mg) has been studied (NCT03362190). It has been also postulated the benefit of administering beta-blockers to modulate the vasoproliferative retinal process and a combination of intravitreal bevacizumab (anti-VEGF agent) and propranolol injection has been assayed (NCT03609307) (recruiting) (Kaempfen et al. 2018). Also, endoglin/CD105 has been pointed out as a potential therapeutic vascular target (Apolo et al. 2017). This component is overexpressed in vascular endothelial cells of soft tissues undergoing angiogenesis and levels of CD105 correlate with endothelial cell proliferation. A combination of an anti-endoglin antibody (TRC105) plus anti-VEGF agent ranibizumab (Lucentis®) is under evaluation (NCT03211234).

Combination of implants and free drugs

Despite the synergy achieved by several fixed combination therapies through the simultaneous administration of free drugs, the outcomes for neurodegenerative ocular diseases treatments are still unsatisfactory related to short half-life, repeated intravitreal administrations or undesired toxicity effects. In recent years, emerging combination therapies involving ocular implants and free drugs have been investigated to provide a more selective targeting along with the sustained release of molecules at the desired site.

Although intravitreal anti-VEGF therapy has been shown to prevent the loss of vision in most neovascular diseases, results can only be assured if successive injections are given. Since repeated injections are a burden on the patient, attempts are being made to overcome this issue by combining available treatment options.

A combination therapy based on the dexamethasone implant Ozurdex® (biodegradable polymer (Poly(lactic-co-glycolic acid)) matrix containing 700 µg of dexamethasone able to provide 6-months release) and monthly ranibizumab (2.3 mg) injections for macular edema was described by Lin et al. Patients who

received concurrent Ozurdex® and ranibizumab injections from 2012 to 2016, with a follow-up period of at least 3 months, were studied. The efficacy of the treatment was demonstrated through the significant improvement in the visual acuity and central macular thickness presented in the study group (13 patients) compared to control (13 patients) which only received intravitreal injection of the anti-VEGF (Lin et al. 2017).

Simultaneous therapy combining intravitreal Ozurdex® with intravitreal injection of bevacizumab (Avastin®; 1.25 mg) has been investigated in short-term treatment. At the end of a 60-day study, a significant decrease in the macular thickness was registered in patients suffering macular edema secondary to diabetic retinopathy and RVO treated with this concomitant therapy offering an acceptable safety profile of the treatment regimen (de Andrade et al. 2016). Nagpal et al. showed that the combination therapy of the dexamethasone implant (Ozurdex®, 700 µg) and a single bevacizumab (1.25 mg) injection given simultaneously, resulted safe and synergistic providing significantly sustained visual recovery and decreased macular edema in 24 patients having RVOs 6 months after the beginning of the study (Manish Nagpal 2014). Likewise, Mayer, W.J. et al (Mayer et al. 2013) compared Ozurdex® as monotherapy with a combination of three intravitreal injections of bevacizumab (1.25 mg) also including Ozurdex® to treat RVO associated macular edema in a twelve-month treatment. Intravitreal injections of bevacizumab were administrated monthly and dexamethasone implant (Ozurdex®) at week 16. 26 patients received the combined therapy and 38 patients the monotherapy (Ozurdex®). According to the cited study, the combination did not prolong the recurrence periods. In CRVO (Central retinal vein occlusion) patients, the combination showed a better functional improvement. Conversely, according to the authors, the monotherapy (Ozurdex®) showed less retinal thickness (measured by optical coherence tomography) in BRVO (Brain retinal vein occlusion) patients. Further studies that include a longer period of time would be needed in order to verify the benefits of the use of dexamethasone monotherapy (Ozurdex®) in BRVO patients. The previously mentioned combination of dexamethasone implant (Ozurdex®, 700 µg) and bevacizumab (1.25 mg) in 34 patients suffering RVO showed a synergistic effect that resulted in an increase of visual acuity and in a delay of repeated injections, compared to Ozurdex® or Avastin® alone in a 6 months study (Singer et al. 2012).

Also, the comparison of synergic effects of intravitreal bevacizumab (Avastin®; 1.25 mg) and dexamethasone implant (Ozurdex®; 700 µg) for the treatment of macula edema associated with BRVO towards the single administration of intravitreal bevacizumab was studied by Moon, S. et in a retrospectively review of medical records for 15 months (Moon et al. 2018). Intravitreal bevacizumab was administrated to 26 patients and the cited combination was received by 20 patients. After the first administration, all patients were examined once per month receiving an intravitreal injection of bevacizumab in the absence of improvement or intensification in central macular thickness. Although significant differences have not been found with regard to final visual and anatomical results, the cited study suggested that the use of dexamethasone implant together with an intravitreal injection of bevacizumab enhanced the recovery of the patients during the first month in contrast to the administration of monotherapy (bevacizumab). However, large number of patients throughout a longer period of time would be necessary in order to validate these findings.

Dexamethasone implant (Ozurdex®) was also combined with ranibizumab (Lucentis®; 0.5 mg) delaying retreatment with the anti-VEGF in patients with persistent/recurrent AMD. This study (randomized and controlled clinical trial (NCT01162746)) was performed for a period of 12 months in the eyes of 40 patients with choroidal neovascularization secondary to AMD. Patients were randomized in two groups receiving an initial dose of ranibizumab or the antibody plus an injection of the dexamethasone implant (Rezar-Dreindl et al. 2017). The combination is based on the anti-inflammatory, antiangiogenic, and antioedematous effect of dexamethasone and a reduction of the neovascularization due to the VEGF because of ranibizumab (Cheung and Eaton 2013; Rezar-Dreindl et al. 2017).

Since laser photocoagulation has shown insufficient improvement in visual acuity in diabetic macular edema (DME), there has been a growing interest in other treatment methods including fixed combination strategies combining intravitreal antibodies targeting VEGF and sustained-release intravitreal steroid implants. A 12 months study involving 30 enrolled patients (40 eyes), determined that dexamethasone intravitreal implant (Ozurdex®; 700 µg) combined with bevacizumab (1.25 mg) provided greater benefit than bevacizumab monotherapy in DME patients with incomplete response to multiple anti-VEGF injections (Maturi et al. 2015). Combination therapy eyes received intravitreal

bevacizumab at baseline and dexamethasone implant at month 1, 5 and 9, whereas monotherapy eyes received bevacizumab (monthly) if indicated. According to authors, the dexamethasone implant plus bevacizumab significantly improved visual acuity and macular morphology in eyes with refractory diabetic macular edema. Likewise, Güler et al. demonstrated significant improvement in the visual acuity in non-responder patients with DME treated with a fixed treatment protocol combining anti-VEGF therapy (bevacizumab; 2.5 mg) and the corticosteroid implant (Ozurdex®; 700 µg) in non-responding patients to anti-VEGF conventional therapy (Guler, Totan, and Betül Guragac 2017). Sequential treatment in DME, starting with the implant followed by anti-VEGF treatment (aflibercept; 2 mg), has also been reported as a promising alternative that significantly decreased macular thickness compared to aflibercept monotherapy (Hernandez-Bel et al. 2018).

Co-delivery from ocular drug delivery systems (ODDS):

It is well-known that bioavailability of topically administered drugs is compromised by factors that limit their access to the posterior segment of the eye and only a meagre quantity of less than 5% of the dose reaches the intraocular tissues (V. Andrés-Guerrero 2017). Systemically administered drugs cannot achieve therapeutic concentrations in the posterior segment of the eye due to the blood-aqueous and blood-retinal barriers (R. Herrero-Vanrell 2013). On the basis of these limitations, most drugs are administered directly into the eye by intravitreal injection if the target site is located in the back of the eye. Despite the advantage of local administration, repeated intravitreal injections are required with increasing potential risks of complications such as cataract formation, retinal detachment or endophthalmitis, among others (Herrero-Vanrell and Refojo 2001).

On the other hand, the high number of individual medications that patients must self-administer increases treatment complexity and may reduce therapeutic compliance (Hommer, Hubatsch, and Cano-Parra 2015). The development of drug delivery systems capable of providing effective therapeutic drug concentration, while minimizing side-effects and improving patient adherence would be very meaningful and beneficial in clinical practice. Thus, efficient

treatment of ocular diseases can be achieved thanks to the proper use of drug delivery technologies based on emerging pharmaceutical approaches. There are different kinds of drug delivery technologies designed to serve as ocular drug delivery systems (ODDS). These include, among others, hydrogels, therapeutic contact lenses, nanosystems and microsystems. Some representative aspects of these ODDS are described in more detail below.

Co-delivery from IOdds based on colloidal systems can be achieved thanks to the development of novel pharmaceutical technologies.

- Hydrogels – therapeutic contact lenses

Hydrogels are three-dimensional polymeric networks capable of control releasing active substances trapped inside (Stanislaw Slomkowski 2011). Hydrogels have received considerable attention due to their chemical and physical versatility. This versatility can be exploited to attain sustained-release therapies. Topical administration of hydrogels is one of the most frequent drug delivery routes for the treatment of ocular pathologies affecting the ocular surface or when the drug has to reach the anterior segment. The hydrogel can also be engineered as implants that can be injected intracamerally for anterior segment therapies or intravitreally for posterior segment therapies.

A new combined topical formulation composed by a dendrimer hydrogel made out of polyamidoamine (PAMAM), polyethylene glycol (PEG)-acrylate chains and loaded with a combination of brimonidine and TM (0.1% and 0.5% w/v, respectively) was developed for the treatment of glaucoma (Holden et al. 2012). The solubility of the poorly water-soluble brimonidine was enhanced as a result of the hydrophobic core of the PAMAM dendrimers. Dendrimer hydrogel brought about higher human corneal epithelial cells uptake compared to brimonidine and timolol maleate eye drop solution (control). It was observed that the *in vitro* release of both drugs was also prolonged, in contrast to eye drop formulations (PBS-drug solutions). Moreover, the hydrogel significantly increased bovine corneal transport for both drugs in comparison to an eye drop formulation with the same concentration of brimonidine and timolol.

The potential interest in sustained drug delivery to the eye via a contact lens system is understandable. Contact lenses (CLs) are able to extend drug release towards the post-lens tear fluid, if their composition and inner architecture are fitted to the features of the drug molecules (Alvarez-Lorenzo et al. 2019). However, there are different drawbacks like in the regulatory aspect. CLs could be considered as a subclass of combination products and depending on the main role of the action regarding the CLs function or the drug effect different guidelines must be considered. Regarding the patient, it also should be addressed that ophthalmic diseases such as glaucoma mainly occurs in elderly cases that are less likely to wear and apply contact lenses. Also, the *burst effect* associated to soaked CLs lead to a limit in the application. Novel polymers and elaboration techniques have led to a renaissance of the CLs use for therapeutically purposes as we can observe as follows (Hui 2017).

Drug-eluting CLs can be prepared using contact lenses already used for correction of refractive errors via embedding or interacting with the polymers of the network. In addition, a very high compliance is associated for patients with refractive errors or Ad hoc designed CLs. Ad Hoc designed CLs involve the elaboration of copolymers with functional capacities able to interact with target molecules. For example, a bioinspired approach has been used to develop epalrestat-eluting CLs. The presence of the bioactive monomer monomethacryloxypropyl-sym-polydimethylsiloxane hydroxypropyl terminated (MCS-MC12) capable to interact with the aldose reductase and epalrestat regulating the release rate of the drug. Aldose reductase is an enzyme that reduces glucose into sorbitol in hyperglycemia conditions leading to retinopathy and cataracts. Epalrestat is an aldose reductase inhibitor and MCS-MC12 interacts with the active site of the enzyme inhibiting it (Alvarez-Rivera, Concheiro, and Alvarez-Lorenzo 2018).

Hsu and colleagues have embedding TM (12.75 mg/mL) and Dorzolamide (20 mg/mL) in therapeutic contact lenses with vitamin E to control the release of both drugs. The combination of TM and the anhydrase inhibitor (CA inhibitor) Dorzolamide allows a higher decrease of the IOP than monotherapies in glaucoma. In addition, the vitamin E permits a better controlled release for longer periods of time even when the contact lens is removed due to the deposition of lipidic complexes of tocopherol in the ocular surface (Hsu et al. 2015).

- Multiloaded nano- and microparticles

Multi-loaded micro- and nanoscale carriers have emerged as crucial strategies for enhanced combinatorial treatments. Considerable efforts are being devoted to developing co-delivery systems incorporating several drugs into a single carrier system and subsequently releasing the multiple payloads at the desired target site in a controlled manner. In this sense, Natesan et al. tested in rabbits polyethene glycol modified chitosan nanoparticles loaded with two natural antioxidants: resveratrol and quercetin. Developed NPs showed sustained release of both active compounds and synergic effects on reducing intraocular pressure (Natesan et al. 2017). According to the authors, previous clinical studies have reported that oxidative stress and inflammation are associated with trabecular meshwork cell dysfunction increasing the aqueous outflow resistance and thus the IOP.

On the other hand, Checa-casalengua et al. used PLGA-microspheres (MSs) of Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and Vitamin E (Vit E), to effectively protect the Retinal Ganglion Cells (RGC) in a rodent model of ocular hypertension (Checa-Casalengua, Jiang, Bravo-Osuna, Tucker, Molina-Martinez, et al. 2011). GDNF is a pro-survival neurotrophin with a recognized potential for the treatment of a wide variety of neurodegenerative diseases (Kholodilov et al. 2011). From a pharmacological point of view, the antioxidant properties of Vit E presumably might help to reduce the oxidative stress associated with glaucomatous optic neuropathy (Mozaffarieh et al. 2008). Moreover, a pharmacokinetic study carried out with this formulation provided a sustained release of the neurotrophic factor in a controlled fashion up to six months after a single intravitreal injection in rabbits (Garcia-Caballero et al. 2017). In the same way, a recently published study from our group reported the ability of a PLGA-based slow release formulation of MSs loaded with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in combination with an antioxidant (melatonin) to rescue photoreceptors in a mouse model of retinal degeneration (rho (-/-) mice) (García-Caballero C. 2018). Besides, a novel multi-loaded microparticulate formulation incorporating three recognized neuroprotective agents (dexamethasone (anti-inflammatory), melatonin (antioxidant), and coenzyme Q10 (an essential cofactor in mitochondrial bioenergetics) have been shown to lead to the functional and structural rescue of RGC in a well-established rodent model of chronic ocular hypertension (OHT) after 1 month of

administration. Thus, this formulation is presented as a novel therapeutic approach in the management of retinal neurodegeneration conditions such as glaucoma (Arranz-Romera et al. 2019).

Table 1

Summary of combination therapies based on fixed-combination of free drugs, implant-free drug and co-delivery from ocular drug delivery systems (hydrogels, contact lenses, nanoparticles and microparticles) for the treatment of retinal diseases and other intraocular pathologies. Abbreviations: B = Bromfenac, BTFC = fixed-combination of Bimatoprost + Timolol maleate, IVA = Intravitreal injection of Aflibercept, IVB = Intravitreal injection of Bevacizumab, IVR = Intravitreal injection of Ranibizumab, LTFC = fixed-combination of Latanoprost + Timolol maleate, TTFC = fixed-combination of Travoprost + Timolol maleate.

Combination		Disease	Mechanisms of action	<i>In vitro</i> /Animal (healthy or animal model)/Clinical Trial	Outcomes	References
Free Drugs	Bimatoprost + timolol maleate (BTFC) Latanoprost + timolol maleate (LTFC) Travoprost + timolol maleate (TTFC)	Glaucoma	Intraocular pressure (IOP) reducing Prostaglandins (uveoscleral flow increase) + β -Adrenoceptor antagonist (decrease aqueous humour production)	Clinical Trial: Prospective, observer-masked, randomized Patients with primary open-angle glaucoma: Group BTFC (n = 18) Group LTFC (n = 14) Group TTFC (n = 18)	There were not any significant differences in diurnal or nocturnal IOP variation between the three groups (P < 0.05).	(Güven Yilmaz et al. 2018)
	Prostaglandin analogue + brinzolamide + timolol maleate	Glaucoma	IOP reducing Prostaglandin analogue (uveoscleral flow increase) + non-competitive reversible carbonic anhydrase inhibitor + β -Adrenoceptor antagonist (decrease aqueous humour production)	Clinical Trial: prospective, interventional, single-arm, open-label study 38 patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension	At week 12, 70% of patients achieved IOP \leq 18 mmHg (mean IOP at week 12 17.2 ± 4.1 mmHg vs 23.1 ± 3.0 mmHg at baseline).	(Hommer, Hubatsch, and Cano-Parra 2015)
	Roclatan™ Latanoprost + Netarsudil	Glaucoma	IOP reducing Prostaglandin (uveoscleral flow increase) + Rho kinase inhibitor	Clinical Trial: Double-masked, randomised, parallel comparison study. 298 patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension	Fixed-dose combination met the criterion for statistical superiority relative to both latanoprost and Netarsudil (p<0.0001), providing additional IOP lowering of 1.9 and 2.6 mmHg, respectively.	(Lewis et al. 2016)
	Dexamethasone + DIABEC (curcumin tablets)	Diabetic macular edema (DME)	Anti-inflammatory (corticosteroid) + antioxidant, anti-inflammatory and antitumor agent	Clinical Trial: NCT03598205	Recruiting	NCT03598205
	Aflibercept (IVA) + bromfenac (B)	Age-related macular degeneration (AMD)	Anti-angiogenic agent + anti-inflammatory (NSAIDs)	Clinical trial: prospective, randomized Group IVA (n = 27) Group IVA/B (n = 27)	Visual acuity improved in IVA/B group.	(Wyględowska-Promienska et al. 2015)

ANEXO

	E10030 + ranibizumab (IVR)	AMD	PDGF antagonist+ anti- angiogenic agent	Clinical Trial: NCT01089517	Combined therapy showed an improvement in visual acuity and in neovascular regression.	NCT01089517
				Phase 3 clinical trials (OPH1002 and OPH1003)	Addition of the anti-PDGF therapy to a monthly ranizumab regimen did not result in benefit compared to anti-VEGF monotherapy.	OPH1002 and OPH1003
	Verteporfin photodynamic therapy + bevacizumab + dexamethasone	Choroidal neovascularization (CNV) secondary to AMD	Photodynamic therapy + anti-angiogenic agent + anti-inflammatory (corticosteroid)	Clinical Trial: Prospective, noncomparative, interventional case series 104 patients with all types of CNV secondary to AMD	Mean increase in visual acuity was 1.8 lines (P < 0.01). Mean decrease in retinal thickness was 182 µm (P < 0.01).	(Augustin, Puls, and Offermann 2007)
	Zimura™+Lucentis	AMD	Complement factor C5 inhibitor + anti- angiogenic agent	Clinical Trial: NCT03362190	Completed. No results posted.	NCT03362190
	Propranolol + bevacizumab (IVB)	AMD	β-blocker+ anti- angiogenic agent	Clinical Trial: NCT03609307	Recruiting	NCT03609307
	TRC105 + ranibizumab (IVR)	AMD		Clinical Trial: NCT03211234	Recruiting	NCT03211234
Implant + free drug	Dexamethasone (Ozurdex®) + ranibizumab (IVR)	Macular edema (ME)	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti- angiogenic agent	Clinical Trial: retrospective cohort study Patients with ME: Group IVR (n = 13) Group Ozurdex®/IVR (n = 13)	Significant improvements in BCVA (P=0.04) and CMT (P<0.01) were achieved in the Ozurdex®/IVR group.	(Lin et al. 2017)
	Dexamethasone (Ozurdex®) + ranibizumab (IVR)	Sub-foveal CNV secondary to AMD	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti- angiogenic agent	Clinical Trial: randomized and controlled Patients with CNV secondary to AMD: Group IVR (n = 20) Group Ozurdex®/IVR (n = 20)	First retreatment was delayed significantly (P = 0.004) compared to IVR group. Visual acuity changed from 62 letters at baseline to 67 at month 12 in the IVR and remained stable at 68 letters in the Ozurdex®/IVR group (P = 0.68). Macular sensitivity changed from 6.95 dB to 7.01 dB in IVR and from 7.24 dB to 7.12	(Rezar-Dreindl et al. 2017)

					dB in Ozurdex®/IVR (P = 0.4).	
Dexamethasone (Ozurdex®) + bevacizumab	ME	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti-angiogenic agent	Retrospective, non-randomized, open-label case series study 20 patients with ME		BCVA improved significantly from 0.758 ± 0.42 logarithm of the minimum angle of resolution (logMAR) (at baseline) to 0.51 ± 0.33 logMAR at 1 month and to 0.5 ± 0.34 logMAR at 2 months (P ≤ 0.03).	(de Andrade et al. 2016)
Dexamethasone (Ozurdex®) + bevacizumab	ME	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti-angiogenic agent	Clinical Trial: interventional, prospective, nonrandomized, noncomparative open-label, single-center investigation case series Twenty-four eyes of patients with ME: Branch retinal venous occlusion (BRVO) (n = 15) / Central retinal venous occlusion (CRVO) (n = 9)		Mean BCVA gained was 0.313 ± 0.26 (85.3% of final gain) and 0.367 ± 0.34 at week 1 and month 6, respectively. The percentage of patients who gained ≥2 lines were 52% at Week 1 and 68% at Month 6. The mean macular thickness reduced by 350.9 µm at Week 1 and the maximum treatment effect was seen at Month 2 (379.1 µm).	(Manish Nagpal 2014)
Dexamethasone (Ozurdex®) + bevacizumab (IVB)	Retinal vein occlusion (RVO)	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti-angiogenic agent	Clinical Trial: prospective, consecutive, non-randomized case series Patients with RVO: Group Ozurdex® (n = 22 CRVO and n = 16 BRVO) Group Ozurdex®/IVB (n = 14 CRVO and n = 12 BRVO)		BCVA in the first month was significantly better in the IVB/Ozurdex® group (logMAR IVB/Ozurdex® group 0.21 ± 0.26 vs IVB group 0.39 ± 0.30, p = 0.038) and the 1-month CMT was thinner (IVB/ Ozurdex® group 270.0 ± 62.0 µm vs IVB group 338.9 ± 122.6 µm, p = 0.028).	(Mayer et al. 2013)
Dexamethasone (Ozurdex®) + bevacizumab	RVO	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti-angiogenic agent	Clinical Trial: prospective, nonrandomized, open-label, single-center investigation, interventional case series 34 Patients: n = 12 RVO and n = 22 BRVO		Mean visual acuity improved from initially 11 letters to a maximum of 25 letters Macular thickness decreased with the combination treatment.	(Singer et al. 2012)

ANEXO

Dexamethasone (Ozurdex®) + bevacizumab (IVB)	BRVO	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti- angiogenic agent	Retrospective case series Patients with BRVO: Group IVB (n = 26) Group IVB/ Ozurdex® (n = 20)	BCVA in the first month was significantly better in the IVB/Ozurdex® group (logMAR IVB/Ozurdex® group 0.21 ± 0.26 vs IVB group 0.39 ± 0.30 , $p = 0.038$) and the 1-month CMT was thinner (IVB/ Ozurdex® group $270.0 \pm 62.0 \mu\text{m}$ vs IVB group $338.9 \pm 122.6 \mu\text{m}$, $p = 0.028$).	(Moon et al. 2018)
Dexamethasone (Ozurdex®) + bevacizumab (IVB)	DME	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti- angiogenic agent	Clinical Trial: prospective, single-masked, randomized, single-center investigation, controlled trial Patients with DME: Group IVB (n = 19) Group IVB/ Ozurdex® (n = 21)	The mean reduction in central subfield thickness was greater in the combination group ($-45 \mu\text{m}$ vs $-30\mu\text{m}$, difference= $69\mu\text{m}$, 95% confidence interval= $9-129$; $P = 0.03$). More patients in the combination group had central subfield thickness $<250 \mu\text{m}$.	(Maturi et al. 2015)
Dexamethasone (Ozurdex®) + bevacizumab (IVB)	DME	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti- angiogenic agent	Clinical Trial: prospective, nonrandomized study Patients with DME: Group IVB (n = 20) Group IVB/ Ozurdex® (n = 15)	Dexamethasone was implanted in 15 eyes (42.8%) unresponsive to IVB at 18 weeks. Statistically significant improvements were observed in BCVA (at postoperative 4 and 12 weeks) and CFT (at postoperative 4, 12 and 24 weeks) in IVB/Ozurdex® group.	(Guler, Totan, and Betul Guragac 2017)
Dexamethasone (Ozurdex®) + aflibercept (IVA)	DME	Anti-inflammatory (corticosteroid) + anti- angiogenic agent	Observational and retrospective study Patients with DME: Group IVA (n = 15) / Group IVA/ Ozurdex® (n = 15)	BCVA increased with aflibercept (70.8 ± 4.1 to 83.5 ± 2.7 letters) and with sequential treatment (from 75.6 ± 2.7 to 86.5 ± 2.5) ($P = 0.551$). CMT decreased from 411 ± 26.1 to 288.1 ± 10.5 with aflibercept and from $411.4 \pm$	(Hernandez -Bel et al. 2018)

					24.3 to 260.8 ± 17.9 in the sequential treatment group.	
Hydrogels	Brimonidine + timolol maleate	Glaucoma	IOP reducing	<i>In vitro</i> drug uptake studies (Human corneal epithelial cells) <i>Ex vivo</i> drug uptake studies (bovine eyes)	DH increased the PBS solubility of brimonidine by and sustained the <i>in vitro</i> release of both drugs over 56-72 hours. Compared to PBS-drug solutions, DH significantly increased human corneal epithelial cells uptake and bovine corneal transport for both drugs.	(Holden et al. 2012)
Contact lenses	Timolol maleate + dorzolamide + vitamin E	Glaucoma	IOP reducing	Beagle dogs (primary open-angle glaucoma)	The contact lens-based therapy reduces IOP with lower drug dose compared to eye drops and may significantly improve the compliance.	(Hsu et al. 2015)
Nanoparticles	Resveratrol + quercetin	Glaucoma	IOP reducing	Normotensive rabbits	Resveratrol and quercetin loaded polyethylene glycol modified chitosan nanoparticles showed sustained and enhanced reduction of intra ocular pressure (5.5±0.5mmHg) in normotensive rabbits.	(Natesan et al. 2017)
Microspheres	GDNF + Vitamin E	Glaucoma	Neuroprotection	Rodent model of chronic ocular hypertension (Morrison rat model of glaucoma)	Intravitreal injection of GDNF/Vit E PLGA microspheres in an experimental animal model of glaucoma significantly increased RGC survival compared with GDNF, Vit E or blank microspheres (P<0.01). This effect was present for at least 11 weeks.	(Checa-Casalengua, Jiang, Bravo-Osuna, Tucker, Molina-Martinez, et al. 2011).

ANEXO

	GDNF + Melatonin	Retinal degeneration	Neuroprotection	Rhodopsin knockout mice	Intravitreal injection of GDNF or GDNF/melatonin-loaded MSs led to partial functional and structural rescue of photoreceptors compared to blank microspheres or vehicle.	(García-Caballero C. 2018)
	Dexamethasone, melatonin and coenzyme Q10	Glaucoma	Neuroprotection	Rodent model of chronic ocular hypertension (Morrison rat model of glaucoma)	Twenty one days after OHT induction, DMQ-MSs showed a significantly neuroprotective effect on Retinal Ganglion Cells.	(Arranz-Romera et al. 2019).

Concluding remarks and perspectives for combination therapies and co-delivery strategies

In this review, we present a summary of the recent combination treatments that have been developed and evaluated for chronic neurodegenerative pathologies affecting the posterior segment. Combination therapy takes advantage of the strengths of each monotherapy and their different mechanisms of action to achieve good treatment outcomes with few repeated treatments. Promising synergistic effects have been achieved through the combination therapy of free-drugs. Nevertheless, the optimization of the synergy may be compromised by different aspects including short *in vivo* half-lives, insufficient drug delivery in the target site or undesired secondary effects. This is the case of fixed-combination therapies based on free drugs currently used in the clinical practice requiring intense follow-up and frequent intravitreal injections. Accordingly, various therapeutic strategies involving carrier systems have been developed for the co-administration of several active substances in a controlled manner. Initially, these approaches are being based on drug delivery systems helped with the intravitreal administration of free drugs, enhancing drug distribution, enhancing the stabilities of the molecules and releasing the active agents at desired sites in a sustained manner. Currently, the development of multi-loaded carriers may allow obtaining long-acting injectable drug formulations capable of delivering different drugs over longer time periods offering an excellent alternative to multiple administrations. Moreover, with this novel therapeutic strategy less amount of biomaterial is injected as the different drugs are included in the same microcarrier.

The development of treatments involving combinations of drugs is a promising approach towards combating complex or multifactorial disorders. However, undesired secondary effects and tolerability of combination therapies may be of prime concern to the medical community. Undesired effects may include a higher risk of adverse reactions or increased overall costs. In order to minimise these aspects, there are several factors to determine whether drug combinations do indeed modify the risk of adverse reactions; mainly if a pathway targeted by a drug also contains off-targets that would cause an undesired effect.

Under a European Regulatory standpoint, for any individual fixed combination, it will only be considered acceptable if the proposed combination is based on valid therapeutic principles. It is necessary to assess the potential advantages (an improvement of the benefit/risk assessment or a simplification of therapy) in the clinical situation against possible disadvantages (e.g. cumulative toxicity), for each fixed combination product and for each dose of the fixed combination product. As the possibility of interactions between the substances has always be considered, pharmacodynamic and pharmacokinetic data should be provided to the Regulatory Authority. Safety studies in animals should be performed with the active substances of the fixed combination in the proportion present in the product. Regarding therapeutic aspects, confirmatory clinical trials are necessary to prove efficacy, preferably by parallel group comparisons in which the fixed combination is compared to its individual substances. Comparative clinical studies of the fixed combination versus reference treatment might be necessary. Combination products are marketed under a single marketing authorization (Novack 2009; (CHMP) 2008).

According to the U.S. Food and Drugs Administration (FDA), to determine whether an investigational application is needed for a combination product, it should be considered the regulatory requirements for an investigational new drug application (IND) or an investigational device exemption application (IDE). Typically, an IND is submitted if the combination product has a drug or biologic primary mode of action (PMOA) and an IDE if the combination product has a device PMOA. In fact, combination products are typically marketed under a single marketing authorization type associated with the constituent part that provides the primary mode of action (PMOA) for the combination product (i.e., a new drug application (NDA) or abbreviated new drug application (ANDA) if it has a drug PMOA, a biologic license application (BLA) if it has a biologic PMOA, or a premarket approval application (PMA) de novo certification, or premarket notification. Clinical studies as the primary support for the safety and effectiveness of a combination product for a proposed indication should be provided (Services ; (FDA)).

Overall, combination therapies have been increasingly used either to improve compliance or to benefit from the added effects of the two medicinal products given together. The improvements in the field of ocular drug delivery research

based on combinatorial treatments may bring about novel methods for better management of ocular diseases.

Conflicts of Interest

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgements

Authors acknowledge the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MAT2013-43127-R and MAT2017-83858-C2-1-R) and ISCIII-FEDER “Una manera de hacer Europa” RETICS: RD16/0008, and UCM Research Group 920415. First author AAR thanks MINECO for the fellowship granted (BES-2014-070041), author DGH thanks UCM-Santander fellowship (CT17/17-CT17/18).

