



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Universidad Politécnica de Valencia

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural
(ETSIAMN)**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NANOVESÍCULAS EN CÉLULAS DE RETINA.

Alumna:

CELIA GONZÁLEZ GIL

Tutora: Dra. Regina Rodrigo Nicolás

Tutora académica: Dra. Eloísa Jantus Lewintre

Curso Académico: 2015/2016

Valencia, Julio de 2016

TÍTULO

Evaluación de la toxicidad de nanovesículas en células de retina.

RESUMEN

La Retinosis Pigmentaria (RP) abarca un conjunto de distrofias hereditarias de retina que constituye la principal causa genética de ceguera en el mundo desarrollado. Tiene elevada heterogeneidad genética que hace difícil comprender los mecanismos patogénicos que causan la muerte de los fotorreceptores (conos y bastones). Las mutaciones genéticas son las responsables de la muerte de los bastones. Sin embargo, los procesos inflamatorios podrían contribuir a la muerte de estas células. Se ha observado que la administración de un anticuerpo contra TNF α , Adalimumab (Humira®), reduce la degeneración retiniana en un modelo murino de RP.

Los sistemas de entrega de drogas basados en nanovesículas tipo *Quatsomes* o nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) son de gran interés por su biocompatibilidad, protección de la droga frente a su degradación, liberación controlada y sostenida de la droga o aumento de su estabilidad.

El objetivo de este trabajo es evaluar la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* de tres tipos de *Quatsomes*, la citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas MSM 41, como también la internalización celular de estas últimas; con el fin de utilizarlas como *nanocarriers* de agentes terapéuticos, como el Adalimumab, que reduzcan el proceso inflamatorio y con ello la progresión de la RP.

Los *Quatsomes* son unas nanovesículas formadas por colesterol y un surfactante amónico cuaternario, en este caso los surfactantes son CPC, CTAB y MKC. La citotoxicidad *in vitro* se evalúa mediante un ensayo de viabilidad celular denominado MTT utilizando la línea celular de fotorreceptores murinos 661W, lo que ha permitido conocer que los *Quatsomes* menos citotóxicos son los formados por el surfactante CTAB. Posteriormente, se analiza la toxicidad *in vivo* de este tipo de *Quatsomes* en retinas de ratones de la cepa C57Bl6. Tras los diferentes tratamientos, las capas nucleares de la retina no parecen estar alteradas; no se observa muerte celular, determinado mediante un recuento de las células TUNEL-positivas; como tampoco aparición de reacciones inflamatorias, lo que se visualiza mediante una inmunofluorescencia contra los marcadores celulares GFAP e Iba1 (marcadores de las células de Müller y de las células microgliales, respectivamente).

Las MSM 41 son unas nanopartículas mesoporosas de sílice que tienen su superficie funcionalizada con Adalimumab y Polietilenimina y que encierran en su interior el fluoróforo Sulforodamina B. Para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas MSM 41 se sigue el mismo procedimiento que para los *Quatsomes*, mediante un ensayo MTT, lo que ha permitido

comprobar que estas no son citotóxicas. Finalmente, se evalúa si las MSM 41 son capaces de acceder al interior celular, obteniendo unos resultados positivos.

Conclusión: Los resultados preliminares sugieren que los *Quatsomes* constituidos por CTAB podrían utilizarse como vehículo de drogas anti-inflamatorias para la retina y que las MSM 41 presentan una muy baja toxicidad y buena internalización en células retinianas.

Palabras clave:

Retinosis pigmentaria, *Quatsomes*, *nanocarrier*, nanopartícula, citotoxicidad, internalización, neuroinflamación.

ABSTRACT

Retinitis Pigmentosa (RP) comprises a set of hereditary retinal dystrophies which is the leading genetic cause of blindness in the developed world. Due to its high genetic heterogeneity it is difficult to understand the pathogenic mechanisms that cause the death of photoreceptors (rods and cones). Genetic mutations are responsible for the death of rods. However, inflammatory processes may contribute to the death of these cells. It has been observed that administration of an antibody against TNF α , Adalimumab (Humira®), reduces retinal degeneration in a mouse model of RP.

Delivery systems based in nanovesicles such as *Quatsomes* or mesoporous silica nanoparticles (MSMs) have a great interest for their biocompatibility, protection of the drug against the degradation, controlled and sustained delivery of the drug or increased stability.

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity of three types of *Quatsomes*, the *in vitro* cytotoxicity of nanoparticles MSM 41, as well as cellular internalization of the latter; in order to use them as *nanocarriers* of therapeutic agents, such as Adalimumab, which reduce the inflammatory process and thereby the progression of RP.

The *Quatsomes* are nanovesicles composed by cholesterol and quaternary ammonium surfactants; in this case the surfactants are CPC, CTAB and MKC. *In vitro* Cytotoxicity is assessed by a cell viability assay named MTT using the murine photoreceptors cell line 661W, which has revealed that the least cytotoxic *Quatsomes* are formed by the surfactant CTAB. Subsequently, the *in vivo* toxicity of this *Quatsomes* is analyzed in retinas of mice C57Bl6 strain. After the different treatments, nuclear layers of the retina does not appear to be altered; cell death is not observed, determined by scoring the number of TUNEL-positive cells; and they do not cause the appearance of inflammatory reactions, which is visualized by GFAP and Iba1 immunolabelling (Müller cells and microglial cells markers, respectively).

The MCM 41 are mesoporous silica nanoparticles having a functionalized surface with Adalimumab and Polyethyleneimine and enclosing the fluorophore Sulforhodamine B. The *in vitro* cytotoxicity of nanoparticles MSM 41 is evaluated following the same procedure, by MTT assay and results show that these are not cytotoxic. Finally it is assessed whether the MSM 41 are able to access to the cytoplasm cell, obtaining positive results.

Conclusion: The preliminary results suggest that *Quatsomes* composed by CTAB may be used as vehicle for anti-inflammatory drugs for the retina and MSM 41 nanoparticles have a very low toxicity and a good internalization in retinal cells.

Keywords:

Retinitis pigmentosa, *Quatsomes*, nanocarrier, nanoparticles, cytotoxicity, internalization, neuroinflammation.

Alumna:

Doña Celia González Gil

Localidad y fecha:

Valencia, Julio de 2016

Tutor:

Dra. Regina Rodrigo Nicolás

Tutor académico:

Dra. Eloísa Jantus Lewintre

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Regina Rodrigo haberme permitido realizar este trabajo bajo su dirección. Gracias por haberme ofrecido tu ayuda en todo momento, tu interés y tu tiempo.

Dar las gracias a todas las personas del laboratorio de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica por haberme acogido y ayudado, haciendo más fácil el trabajo. En especial, tengo que dar las gracias a Lorena, por enseñarme todo desde el primer día, estar siempre dispuesta a ayudarme, por sus consejos y su paciencia.

No podía olvidarme de lo más grande que me llevo de esta carrera, mis siete biotecnólogas (ahora ya oficialmente), que a pesar de haber estado separadas estos meses me han ayudado en todo lo que ha estado en sus manos, dándome siempre ánimos y haciéndolo todo más sencillo. Muchas gracias chicas.

Agradecer a mis amigos de siempre, mi chechipandi, por estar siempre apoyándome, escuchándome y haberme ayudado en todo lo que han podido.

Por último, dar las gracias a mi familia por su apoyo incondicional, su preocupación, por escucharme siempre (aunque la mayoría de veces no entiendan de lo que estoy hablando) y darme los mejores consejos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 RETINA Y CÉLULAS	1
1.1.1 Fotorreceptores	3
1.1.2 Células gliales.....	4
1.2 RETINOSIS PIGMENTARIA	5
1.2.1 Neuroinflamación.....	5
1.3 NANOTECNOLOGÍA DE SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS ...	8
1.3.1 <i>Quatsomes</i>	8
1.3.2 Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MSM 41)	10
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 MATERIALES	12
3.2 MÉTODOS.....	14
3.2.1 Ensayos <i>in vitro</i>	14
3.2.2 Ensayos <i>in vivo</i>	16
3.2.3 Análisis estadísticos	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1 ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	19
4.1.1 Evaluación de la citotoxicidad de las nanovesículas <i>Quatsomes</i>	19
4.1.2 Evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas MSM 41	22
4.1.3 Estudio de la internalización de las nanopartículas MSM 41	23
4.2 ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	25
4.2.1 Evaluación de la estructura de la retina	25
4.2.2 Análisis de la muerte celular programada en la retina.....	27
4.2.3 Evaluación de la activación de las células gliales de la retina.....	29
5. CONCLUSIONES.....	31
6. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales.....	12
Tabla 2. Concentraciones de las nanopartículas.....	15
Tabla 3. Tratamientos administrados intravítreamente	16
Tabla 4. Viabilidad, CC80 y CC50 de los tres <i>Quatsomes</i> evaluados en las células 661W.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de la retina.....	1
Figura 2. Capas y células de la retina.....	2
Figura 3. Células fotorreceptoras	3
Figura 4. Evolución de la RP	5
Figura 5. Administración intravítrea	8
Figura 6. <i>Quatsomes</i>	9
Figura 7. Evaluación de la citotoxicidad de los <i>Quatsomes</i> CPC	20
Figura 8. Evaluación de la citotoxicidad de los <i>Quatsomes</i> CTAB	20
Figura 9. Evaluación de la citotoxicidad de los <i>Quatsomes</i> MKC.....	21
Figura 10. Evaluación de la citotoxicidad de MSM 41	22
Figura 11. Evaluación de la internalización de MSM 41 [100 µg/mL]	23
Figura 12. Evaluación de la internalización de MSM 41 [200 µg/mL]	24
Figura 13. Análisis de la estructura de la retina	26
Figura 14. Análisis de la muerte celular programada de los fotorreceptores	28
Figura 15. Evaluación de la activación de las células gliales.....	30

ABREVIATURAS

ADA	Adalimumab
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
BSA	Suero albúmina bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CFN	Capa de fibras nerviosas
CNE	Capa nuclear externa
CNG	Capa nuclear ganglionar
CNI	Capa nuclear interna
CPC	Cloruro de cetilpiridino
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
dUTP	desoxiuridina trifosfato
EPR	Epitelio pigmentario retiniano
FC	Fluorescencia corregida
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
LM	Índice de migración
IBA	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado (<i>Ionized calcium binding adaptor molecule</i>)
IL	Interleuquina
MKC	Cloruro de miristalkonio
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna

MSN	Nanopartículas mesoporosas de sílice (<i>Mesoporous silica nanoparticles</i>)
MTT	Bromuro de 3- (4,5- dimetiltriazol- 2 -ilo) -2,5 -difeniltetrazol
NGS	Suero normal de cabra (<i>Normal goat serum</i>)
OCT	Compuesto de temperatura óptima de corte (<i>Optimal Cutting Temperature</i>)
PB	Tampón fosfato (<i>Phosphate buffer</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PEI	Polietilenimina
PFA	Paraformaldehído
QT	<i>Quatsomes</i>
RP	Retinosis pigmentaria
SBF	Suero bovino fetal
TdT	Terminal desoxinucleotidil transferasa
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor factor necrosis</i>)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transderase dUTPs nick and labeling</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RETINA Y CÉLULAS

La retina es la porción neural del ojo, se localiza en la parte posterior del globo ocular y forma parte del sistema nervioso central. Se encarga de crear imágenes en su superficie con ayuda de la córnea y el cristalino, las cuales transforma en señales eléctricas que envía al cerebro a través del nervio óptico (Purves *et al.*, 2001) (Fig. 1).

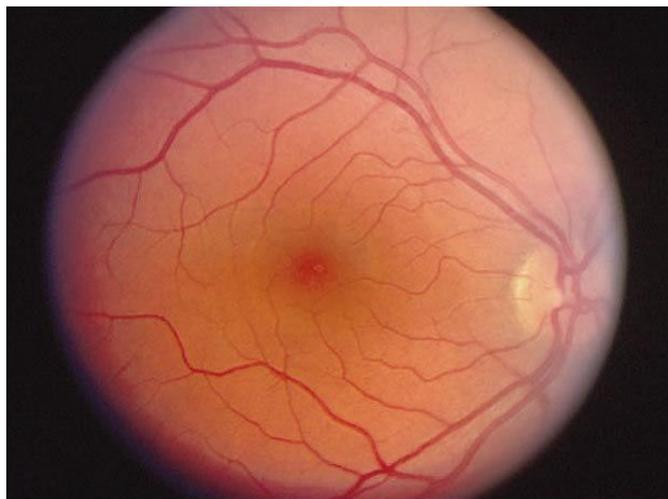


Figura 1. Imagen de la retina (Helga *et al.*, 1995a).

Aunque tiene un grosor de tan solo 0,3 mm, contiene varias capas de neuronas y de las conexiones que estas establecen. Hay cinco tipos de neuronas en la retina: fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares, células horizontales y células amacrinas (Freberg, 2009).

Como se muestra en la Figura 2, la primera capa es la capa nuclear ganglionar (CNG) donde se localizan las células ganglionares. Cada célula ganglionar tiene un único axón y el conjunto de axones forman el nervio óptico. La siguiente capa se denomina plexiforme interna (CPI), en la cual las células ganglionares establecen conexiones sinápticas con las células amacrinas y bipolares. Los cuerpos celulares de las células bipolares, amacrinas y horizontales se sitúan en la capa nuclear interna (CNI). A continuación, se halla la capa plexiforme externa (CPE) donde los fotorreceptores establecen conexiones sinápticas con las células horizontales y amacrinas. Posteriormente, se encuentra la capa nuclear externa (CNE) en la que se encuentran los cuerpos celulares de los fotorreceptores. En último lugar, se ubica la capa de los fotorreceptores que contiene los segmentos externos de dichas células. Esta capa es subyacente al epitelio pigmentario retiniano (EPR) (Freberg, 2009).

El epitelio pigmentario está formado por una sola capa de células post-mitóticas que rodean a la retina. Forma parte de la barrera hematorretinal y se encarga de regular el transporte de nutrientes desde los capilares sanguíneos (la coroides) hacia la retina, y productos de desecho desde la retina hacia la coroides. Contribuye a la regeneración de los segmentos externos de los fotorreceptores y a la fagocitosis de los discos no funcionales, protege el exterior de la retina de

una excesiva energía lumínica y de las especies reactivas de oxígeno generadas por la luz, y mantiene la homeostasis retinal a través de la liberación de diversos factores (Boulton & Dayhaw-Barker, 2001).

Hay que tener en cuenta que la luz que pasa a través de la córnea, el cristalino y el vítreo debe atravesar la mayor parte de las capas de la retina y vasos sanguíneos antes de llegar a la parte del fotorreceptor sensible a la luz, el segmento exterior (Purves *et al.*, 2001). Los vasos sanguíneos se encargan de nutrir al ojo mientras que los axones forman el nervio óptico en la parte trasera en una zona denominada disco óptico. Esta región no contiene ningún fotorreceptor, lo que le proporciona al ojo un punto ciego. Hacia la mitad de la retina se encuentra una zona de alrededor de 6 mm de diámetro denominada mácula, la cual carece de vasos sanguíneos y es la responsable de la visión central. En la parte central de la mácula, la retina se hace delgada y forma una depresión, lo que se conoce como fovea, que tiene alrededor de 1.8 mm de diámetro y contiene solo un tipo de fotorreceptores, los conos (Freberg, 2009).

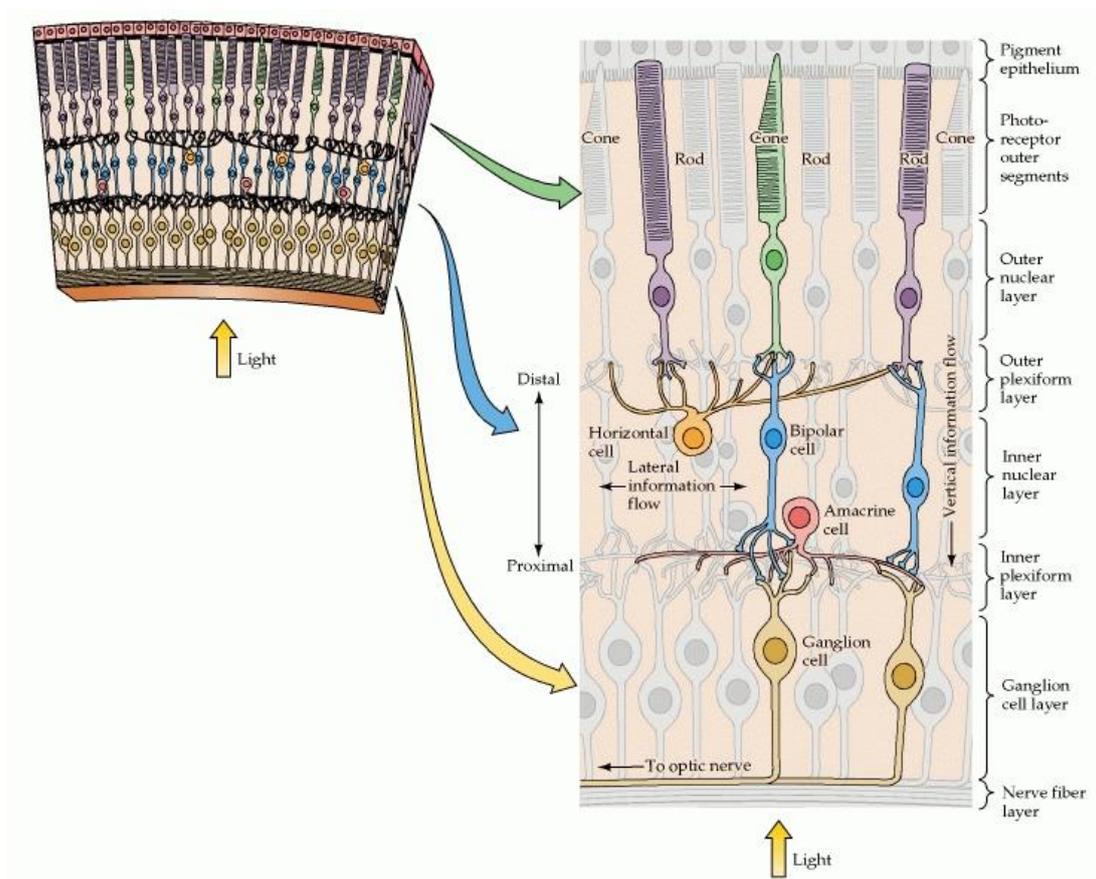


Figura 2. Capas y células de la retina. Ilustración esquemática de la distribución de las células de la retina en las diferentes capas que la componen (Purves *et al.*, 2001).

1.1.1 Fotorreceptores

Son las células de la retina sensibles a la luz y las encargadas de llevar a cabo la fototransducción, proceso por el cual la luz es convertida en señales eléctricas. Están formados por un segmento externo y un segmento interno. El segmento externo está formado por discos membranosos que contienen fotopigmentos. Estos pigmentos son los encargados de iniciar el proceso de la transducción visual y se extienden junto a la capa del epitelio pigmentario. El segmento interno contiene los núcleos de las células fotorreceptoras y es donde se establecen las conexiones sinápticas con las células bipolares y horizontales. Hay dos tipos de fotorreceptores, los conos y los bastones, denominados de este modo de acuerdo con la forma de sus segmentos externos. Los fotopigmentos de los conos y los bastones son también diferentes (Purves *et al.*, 2001).

Los bastones son los fotorreceptores que predominan en la región periférica de la retina y son los responsables de la visión escotópica, o habilidad de ver a bajas intensidades lumínicas. Sus segmentos externos tienen forma de cilindro alargado y contienen gran número de discos (Fig. 3). Los discos presentan gran cantidad de fotopigmentos, en concreto la rodopsina, lo que hace que los bastones tengan una sensibilidad a la luz 1000 veces mayor que los conos. Sin embargo, estos fotorreceptores no proporcionan información sobre el color ni sobre la forma de las imágenes. El ojo humano está formado por 120 millones de bastones aproximadamente (Freberg, 2009).

Los conos son los fotorreceptores que predominan en la fovea y son los responsables de la visión fotópica, o habilidad de ver a altas intensidades lumínicas. Sus segmentos externos son más cortos que los de los bastones. Los conos almacenan los fotopigmentos en pliegues de sus membranas en lugar de en discos (Fig. 3). Estos fotorreceptores aseguran la visión central y la percepción de los colores. Sin embargo, son menos sensibles a la luz. El ojo humano está formado por 6 millones de conos aproximadamente (Freberg, 2009).

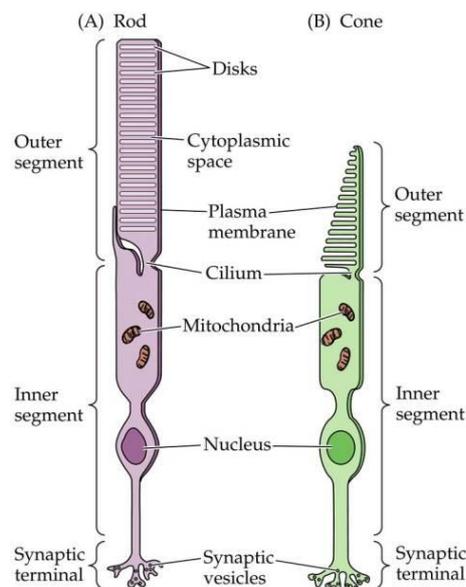


Figura 3. Células fotorreceptoras. Ilustración de las células fotorreceptoras: conos y bastones; y sus diferentes partes (Purves *et al.*, 2001).

1.1.2 Células gliales

La retina de los mamíferos contiene dos grandes grupos de células gliales: las células de la microglía y las células de la macroglía que a su vez está formada por los astrocitos y las células de Müller (Helga *et al.*, 1995b).

1.1.2.1 Células de la microglía

La microglía de la retina se origina a partir de células hematopoyéticas e invade el tejido retiniano, probablemente, a través de los vasos sanguíneos del cuerpo ciliar, del iris y de la vasculatura retiniana. Las células que componen la microglía tienen una distribución pluriestratificada y se localizan en la capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear ganglionar (CNG) y en capa de las fibras nerviosas (CFN) (Aize Kijlstra *et al.*, 2002).

Las células de la microglía poseen características propias de células dendríticas presentadoras de antígenos y funciones similares a los macrófagos. Por tanto, tienen capacidad de presentar antígenos y de fagocitar. Este tipo celular permanece latente en una retina adulta sana. Sin embargo, puede activarse por varios estímulos desempeñando un papel crítico en la defensa contra la invasión de microorganismos, la inmunoregulación y la reparación tisular (Aize Kijlstra *et al.*, 2002).

1.1.2.2 Células de Müller

Son las principales células gliales retinianas y se extienden a lo largo de toda la retina. Su cuerpo celular se localiza en la CNI y presenta dos ramificaciones principales: una limita con la membrana limitante interna (MLI), y la otra con la membrana limitante externa (MLE). A partir de estas dos ramificaciones surgen ramificaciones laterales que establecen conexiones sinápticas con las células localizadas en la CPI y CPE. Por tanto, constituyen un vínculo anatómico entre las neuronas de la retina y los compartimentos con los cuales intercambia moléculas (vasos sanguíneos, cuerpo vítreo y espacio subretinal) (Bringmann *et al.*, 2006.).

En una retina sana, las células de Müller están implicadas en el metabolismo de la glucosa, el aporte de nutrientes a las neuronas (Poitry-Yamate *et al.*, 1995; Tsacopoulos & Magistretti, 1996), la formación y mantenimiento de la barrera hematorretiniana (Tout *et al.*, 1993), la señalización neuronal, concretamente en la absorción y reciclaje de neurotransmisores (Matsui *et al.*, 1999) y ftopigmentos (Bunt-Milam & Saari, 1983), y el mantenimiento de la homeostasis del tejido retiniano (Bringmann *et al.*, 2004; Newman, 1996; Newman & Reichenbach, 1996). Son altamente resistentes a la isquemia, anoxia, o hiperglucemia (Silver *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1999). Por tanto, sobreviven a la mayoría de daños de la retina, y bajo condiciones patológicas pueden actuar como moduladores de las respuestas inmunes e inflamatorias (Caspi & Roberge, 1989; Roberge *et al.*, 1991). Además, son capaces de fagocitar fragmentos de las células de la retina y sustancias foráneas (Francke *et al.*, 2001; Mano & Puro, 1990).

1.2 RETINOSIS PIGMENTARIA

La retinosis pigmentaria (RP) constituye un grupo de enfermedades degenerativas caracterizadas por la pérdida de células fotorreceptoras y la deposición de pigmentos en el fondo del ojo con aspecto de espículas óseas, como se muestra en la Figura 4 (Hamel, 2006). Este grupo de distrofias de retina hereditarias son la principal causa genética de ceguera en el mundo desarrollado afectando a cerca de dos millones de personas. Se considera una enfermedad rara con una prevalencia de 1/4000 casos (Boughman *et al.*, 1980; Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2013).

Los pacientes con RP normalmente pierden la visión nocturna en la adolescencia y la visión periférica en la edad joven-adulta, pudiendo llegar a alcanzar una pérdida de la visión central. Esto se debe principalmente a la muerte progresiva de los fotorreceptores celulares: los conos y los bastones. La muerte de los fotorreceptores comienza con la degeneración de los bastones y finalmente se produce la muerte de los conos (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2013).

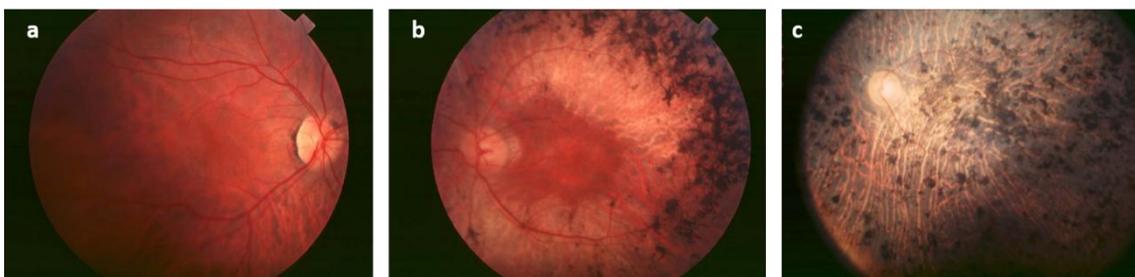


Figura 4. Evolución de la RP. a) Estado de la retina en una fase temprana de RP. b) Estado de la retina en una fase media de RP. c) Estado de la retina en una fase avanzada de RP (Hamel, 2006).

Se han identificado más de 80 genes involucrados en las distintas mutaciones que causan las diferentes formas de RP (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2013). Por tanto, se trata de una patología que presenta una gran heterogeneidad clínica y genética pudiendo ser autosómica recesiva, autosómica dominante o ligada al cromosoma X (Ayuso & Millan, 2010). Esta heterogeneidad dificulta comprender cuales son los mecanismos moleculares que causan la muerte de los fotorreceptores, y por tanto el avance de la enfermedad. Se sabe que las mutaciones genéticas son las responsables de la muerte de los bastones, pero la causa por la que los conos mueren no está clara y es una cuestión aún por resolver. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que el estrés oxidativo y la neuroinflamación contribuyen a su muerte (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2005).

1.2.1 Neuroinflamación

La neuroinflamación es un proceso presente en muchas enfermedades crónicas neurodegenerativas (Glass, *et al.*, 2010). En este proceso inflamatorio las células gliales tienen un papel muy importante. Las células de Müller sufren un proceso denominado gliosis reactiva, mientras que las células de la microglía median una respuesta inmune innata, contribuyendo ambos tipos celulares a la progresión de la enfermedad (García & Vecino, 2003; Langmann, 2007; Schuetz & Thanos, 2004).

1.2.1.1 Gliosis reactiva

Las células de Müller responden al daño de la retina cambiando su morfología, bioquímica y fisiología. Esta respuesta se denomina gliosis reactiva. No se conocen los mecanismos que desencadenan esta reacción que en un primer momento tiene un papel neuroprotector. La activación de estas células produce la liberación de diversas moléculas como antioxidantes, factores de crecimiento y citoquinas (García & Vecino, 2003). Sin embargo, una reacción exacerbada y prolongada produce neurotoxicidad, interfiriendo en la homeostasis de la retina y en la función de las células de Müller (García & Vecino, 2003).

Casi todas las enfermedades de la retina están asociadas con la gliosis reactiva de las células de Müller. Uno de los cambios que sufren estas células durante esta reacción es un aumento en el contenido de filamentos intermedios. En concreto, de la proteína glial ácida fibrilar (GFAP) la cual expresan a bajos niveles las células de Müller en condiciones fisiológicas (García & Vecino, 2003).

1.2.1.2 Activación de la microglía

Durante la fase temprana de la neurodegeneración existen factores endógenos, como el estrés oxidativo, que producen la activación de la microglía. Esto desencadena su proliferación; migración a los sitios de daño; y liberación de citoquinas (factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleuquina 1 α (IL1 α), interleuquina 1 β (IL1 β)) quimioquinas, neurotrofinas, glutamato, óxido nítrico (NO), aniones superóxidos y prostanglandinas. (Keller *et al.*, 1999; Langmann, 2007; Roy *et al.*, 2008). Aunque la función de estos procesos es prevenir el daño celular, la presencia de un alto nivel de estas moléculas, especialmente de las citoquinas, pueden causar una neurodegeneración progresiva y un avance de la RP (Hanisch & Kettenmann, 2007; Langmann, 2007; Schuetz & Thanos, 2004).

Por esta razón, los factores inhibitorios de las células gliales están siendo explorados para el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la RP (Yoshida *et al.*, 2013).

1.2.1.3 TNF α como diana terapéutica de retinosis pigmentaria

El factor de necrosis tumoral α (TNF α) es una citoquina pleiotrópica esencial para la inducción y el mantenimiento de las respuestas inmunes inflamatorias (Saxena *et al.*, 2011). Esta citoquina interviene en un amplio rango de actividades celulares como proliferación, supervivencia, diferenciación, inflamación y muerte celular a través de su unión a sus receptores (TNFR1 y TNFR2). En la retina es secretado por los macrófagos, astrocitos, microglía y células de Müller. La unión de TNF α a TNFR1, que se localiza en la superficie celular, media la activación de rutas de muerte celular en las que intervienen las caspasas, lo que en última instancia lleva a una muerte celular extrínseca (Nagata, 1997). También está involucrado en rutas intrínsecas de muerte celular iniciadas por un daño al ADN y a las células (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2014).

Estudios en ratones *rd*, modelo animal de RP, muestran que la activación de la microglía y la expresión de quimioquinas y citoquinas (especialmente TNF α) derivadas de la actividad microglial, coinciden o preceden con la mutación génica y la muerte de los fotorreceptores, sugiriendo que esta respuesta inflamatoria tiene un papel importante en la degeneración de la retina de estos ratones (Zeng *et al.*, 2005). En otro estudio, se ha visto que durante la

degeneración de retina en el mismo modelo animal hay un aumento en la producción de TNF α por parte de las células de la microglía (Zeng *et al.*, 2008). Un último estudio señala que la expresión génica de TNF α está aumentada en dos modelos de degeneración retiniana, lo que sugiere la ruta de señalización de TNF α como la principal vía de muerte celular en RP (Kanan *et al.*, 2010). Por tanto, son varias las evidencias que señalan a esta citoquina como uno de los principales desencadenantes de la degeneración de la retina en RP. Por todo ello, se plantea TNF α como una atractiva diana terapéutica, y la inhibición de su expresión y posteriores mecanismos de señalización como un posible tratamiento para la RP.

Actualmente, hay varios agentes anti-TNF α aprobados para su uso en clínica en diferentes enfermedades inflamatorias (Schulz *et al.*, 2014). Uno de estos agentes es Adalimumab (ADA), un anticuerpo monoclonal contra TNF α . Existen estudios que indican que la administración intraperitoneal de este anticuerpo reduce la muerte celular de los fotorreceptores, disminuye la expresión génica de TNF α y reduce la gliosis reactiva en un modelo animal de RP, el ratón *rd10*. (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2015). Por tanto, el bloqueo de TNF α podría ser una aproximación terapéutica para mejorar la supervivencia de los fotorreceptores en pacientes con RP (Martínez-Fernández de la Cámara *et al.*, 2015). Sin embargo, el tipo de administración utilizada presenta algunos inconvenientes como los derivados de ser una administración poco localizada (intraperitoneal) que puede afectar a otros órganos.

A diferencia de la administración intraperitoneal, la administración intravítrea implica la inyección de la droga directamente en el humor vítreo, como se muestra en la Figura 5, en forma de soluciones, partículas, suspensiones o implantes (del Pozo-Rodríguez *et al.*, 2013). Este tipo de administración ofrece altos niveles de liberación de la droga en la retina y reduce los efectos secundarios. Sin embargo, la farmacocinética de la administración intravítrea está afectada por varios factores. La geometría del ojo y la velocidad de difusión de la droga a través del humor vítreo influyen en la eliminación y en la cinética de la distribución. Cuando son grandes moléculas pueden ser retenidas en el humor acuoso durante semanas, sin embargo, pequeñas moléculas en solución muestran una retención menor con una vida de aproximadamente 2 horas (Thrimawithana *et al.*, 2011), lo que lleva a la necesidad de administraciones frecuentes que generan efectos adversos a corto plazo (Wadhwa *et al.*, 2009). A pesar de todo esto, se piensa que la encapsulación de las drogas puede mejorar estos aspectos, y en este campo la nanotecnología adquiere gran importancia (Thrimawithana *et al.*, 2011; Wadhwa *et al.*, 2009).

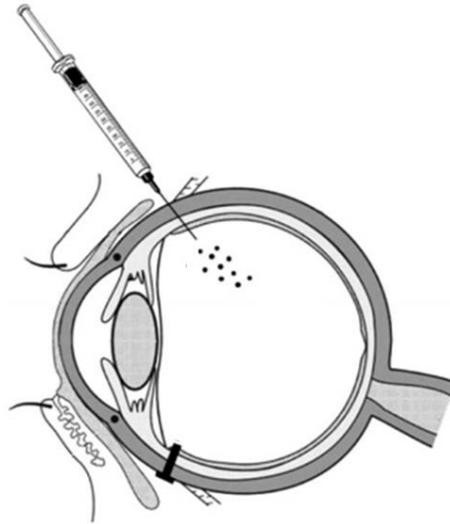


Figura 5. Administración intravítrea. Representación esquemática de la ruta de administración intravítrea de la droga a la parte posterior del ojo (Thrimawithana *et al.*, 2011).

1.3 NANOTECNOLOGÍA DE SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS

Como se ha comentado no existe actualmente ninguna terapia para detener o revertir la degeneración progresiva de las células fotorreceptoras en la RP. Uno de los problemas planteados a la hora de investigar nuevas terapias viene dado por la localización de la retina, situada en la parte posterior del ojo. Esto unido a la posible insolubilidad del fármaco en fluidos fisiológicos y su poca permeabilidad a través de las distintas barreras oculares (parénquimas esclerocorneal, epitelio y endotelio corneal, barrera hematorretiniana interna y externa, y membrana limitante interna de la retina) puede causar una baja biodisponibilidad del fármaco en este tejido (Kaur *et al.*, 2004).

Una solución a este problema es un sistema de encapsulación y liberación controlada de fármacos, y en este campo la nanotecnología ha conseguido grandes logros. Entre los diversos sistemas liberadores de fármacos existentes, las nanopartículas parecen ser especialmente útiles debido a su tamaño submicroscópico, su capacidad para mejorar la absorción corneal y para aumentar la biodisponibilidad del fármaco en su lugar de acción (Kirby *et al.*, 1980). Además, se trata de un sistema liberador adecuado para compuestos biológicamente activos pues no son tóxicas, son biodegradables y no inmunogénicas (Sawant & Torchilin, 2012).

Dentro de las nanopartículas, se hallan un tipo de nanovesículas denominadas *Quatsomes*, como también un tipo de nanopartículas denominadas Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MSN), ambas presentan unas propiedades que las plantean como buenos sistemas de encapsulación, transporte y liberación controlada de fármacos (Ferrer-Tasies *et al.*, 2013; Mamaeva *et al.*, 2013).

1.3.1 *Quatsomes*

Los *Quatsomes* son unas vesículas nanoscópicas, compuestas de esteroides y surfactantes amfipáticos cuaternarios (Fig. 6). Como cualquier tipo de nanovesícula, son entidades esféricas anfipáticas compuestas por una o varias capas lipídicas que envuelven un núcleo acuoso. En estas estructuras, las moléculas de colesterol se incorporan en la región hidrófoba de la bicapa, y

las moléculas del surfactante se organizan en dos capas, con los grupos de la cabeza en contacto con el agua y los de las cola en el interior de la bicapa (Ferrer-Tasies *et al.*, 2013).

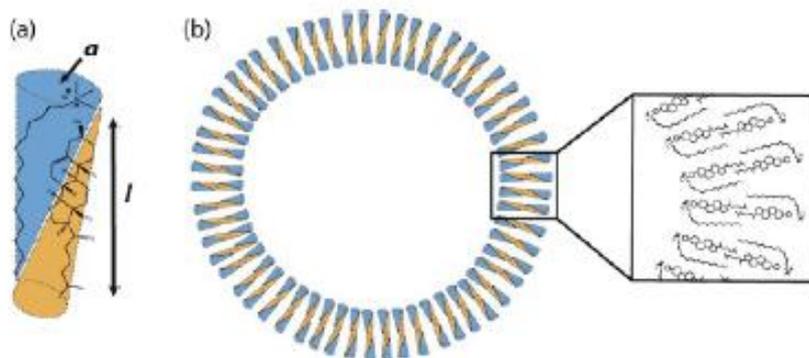


Figura 6. Quatsomes. a) Ilustración esquemática de la estructura del *Quatsome*. b) Ilustración de proceso de autoensamblaje de la bicapa vesicular (Ferrer-Tasies *et al.*, 2013).

Difieren de los liposomas en que estos últimos son unas vesículas compuestas principalmente por fosfolípidos, mientras que los *Quatsomes* están formadas por una región lipídica (colesterol) y una región no lipídica (surfactante) (Seyfoddin *et al.*, 2010). Además los liposomas tienen tendencia a autoensamblarse espontáneamente formando agregados y presentan una baja homogeneidad estructural, lo que dificulta su función como sistemas liberadores de fármacos (Ferrer-Tasies *et al.*, 2013). Sin embargo, los componentes de los *Quatsomes* no se agregan espontáneamente en estructuras vesiculares, pues en agua el surfactante amónico forma micelas y los esteroides son insolubles y forman cristales. Por tanto, para que se generen los *Quatsomes* se debe producir una sinergia entre ambas entidades moleculares (Ferrer-Tasies *et al.*, 2013).

Los *Quatsomes*, se caracterizan por ser estables durante periodos de tiempo de hasta varios años, por presentar una morfología que no varía con el aumento de la temperatura o dilución y tener una gran homogeneidad vesícula a vesícula en cuanto a tamaño, lateralidad y organización supramolecular de la membrana (Cano-Sarabia *et al.*, 2008; Elizondo *et al.*, 2012).

Por último, los principios activos de los fármacos se pueden integrar fácilmente, ya sea mediante una unión covalente al esteroil, por interacción electrostática con la cabeza catiónica del amonio de los surfactantes, por interacción hidrófoba con la bicapa o en el interior del lumen acuoso. Por todo ello, los *Quatsomes* se presentan como un nuevo sistema coloidal de liberación controlada de fármacos (Elizondo *et al.*, 2012), en los cuales se puede encapsular el principio activo dirigido a detener el ambiente hostil generado en la retina durante el desarrollo de la patología RP.

En este trabajo se utilizan tres tipos de *Quatsomes* que difieren entre ellos en el tipo de surfactante amónico cuaternario por el que están compuestos. El primer tipo está formado por el surfactante cloruro de cetilpiridino (CPC), el segundo por bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y el tercero por cloruro de miristalkonio (MKC).

1.3.2 Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MSM 41)

Las Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MSN) son uno de los sistemas inorgánicos para transportar y liberar fármacos de manera controlada más prometedores. Presentan una estructura mesoporosa con una gran área superficial lo que les proporciona propiedades únicas como por ejemplo, la capacidad de almacenar altas cantidades de moléculas farmacológicas para su posterior liberación. Además, son muy versátiles pues tanto el tamaño de poro como la porosidad pueden ser modificados adaptando las nanopartículas al tipo de droga que tienen que almacenar (Kresge *et al.*, 1992).

Si se comparan con otros sistemas liberadores de fármacos tradicionales, como los liposomas o las emulsiones, las MSNs tienen una mayor estabilidad térmica y química, además de una biocompatibilidad y degradación controlable y una gran resistencia a la corrosión bajo condiciones extremas (Mamaeva *et al.*, 2013).

Otra gran ventaja es que poseen unas propiedades superficiales muy bien definidas, lo que permite una sencilla funcionalización. Esto es muy importante, pues de este modo se pueden almacenar moléculas farmacológicas muy versátiles (hidrofóbicas/hidrofílicas, carga positiva/carga negativa), como también facilitar la adhesión de moléculas que favorezcan el reconocimiento de la diana sobre la cual tiene que liberar su contenido (Lin *et al.*, 2011). Por último, pueden presentar en su superficie canales capaces de ser abiertos o cerrados por medio de estímulos externos (Coll *et al.*, 2013), lo que permite que liberen su contenido en función de un estímulo químico, físico o bioquímico.

En este trabajo, se emplean un tipo de MSNs denominadas MSM 41 que presentan una superficie funcionalizada con Polietilenimina (PEI) y ADA. La PEI es un polímero que mejora la solubilidad de la nanopartículas, reduce las uniones no específicas a proteínas de la sangre o macrófagos y facilita la endocitosis de las MSN41 por parte de las células. Por otro lado ADA, es el anticuerpo dirigido a bloquear la señalización de $TNF\alpha$, por tanto, es el agente farmacológico de la nanopartícula. Por último, en el interior encierra un fluoróforo, la Suforodamina B, que facilita información sobre la localización de las MSM 41.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es evaluar la toxicidad en células retinianas de dos tipos de nanopartículas, con la finalidad de utilizarlas en el futuro como *nanocarriers* de fármacos que retrasen la degeneración retiniana en la patología RP.

1. Evaluación de la toxicidad de las nanovesículas tipo *Quatsomes* en células retinianas.

- 1.1. Citotoxicidad de tres tipos de *Quatsomes* (CTAB, CPC y MKC) a distintas concentraciones en la línea celular de conos 661W.
- 1.2. Toxicidad *in vivo* del tipo de *Quatsomes* menos tóxico en retina de ratón control.

2. Evaluación de la citotoxicidad e internalización de las nanopartículas tipo MSN en células retinianas.

- 2.1. Citotoxicidad de las nanopartículas MSN41 a distintas concentraciones en la línea celular de conos 661W.
- 2.2. Internalización de las nanopartículas MSN41, a diferentes tiempos y concentraciones, en la línea celular de conos 661W.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Tabla 1. Materiales

MATERIAL	CASA COMERCIAL
CULTIVOS CELULARES	
Frascos T-75	Greiner Bio-One
Placas 96 pocillos	Greiner Bio-One
Placas 24 pocillos	Greiner Bio-One
DMEM:F12	Biowest
SBF	Biowest
Glutamina (200mM)	Biowest
Penicilina/Estreptomicina (100U/mL)	Biowest
ENSAYO MTT	
MTT (0,5mg/mL)	Sigma-Aldrich
PBS 10X (1M)	Fisher Bioreagents
DMSO	Sigma-Aldrich
Lector de placas Halo LED 96	Dynamica
INTERNALIZACIÓN MSNs	
Hoescht 33342 (1 mM)	Thermo Fisher
PBS	Biowest
Fluoromount	Sigma-Aldrich
PROCESADO TISULAR	
PFA	Sigma-Aldrich
Sacarosa	AppliChem
OCT	Leica Biosystems
2-Metil-Butanol	Sigma-Aldrich
Criostato	Leica CM1900

ENSAYO TUNEL	
PFA	Sigma-Aldrich
PBS 1M	Fisher Bioreagents
Etanol	EMD Millipore
Ácido acético	Sigma-Aldrich
PROTEINASA K (20µl/ml)	Roche
Kit TUNEL: <ul style="list-style-type: none"> • Equilibration Buffer • Reaction Buffer • TdT Enzyme • Blocking Solution • Stop Buffer • Anticuerpo Anti-Digoxigenina-Rodamina 	EMD-Millipore
DAPI	Invitrogen, Life Technologies
Fluoromount	Sigma-Aldrich
Portaobjetos	Deltalab
INMUNOHISTOQUÍMICA IBA1 y GFAP	
PFA	Sigma-Aldrich
PBS 1M	Fisher Bioreagents
Triton X-100 10M	Sigma-Aldrich
Citrato sódico 10mM	Sigma-Aldrich
BSA	Acros Organics
NGS	Sigma-Aldrich
Anticuerpos primarios: <ul style="list-style-type: none"> • Anti-Iba 1 (1:300) • Anti-GFAP (1:400) 	Wako Pure Chemical Industries Sigma-Aldrich
Anticuerpos secundarios: <ul style="list-style-type: none"> • Alexa Fluor 647 • Alexa Fluor 555 	Invitrogen, Life Technologies Invitrogen, Life Technologies
DAPI	Invitrogen, Life Technologies

Portaobjetos	Deltalab
Fluoromount	Sigma-Aldrich
MICROSCOPIA	
Microscopio Confocal Leica TCS SP5	Leica Microsistemas SLU

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ensayos *in vitro*:

En esta apartado se explican los métodos utilizados para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de las nanovesículas *Quatsomes* y de las nanopartículas MSM 41.

3.2.1.1 Cultivo celular

En este trabajo se utiliza una línea celular inmortal de fotorreceptores murinos, en concreto conos: la línea celular 661W. Una vez descongeladas, se cultivan en frascos T-75 con medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F-12) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 4mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomycin y 0,004% de β-mercaptoetanol y se mantienen a 37°C en una atmósfera humidificada y con un 5% CO₂. La línea 661W se dobla cuando están confluyentes, aproximadamente dos veces por semana.

Viabilidad celular: Ensayo de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Para evaluar la citotoxicidad tanto de los *Quatsomes* como de las MSNs en las células 661W, se determina la viabilidad celular mediante un ensayo MTT. El ensayo MTT es un test colorimétrico que se basa en la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este proceso es realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas, que transforma el MTT, compuesto hidrofílico de color amarillo, en un compuesto hidrofóbico de color azul con una absorbancia de 570 nm, el formazán. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Hansen *et al.*, 1989).

Las células se cultivan en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 25.000 células/pocillo. A las 24 horas se tratan con concentraciones crecientes de los dos tipos de nanopartículas a evaluar: *Quatsomes* y MSM 41 (Tabla 2). En el caso de los *Quatsomes* se evalúa la toxicidad de tres tipos que difieren en el surfactante por el que están formados: CTAB, CPC y MKC. Como Control se cultivan las células en medio de cultivo que no contienen ningún tratamiento.

Tabla 2. Concentraciones de las nanopartículas con las que se tratan las células

Tipo de nanopartícula	Concentración (µg/mL)												
	<i>Quatsomes</i>	0	0,005	0,01	0,02	0,05	0,25	0,5	1	2,5	5	10	25
MSM 41	0		20		50		75		100		150		200

Transcurrido el tiempo de tratamiento, 24 y 48 horas, se realiza el ensayo de viabilidad celular MTT. Para ello se adicionan 10 µl/pocillo del reactivo MTT 0,5 mg/mL y se incuba durante 2-4 horas a 37°C en 5% CO₂ y un ambiente humidificado. Pasado este tiempo, se elimina el medio, las células se lavan con PBS 0,1M y se añade 100 µL/pocillo de dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales precipitados del formazán. La formación de este compuesto azul se mide en el lector de placas a una longitud de onda de $\lambda = 570$ nm. Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la media de la absorbancia de los pocillos Control, que se considera el 100% de la viabilidad. La viabilidad celular se determina siguiendo esta ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{A_p}{A_c} \times 100$$

Donde A_p es la media aritmética de la absorbancia de la muestra problema y A_c la media aritmética de la absorbancia del control.

3.2.2.1 Evaluación de la internalización de las MSM 41

El objetivo de este ensayo es conocer si las MSM 41 son correctamente internalizadas. Estas nanopartículas contienen en su interior un fluoróforo, Sulforodamina B, lo que permite identificar su localización.

Para evaluar la internalización de las nanopartículas, se cultivan las células 661W en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 50.000 células/pocillo. El fondo de los pocillos está provisto con un cubreobjetos, de este modo las células crecen adheridas a él. A las 24 horas, se cambia el medio de cultivo y se adiciona uno nuevo que contiene concentraciones crecientes de las nanopartículas, en concreto: 100 y 200 µg/mL. Como Control del ensayo, se adiciona medio que no contiene ningún tipo de tratamiento. La internalización se evalúa a diferentes tiempos: 0,5, 1, 2 y 24 horas. Pasados cada uno de los tiempos, se retira el medio, se lava con PBS 0,1 M y se incuba con el fluoróforo Hoescht 33342 (5µM) durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se vuelve a lavar con PBS 0,1M, se montan los cubreobjetos con medio de montaje (Fluoromount) y se observan las diferentes muestras al microscopio confocal.

3.2.3 Ensayos *in vivo*

En esta apartado se explican los métodos utilizados para evaluar la toxicidad *in vivo* de las nanopartículas *Quatsomes*, en concreto del tipo de *Quatsomes* formado por el surfactante CTAB.

3.2.3.1 Procesado tisular

Previamente a este trabajo, se seleccionaron cinco ratones control de la cepa C57B16 con una edad de seis meses. Se anestesiaron para, posteriormente, administrarles mediante inyecciones intravítreas los tratamientos. Se les inyectó dos tipos de tratamientos (Tabla 3): los *Quatsomes* compuestos por el surfactante CTAB o el surfactante CTAB a dos concentraciones distintas, para comprobar la toxicidad *in vivo* de la nanovesícula completa y del surfactante CTAB. Las inyecciones únicamente se les aplicaron en el ojo izquierdo, sirviendo el derecho como control.

Tabla 3. Tratamientos administrados intravítreamente en los ojos izquierdos de los ratones

Tratamiento	Volumen (μ l)	Concentración final en el humor vítreo (μ g/ μ l)
Surfactante CTAB [5 mg/mL]	2	2
Surfactante CTAB [5 mg/mL]	1	1
<i>Quatsomes</i> ([CTAB]= 5 mg/mL)	2	2
<i>Quatsomes</i> ([CTAB]= 5 mg/mL)	1	1

Pasados 15 días, se procede a enuclear ambos ojos de cada ratón y se fijan en 1 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% durante dos horas. A continuación, se extrae el cristalino para favorecer la crioprotección de la retina, situada en la parte posterior del ojo. Tras esto, los ojos se crioprotegen en soluciones en gradiente creciente de sacarosa (15-20-30%) para deshidratar el tejido y evitar que se altere durante la inclusión. Posteriormente se incluyen en OCT, una resina que contribuye a la crioprotección del tejido y ayuda a endurecerlo facilitando el subsiguiente corte en el criostato. Por último, se congelan las muestras en 2-metil-butanol y se realizan cortes de 10 μ m en el criostato para realizar las posteriores pruebas histológicas.

3.2.3.2 Ensayo TUNEL

Uno de los métodos más usados para detectar ADN dañado es el ensayo *Terminal deoxynucleotidyl transferas dUTP nick end labeling* (TUNEL) (Gavrieli *et al.*, 1992)

Para llevar a cabo este ensayo, se parte de los cortes de retina realizados en el criostato. El primer paso es fijar las muestras en PFA al 1% en PBS 0,1M durante 20 minutos. Se requiere de una postfijación con Etanol: Acético (2:1) durante 5 minutos a -20°C para permeabilizar el tejido y facilitar la posterior acción enzimática. A continuación, se incuban los cortes con PROTEINASA K durante 15 minutos a temperatura ambiente, que junto con la acción del Etanol: Acético aumenta la permeabilidad tisular. Pasado este tiempo, se lavan las muestras con

PBS 0,1M. Posteriormente, se utiliza un kit de detección de muerte celular *in situ* siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes de retina se incuban con la enzima *Working Strenght TdT* durante 1 horas y 20 minutos a 37°C en un ambiente húmedo. Esta enzima adiciona dUTPs marcados con digoxigenina a los fragmentos de ADN que está sufriendo un proceso de apoptosis. Tras el tiempo de incubación, es necesario parar la acción enzimática, para ello se prepara en una jarra Coplin 77,7mL de H₂O + 2,3 mL de *Stop Buffer*, donde se incuban las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurridos los 10 minutos, se lava con PBS 0,1M y se incuba con el anticuerpo Anti-digoxigenina-rodamina durante 40 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Este anticuerpo reconoce la digoxigenina de los dUTPS y al ir conjugado con el fluoróforo rodamina puede ser visualizado posteriormente al microscopio confocal. En este paso, las muestras del control negativo, pertenecientes a retinas de ratón *rd10* (modelo animal de RP), no se incuban con el anticuerpo Anti-digoxigenina. A continuación, se lavan las muestras con PBS 0,1M. Previamente a la incubación con el fluoróforo DAPI, se hace un lavado con H₂O pues el fluoróforo se encuentra en una solución de H₂O a una concentración de 1 µg/mL. Una vez realizado el lavado, se incuban con el fluoróforo DAPI durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para poder visualizar al microscopio los núcleos celulares. Se vuelven a lavar las muestras con H₂O, se montan los portaobjetos con medio de montaje (Fluoromount) y se observan en el microscopio confocal SP5 de Leica Microsystems.

3.2.3.3 Inmunohistoquímica de Iba1 y GFAP

Esta técnica inmunohistoquímica se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales para la detección de antígenos específicos en secciones tisulares. El sitio de unión del anticuerpo al antígeno determinado se observa gracias al marcaje con una sonda fluorescente, con una enzima, un elemento radioactivo o con oro coloidal; que se une directamente al anticuerpo primario o a un anticuerpo secundario (Duraiyan *et al.*, 2012).

Para realizar la inmunohistoquímica, los cortes de retina se fijan en PFA al 4% preparado en tampón fosfato (PB) 0,1M pH 7,4, previamente filtrado, durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se permeabilizan las muestras con tampón citrato sódico 10mM, pH 6 durante 5-7 minutos. Posteriormente, se tratan una hora con una solución de bloqueo que contiene 5% de suero normal de cabra (NGS), 1% de suero albúmina bovina (BSA) y 0,25 de Triton X-100 10M, lo que evita uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios. Seguidamente, se incuban las muestras con los anticuerpos primarios: Anti-Iba1 (1:300 hecho en conejo) y Anti-GFAP (1:400 hecho en ratón); los cuales se preparan en tampón de bloqueo 2% (1% BSA + 2% NGS + PBS-Triton X-100). En este paso el control negativo, retina del modelo de ratón de RP *rd10*, se incuba únicamente con tampón de bloqueo 2%. La incubación se deja toda la noche a 4°C de temperatura. Pasado el tiempo de incubación, se lavan las muestras tres veces con PBS 0,1M y se incuban con los anticuerpos secundarios durante una hora y en oscuridad. Estos anticuerpos son ALEXA 555 (Anti-conejo, 1:400) y ALEXA 647 (Anti-ratón, 1:400). Tras esto, se realizan tres lavados con PBS y uno con H₂O. A continuación, se incuban las muestras con el fluoróforo DAPI (1µg/mL, en H₂O) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, lo que permite observar los núcleos celulares en el microscopio. Por último, se lavan las muestras con H₂O y con PBS, se montan los portaobjetos con medio de montaje (Fluoromount), y se miran al microscopio confocal SP5.

3.2.3.4 *Microscopía y cuantificación*

Las secciones de las retinas se examinan con el microscopio confocal SP5 perteneciente a la Unidad de Microscopía de la Unidad de la IIS-La Fe. El software ImageJ se utiliza para cuantificar el grosor y número de conos y bastones de la capa nuclear externa (CNE); el número de células Iba-1 y TUNEL positivas; y la fluorescencia corregida de GFAP.

En primer lugar, se mide el grosor de la CNE de la retina entera, normalizado al grosor de la capa nuclear interna (CNI) para evitar el sesgo derivado del ángulo del plano de la sección.

El grosor normalizado de la CNE se expresa como:

$$\frac{\text{Grosor de la CNE}}{\text{Grosor de la CNI}}$$

En segundo lugar se determina el número de células TUNEL positivas. Esto se representa como:

$$\frac{\text{Número de células TUNEL positivas en la CNE}}{\text{Grosor normalizado de la CNE}}$$

Para evaluar la activación de la microglía se mide el índice de migración (I.M) que se define como el número de células Iba-1 positivas de acuerdo con la capa de la retina en la que se localizan.

$$I.M = \frac{\sum(\text{Número de células Iba-1 positivas en cada capa} \times \text{Factor de ponderación de la capa})}{\text{Número de células Iba-1 positivas en la sección}},$$

siendo el factor de ponderación: 1 para la capa CNE; 0,5 para la capa CPE; y 0,25 para la capa CNI.

Por último es necesario cuantificar la fluorescencia de GFAP para lo que se calcula la fluorescencia corregida (FC) utilizando la siguiente fórmula:

$$FC = \text{Densidad integrada de la sección seleccionada} \\ - (\text{Área de la sección seleccionada} \times \text{Fluorescencia media del fondo})$$

Los resultados se expresan como la media +/- desviación estándar (SD).

El número de células TUNEL positivas, el índice de migración de la microglía y la fluorescencia corregida de GFAP se cuantifica para al menos tres secciones no adyacentes de la retina de cada grupo experimental.

3.2.4 **Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizan utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). En primer lugar, se comprueba la distribución Gaussiana de los datos utilizando el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov para cada conjunto de datos. Para los datos distribuidos normalmente, se realiza un test t-Student comparando los diferentes grupos con los controles. Para los datos no distribuidos normalmente se realiza un test Mann-Whitney U para comparar los diferentes grupos con los controles. Un p-valor < 0,05 se considera estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENSAYOS *IN VITRO*

4.1.1. Evaluación de la citotoxicidad de las nanovesículas *Quatsomes*

Los vehículos de liberación y encapsulación de fármacos se administran a través de varias rutas, en este caso mediante una administración intravítrea. Por tanto, además de presentar unas buenas características físico-químicas, estas vesículas deben cumplir otros requerimientos como ser estériles o no citotóxicas. Es por ello que para poder emplear los *Quatsomes* como *nanocarriers* de agentes terapéuticos que eviten o paralicen la degeneración de la retina en la patología RP, es necesario evaluar su citotoxicidad. Estas nanovesículas están formadas en una proporción 1:1 por colesterol y el surfactante amónico cuaternario. Dado que el colesterol es biocompatible, la posible citotoxicidad del *nanocarrier* se debe al surfactante. Por esta razón a lo largo de este apartado se habla de citotoxicidad de los tres tipos de surfactantes, pues son el posible componente citotóxico de los *Quatsomes*.

Para evaluar la citotoxicidad de los *Quatsomes* se lleva a cabo un ensayo MTT que proporciona información sobre el porcentaje de viabilidad y citotoxicidad de la línea de fotorreceptores murinos 661W cuando es tratada con diferentes concentraciones de las nanovesículas. Además se calcula la CC50 (concentración tóxica 50, es decir, la concentración de *Quatsomes* que reduce la viabilidad celular al 50%) y la CC80 (mínima concentración que se considera que produce un efecto citotóxico significativo por reducir la viabilidad alrededor de un 20%). Se dispone para valorar tres tipos de *Quatsomes* formados por surfactantes amónicos cuaternarios diferentes: cloruro de cetilpiridino (CPC), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y cloruro de miristalkonio (MKC). En la tabla 4, se muestra un resumen de la viabilidad celular, CC80 y CC50 de los tres *Quatsomes* analizados.

En primer lugar, se cuantifica la viabilidad celular de los *Quatsomes* formados por el surfactante CPC a dos tiempos: 24 y 48 horas (Fig. 7). A las 24 horas de tratamiento (Fig. 7a), la viabilidad celular se mantiene como la de las células no tratadas hasta una concentración de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, para la cual se reduce en aproximadamente un 20% con respecto a las no tratadas ($80 \pm 1\%$, p-valor $<0,0001$), siendo la CC50 de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. A las 48 horas, se observa una disminución significativa de alrededor del 20% de la viabilidad para la concentración 0,05 $\mu\text{g/mL}$ con respecto a las células no tratadas ($85 \pm 1\%$, p-valor $< 0,0001$) y la CC50 está entre 0,5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 7b).

Estos resultados indican que al aumentar el tiempo de exposición de las nanovesículas sobre las células, la viabilidad celular se reduce, pues para las mismas concentraciones los porcentajes de viabilidad celular son mayores a 24 horas que a 48 horas y la CC50 disminuye.

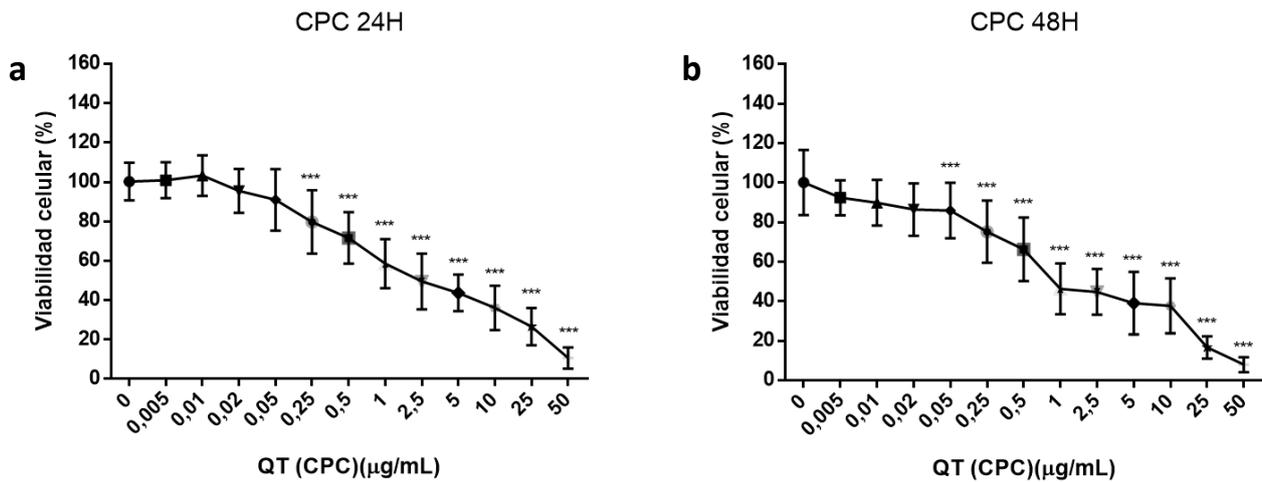


Figura 7. Evaluación de la citotoxicidad de los *Quatsomes* CPC. Gráfico de que representa el porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de las nanovesículas *Quatsomes* formadas por el surfactante CPC a un tiempo de 24 horas (**a**) y 48 horas (**b**). Los valores representan la media \pm SD de la viabilidad celular de cada pocillo del conjunto de placas sembradas. *** $p < 0,0001$.

Otro tipo de *Quatsomes* que se evalúa es el que está formado por el surfactante amónico cuaternario CTAB. Como en el anterior caso, la citotoxicidad se evalúa a 24 y 48 horas (Fig.8) Como se muestra en la figura 8a, a un tiempo de exposición de 24 horas empieza a tener una citotoxicidad significativa a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ pues a dicha concentración el porcentaje de viabilidad celular es de $83 \pm 1\%$ (p -valor $< 0,0001$) con respecto a las células no tratadas. En este caso, la CC50 es 10 $\mu\text{g/mL}$, cuatro veces mayor a la observada para el mismo tiempo en los *Quatsomes* formados por CPC. Si se evalúa el efecto a un tiempo de 48 horas (Fig. 8b) la concentración que reduce la viabilidad a un 20% es 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ($80 \pm 4\%$, p -valor= 0,0177) con respecto a las células no tratadas. La CC50 a las 48 horas es aproximadamente 5 $\mu\text{g/mL}$.

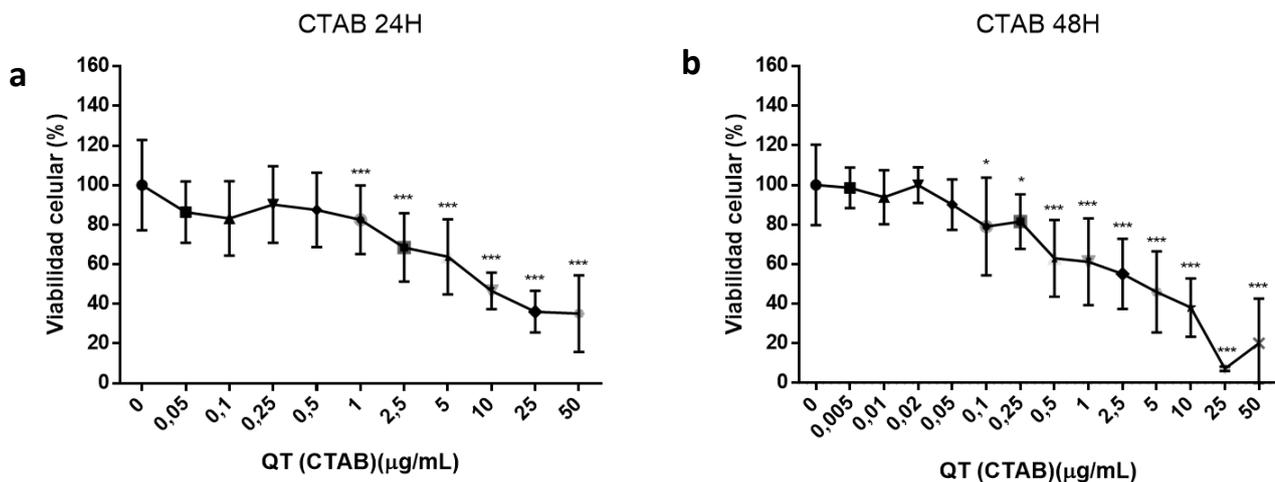


Figura 8. Evaluación de la citotoxicidad de los *Quatsomes* CTAB. Gráfico que representa el porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de las nanovesículas *Quatsomes* formadas por el surfactante CTAB a un tiempo de 24 horas (**a**) y 48 horas (**b**). Los valores representan la media \pm SD de la viabilidad celular de cada pocillo del conjunto de placas sembradas. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,0001$.

Por último, se cuantifica la citotoxicidad del tercer tipo de *Quatsomes* compuesto por el surfactante MKC (Fig. 9). En este caso, para un tiempo de exposición de 24 horas (Fig. 9a), el surfactante comienza a ser citotóxico a una concentración de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($83 \pm 1\%$, $p\text{-valor} < 0,0001$; respecto a las células no tratadas) y presenta una CC50 de 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para una exposición durante 48 horas (Fig. 9b) la concentración a la que se reduce la viabilidad un 15-20% es similar a la observada a las 24 horas, alrededor de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($82 \pm 1\%$, $p\text{-valor} < 0,0001$; respecto a las células no tratadas). Sin embargo, la CC50 es inferior, entre 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

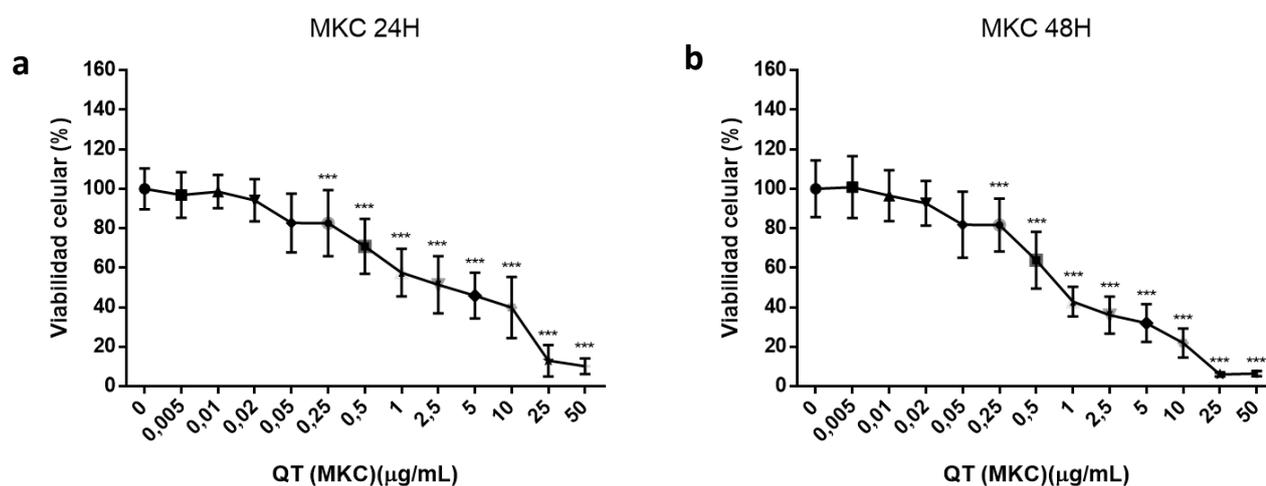


Figura 9. Evaluación de la citotoxicidad de los *Quatsomes* MKC. Gráfico que representa el porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de las nanovesículas *Quatsomes* formadas por el surfactante MKC a un tiempo de 24 horas (a) y 48 horas (b). Los valores representan la media + SD de la viabilidad celular de cada pocillo del conjunto de placas sembradas. *** $p < 0,0001$.

Haciendo una comparación del porcentaje de viabilidad, citotoxicidad y CC50 de los tres tipos de surfactantes a 24 y 48 horas (Tabla 4), se observa que los *Quatsomes* que contienen los surfactantes MKC y CPC son más citotóxicos que los que contienen CTAB, ya que las concentraciones a las que su efecto comienza a ser significativo son menores que para el caso del CTAB.

Por todo ello, son los *Quatsomes* formados por CTAB los elegidos para realizar estudios de toxicidad *in vivo*

Tabla 4. Viabilidad, CC80 y CC50 de los tres *Quatsomes* evaluados en células 661W

Tiempo de tratamiento	24 HORAS			48 HORAS		
Surfactante amónico cuaternario	CPC	CTAB	MKC	CPC	CTAB	MKC
CC80 ($\mu\text{g}/\text{mL}$): Concentración a la que la viabilidad celular es del 80%	0,25 – 0,5	1 – 2,5	0,05 - 0,25	0,05 - 0,25	0,1 – 0,5	0,05 – 0,25
CC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$): Concentración a la que la viabilidad celular es del 50%	2,5	10	2,5	0,5 - 1	5	0,5 - 1

4.1.2. Evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas MSM 41

En este trabajo también se analiza la citotoxicidad de las nanopartículas mesoporosas de sílice, MSM 41. Estas nanopartículas tienen su superficie funcionalizada con ADA, anticuerpo contra la citoquina TNF α , y PEI, polímero que facilita el proceso de endocitosis de la nanopartícula por parte de las células.

Para analizar la citotoxicidad sobre la línea celular 661W se sigue el mismo método que en el caso de los *Quatsomes*, realizando un ensayo MTT. Como se muestra en la Figura 10, el porcentaje de viabilidad celular se mantiene bastante alto para todas las concentraciones evaluadas. La concentración más citotóxica es la de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la cual la viabilidad celular es de $88 \pm 8 \%$, respecto a las células no tratadas.

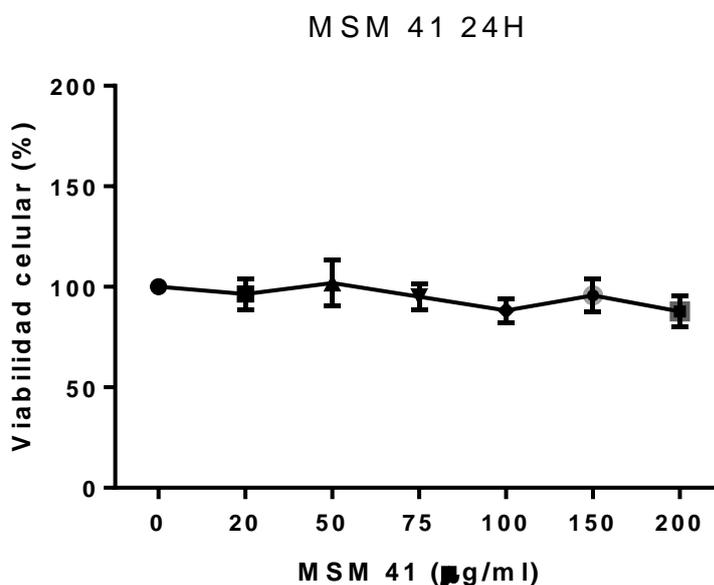


Figura 10. Evaluación de la citotoxicidad de MSM 41. Gráfico que representa el porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones de las nanopartículas MSM 41. Los valores representan la media \pm SD de la viabilidad celular de cada pocillo del conjunto de placas sembradas.

Si se comparan los resultados de citotoxicidad para los *Quatsomes* y las MSM 41, está claro que estas últimas son menos citotóxicas pues a pesar de que las concentraciones a las cuales se tratan las células son mayores que para el caso de los *Quatsomes*, su viabilidad celular nunca disminuye del 85%. Además, las MSM 41 son nanopartículas más completas pues ya contienen el agente terapéutico, el ADA, a diferencia de los *Quatsomes* donde únicamente se ha valorado la citotoxicidad del medio de encapsulación.

Los *Quatsomes* y las MSM 41 son medios de encapsulación diseñados para desempeñar su función de un modo ligeramente distinto. En el caso de las MSM 41, se dispone de una superficie funcionalizada con el agente terapéutico ADA dirigido a bloquear la cascada de señalización de la citoquina TNF α desde el exterior de la célula, y además se incluirán en el interior ARNs de interferencia (ARNi) para silenciar la expresión génica de TNF α . En el caso de los *Quatsomes*, solo se encapsulará en su interior ARNi. El siguiente paso será valorar la eficacia del bloqueo de la cascada de señalización de TNF α empleando estas nanopartículas.

Por tanto, se necesita seguir investigando en este campo para conocer qué sistema permite de un mejor modo paralizar la neuroinflamación que provoca el avance de la patología RP.

4.1.3. Estudio de la internalización de las nanopartículas MSM 41

Las nanopartículas MSM 41 están diseñadas con el objetivo de detener la señalización de la citoquina TNF α implicada en los procesos de neuroinflamación que favorecen la progresión de la RP. El TNF α es sintetizado en el interior celular y, posteriormente liberado al medio extracelular para unirse a sus receptores y comenzar la cascada de señalización. Por tanto, idealmente, estas nanopartículas tendrían que ser capaces de impedir la acción de la citoquina en el exterior y prevenir su síntesis en el interior.

En el exterior pueden desempeñar su función de un modo más sencillo. Sin embargo, se debe analizar si las nanopartículas tienen la capacidad de acceder al interior celular. Para facilitar este estudio, las MSM 41 contienen en su interior un fluoróforo, la Sulforodamina B, lo que hace que en el microscopio se visualicen de color rojo y proporciona información sobre su localización.

En primer lugar, se evalúa el proceso de internalización para una concentración de MSM 41 de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 11). Los núcleos celulares se tiñen con el fluoróforo Hoescht 33342 y en el microscopio se observan de color azul. Para un tiempo de 30 minutos, se observa que las MSM 41 no se encuentran en el interior del núcleo. Sin embargo, para una hora de exposición se observa como sí que aparecen nanopartículas en el interior nuclear pues se perciben puntos rojos, color al que se ve el fluoróforo que incorporan las nanopartículas al microscopio confocal. Lo mismo ocurre para un tiempo de 2 horas.

Tras 24 horas de tratamiento, las nanopartículas están completamente internalizadas y se distingue como en el núcleo celular aparece un agregado de MSM 41.

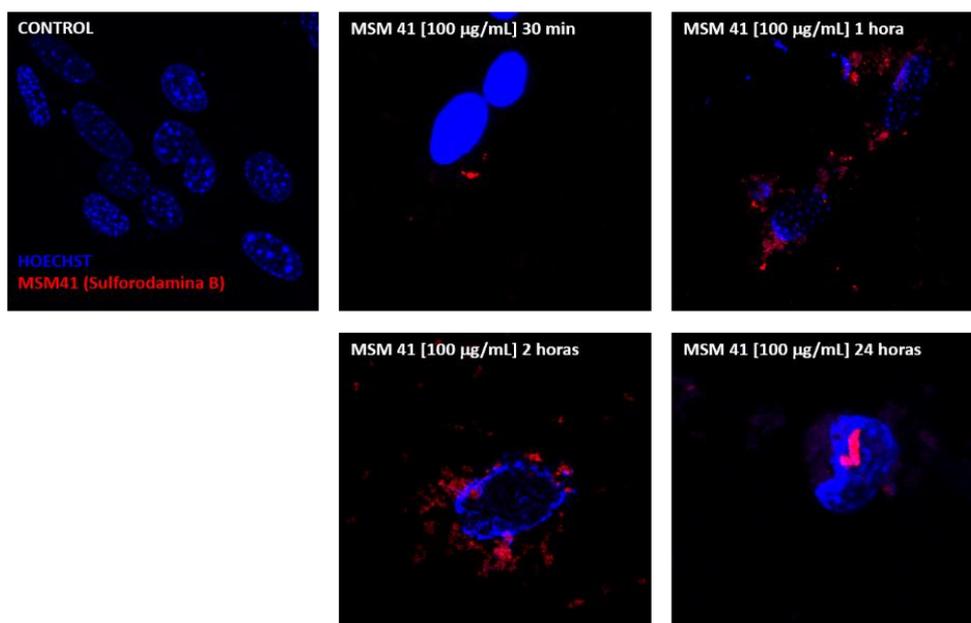


Figura 11. Evaluación de la internalización de MSM 41 [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Fotografías de los núcleos, de la línea celular 661W, marcados con Hoechst (azul) en los que se observa la internalización de las nanopartículas MSM 41 (rojo) a varios tiempos y a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Posteriormente, se analiza si la concentración de MSM 41 afecta a su internalización celular. Para ello, se evalúa el proceso de internalización a una concentración más elevada, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a distintos tiempos (Fig. 12). Tras una hora de exposición, las nanopartículas han sido capaces de atravesar la membrana plasmática, pues en la imagen se observan agregados de MSM 41 (color rojo) alrededor del núcleo. Sin embargo, para un tiempo de dos y 24 horas hay un menor número de agregados MSM 41 en el interior de la célula.

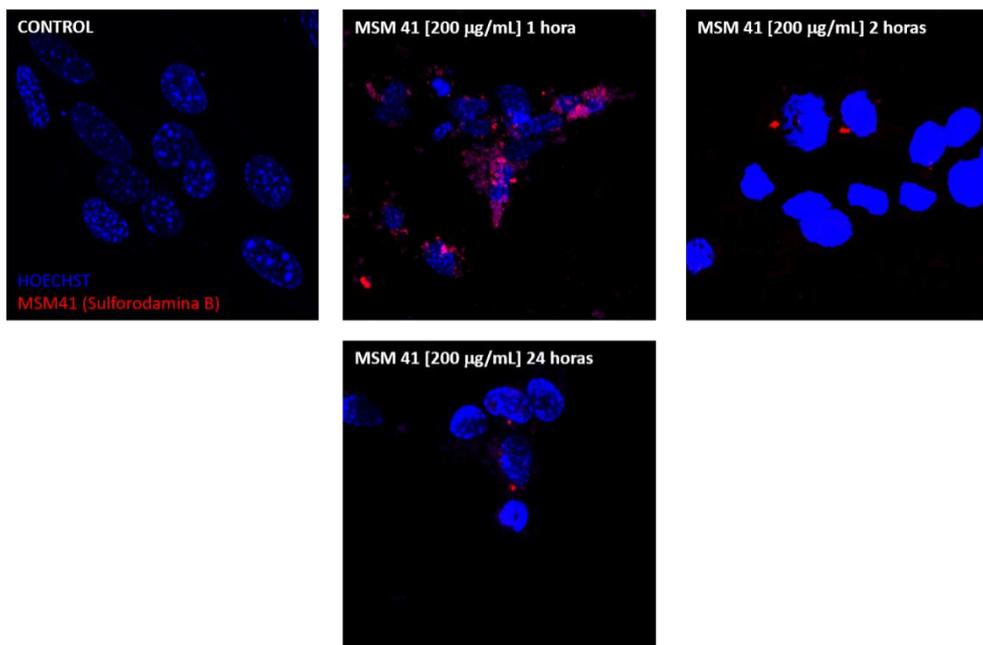


Figura 12. Evaluación de la internalización de MSM 41 [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Fotografías de los núcleos, de la línea celular 661W, marcados con Hoechst (azul) en los que se observa la internalización de las nanopartículas MSM 41 (rojo) a varios tiempos y a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Con este estudio preliminar se puede concluir que las nanopartículas MSM 41 son capaces de atravesar la membrana citoplasmática a las dos concentraciones evaluadas y en poco tiempo. Sin embargo, son necesarios más estudios que cuantifiquen el grado de internalización a los distintos tiempos y concentraciones.

4.2. ENSAYOS *IN VIVO*

Según los resultados obtenidos *in vitro*, se seleccionaron los *Quatsomes* formados por CTAB para evaluar la toxicidad *in vivo*. Además, para comparar el efecto del surfactante CTAB en los *Quatsomes* con el efecto del surfactante aislado también se inyecta CTAB. Se administra uno o dos μL de una concentración de 5 mg/mL de *Quatsomes* o de CTAB en el humor vítreo de ratones control. Dado que los ratones tienen aproximadamente 5 μL de humor vítreo, la concentración final de *Quatsomes* o CTAB es de 1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.2.1. Evaluación de la estructura de la retina

El objetivo de este estudio es encontrar unas nanovesículas que puedan ser utilizadas como *nanocarriers* de fármacos para el tratamiento de la degeneración de la retina en la patología RP. Por tanto, lo primero que hay que comprobar es si estas alteran la estructura original de la retina.

Para observar la citoarquitectura de la retina tras la inyección intravítrea, se tiñen los núcleos con el colorante DAPI. Esto permite comparar la estructura entre las retinas que se han tratado con *Quatsomes* o CTAB (ojo izquierdo) de las que no se han tratado (ojo derecho). Como se muestra en la Figura 13a, ninguno de los tratamientos administrados genera una alteración aparentemente significativa en la citoarquitectura, pues la disposición y el grosor de las diferentes capas que constituyen este tejido son similares en las retinas de los ojos tratados y en las retinas de los ojos control.

Para realizar un análisis cuantitativo de la posible alteración de la retina, el método seguido es el recuento del número de núcleos celulares en la capa nuclear externa (CNE), ya que en esta capa es donde se encuentran las células fotorreceptoras. En la Figura 13b se puede observar que la inyección intravítrea de CTAB parece reducir ligeramente el número de núcleos en la CNE con respecto a los ojos no inyectados. Esto podría llevar a pensar que el surfactante individualmente provoca muerte celular de los fotorreceptores y por tanto, una degeneración de la retina. Sin embargo, los análisis estadísticos preliminares revelan que ninguna de las diferencias entre ambos grupos es significativa. Por tanto, ninguno de los tratamientos altera la estructura original de la retina.

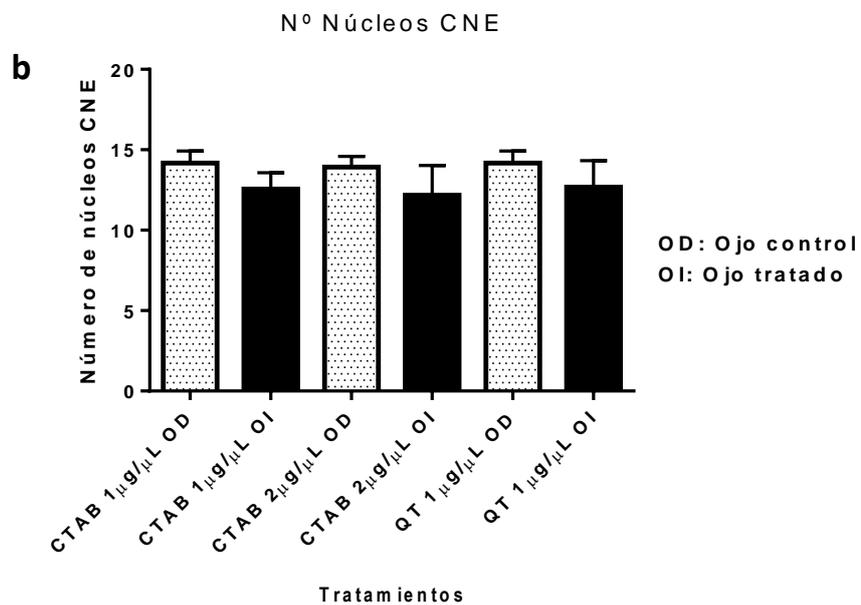
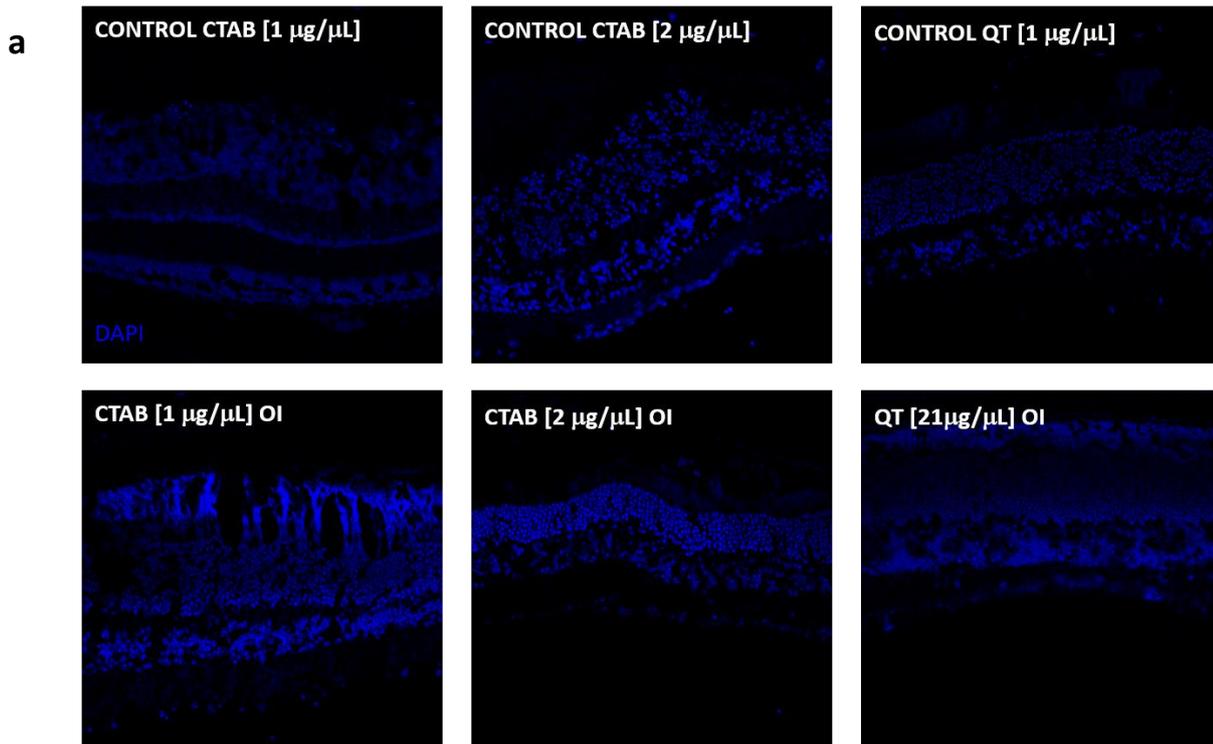


Figura 13. Análisis de la estructura de la retina. (a) Microfotografías de secciones representativas de retinas pertenecientes a los grupos control (ojo derecho) y grupos tratados (ojo izquierdo) teñidas con el fluoróforo DAPI. (b) Gráfico de barras que ilustra el número de núcleos de la CNE de las retinas control (ojo derecho) y tratadas (ojo izquierdo) para los tratamientos QT (1µg/µL) y CTAB (1 y 2 µg/µL). Los valores representan la media ±SD del recuento realizado para cada grupo.

4.2.2. Análisis de la muerte celular programada o apoptosis en la retina

Continuando con la evaluación de la toxicidad de las nanovesículas, el siguiente paso es comprobar si alguno de los tratamientos produce muerte celular programada, es decir, apoptosis. La razón de realizar este estudio es que de nada serviría un tratamiento dirigido a paralizar la degeneración retiniana si el propio *nanocarrier* está causando muerte celular. Para elaborar un análisis sobre la apoptosis de las células de la retina se ha realizado un ensayo TUNEL que permite detectar las roturas de ADN en células apoptóticas.

Comparando los grupos control y tratados para cada tratamiento administrado (Fig. 14a), se observa que para el tratamiento CTAB 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no aparece ningún núcleo teñido, lo que indica que el surfactante a esta concentración no produce muerte celular. Lo mismo ocurre para las retinas de los ojos tratados con los *Quatsomes*. Sin embargo, analizando las retinas tratadas con el CTAB 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se puede visualizar que para el grupo tratado (ojo izquierdo) aparece algún núcleo en la CNE teñido de rojo, lo que indica que en esta región habría células sufriendo un proceso apoptótico. Esto se verifica en la Figura 14b, que muestra de una forma ampliada la región de la retina donde se halla una célula en apoptosis. Los resultados obtenidos llevan a pensar que este tratamiento está produciendo muerte celular en la retina y que por tanto, el surfactante solo *in vivo* es citotóxico a una concentración elevada. Sin embargo, hay que analizar en detalle este efecto.

Para poder confirmar la importancia de lo observado en los análisis cualitativos, se requiere de un estudio cuantitativo basado en el recuento de número de células que aparecen teñidas de rojo, es decir, células TUNEL positivas. La Figura 14c corrobora lo observado en la Figuras 14a y 14b, y es que el único tratamiento que produce apoptosis es el surfactante CTAB a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sin embargo, el número de células TUNEL positivas que produce este tratamiento ($0,2 \pm 0,3$ células TUNEL positivas/ área normalizada) es mínimo y el análisis estadístico preliminar confirma que se trata de un valor no significativo respecto al valor del grupo control (ojo derecho).

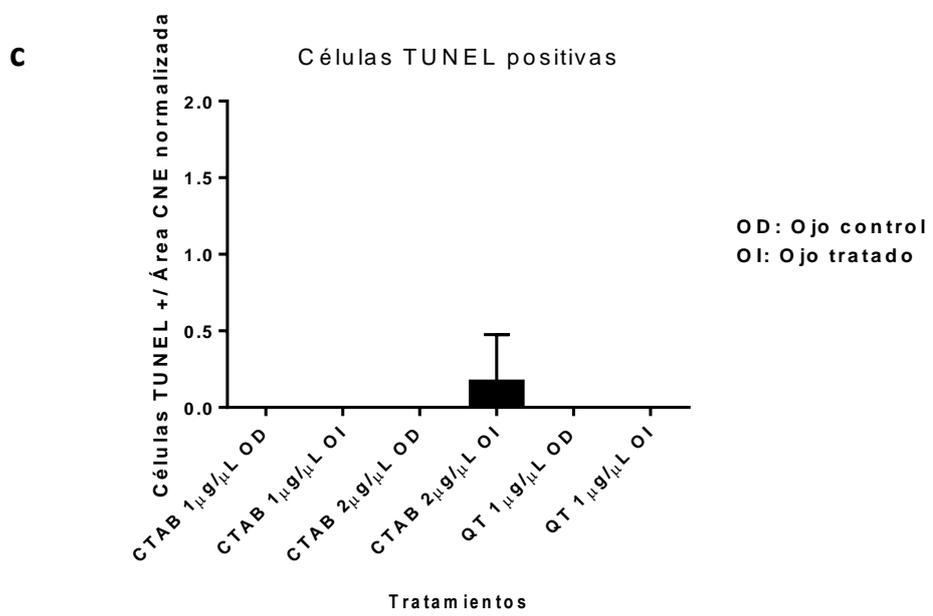
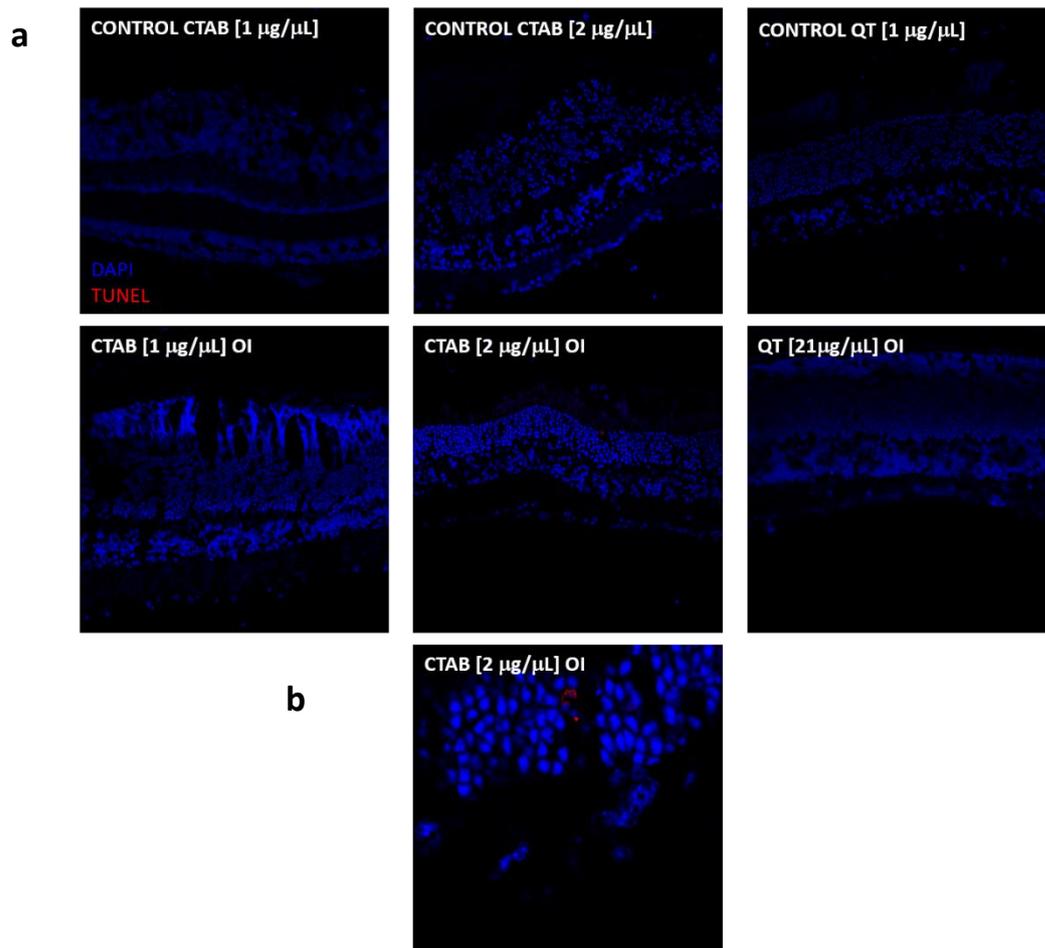


Figura 14. Análisis de muerte celular de los fotorreceptores. (a) Microfotografías de secciones representativas de retinas pertenecientes a los grupos control (ojo derecho) y grupos tratados (ojo izquierdo) marcadas con TUNEL y DAPI. (b) Microfotografía ampliada de una sección de retina perteneciente a un ojo tratado con el surfactante CTAB [2µg/µL] (c) Gráfico de barras que ilustra el efecto de los tratamientos administrados en la aparición de células TUNEL positivas en las retinas control (ojo derecho) y tratadas (ojo izquierdo). Los valores representan la media ±SD del recuento.

4.2.3. Evaluación de la activación de las células gliales de la retina

Uno de los sucesos que ocurren durante la progresión de la RP es la activación de las células gliales de la retina y los procesos de neuroinflamación en los que estas están involucradas. La finalidad de los *Quatsomes* es transportar moléculas dirigidas a inhibir la acción de la citoquina $TNF\alpha$, uno de responsables de estos procesos inflamatorios. Sin embargo, se requiere constatar que las nanovesículas por sí solas no provocan reacciones inflamatorias.

Las células de la microglía se identifican con un marcaje con Iba1 (se muestra de color rojo en las imágenes de la Figura 15), una proteína de unión a calcio que es específica de este tipo celular. Se considera que estas células están activadas cuando migran desde las capas más internas de la retina hacia las capas externas y cambian su morfología de ramificada a ameboide. Por tanto, un indicador de activación de la microglía es esta actividad migratoria y cambio de morfología. Los estudios preliminares no detectan un aumento de la migración de las células de la microglía a las capas externas de la retina en las secciones marcadas con el anticuerpo contra Iba1 (Fig. 15a) para ninguno de los tratamientos administrados. Pero esto se debe confirmar con una cuantificación de la migración y posterior análisis estadístico. Para ello, se realiza un análisis preliminar del índice de migración de las células de la microglía (Fig. 15b). Los valores cercanos a 1 indican mayor migración de las células hacia las capas externas. Analizando el efecto de los diferentes tratamientos se comprueba que el único que muestra un índice de migración mayor a cero, es el *Quatsomes* a una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($0,12 \pm 0,1$). Sin embargo, es necesario realizar más análisis aumentando el tamaño muestral.

Por otro lado, la activación de las células gliales también se manifiesta con una sobreexpresión en las células de Müller de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), una proteína de los filamentos intermedios (se muestra de color verde en las imágenes de la Figura 15). En la inmunofluorescencia de GFAP (Fig. 15a) se puede observar que para los tratamientos de *Quatsomes* 1 y $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ el marcaje GFAP positivo es mayor en los ojos tratados en la capa plexiforme externa (CPE) que en los ojos controles. Esto sugiere que podría haber activación de las células de Müller y por tanto un proceso inflamatorio.

Se analiza si el aumento de la intensidad de fluorescencia visualizada en los tratamientos (QT 1 y $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$) es significativa. Para ello, se cuantifica el contenido de GFAP de las retinas tratadas y en los controles. Como muestra la figura 15c, para los grupos tratados con los *Quatsomes* la intensidad de fluorescencia de GFAP es mayor que para los grupos control, lo que confirma lo visualizado en el análisis de las microfotografías. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas. Por otro lado, para los grupos tratados con el surfactante CTAB, el contenido de GFAP del grupo tratado es menor que el del grupo control. Esto no es lo esperado, pues en el caso de que no se diera activación de las células de Müller en las retinas tratadas, el nivel de intensidad de fluorescencia de ambos grupos debería ser similar. Pero estas diferencias observadas no son estadísticamente significativas. Por último, todos los valores de intensidad de fluorescencia de los ojos derechos, grupo control, deberían ser similares. Sin embargo, los análisis estadísticos revelan que estas diferencias tampoco se consideran significativas.

Estos resultados preliminares sugieren que los *Quatsomes* formados por CTAB no son especialmente tóxicos ya que no parecen afectar a la muerte celular ni desencadenar un proceso inflamatorio. Sin embargo, el surfactante solo CTAB sí podría ser neurotóxico. En cualquier

caso, es necesario realizar más estudios para estar seguros que los *Quatsomes* no producen ni muerte celular ni inflamación en la retina.

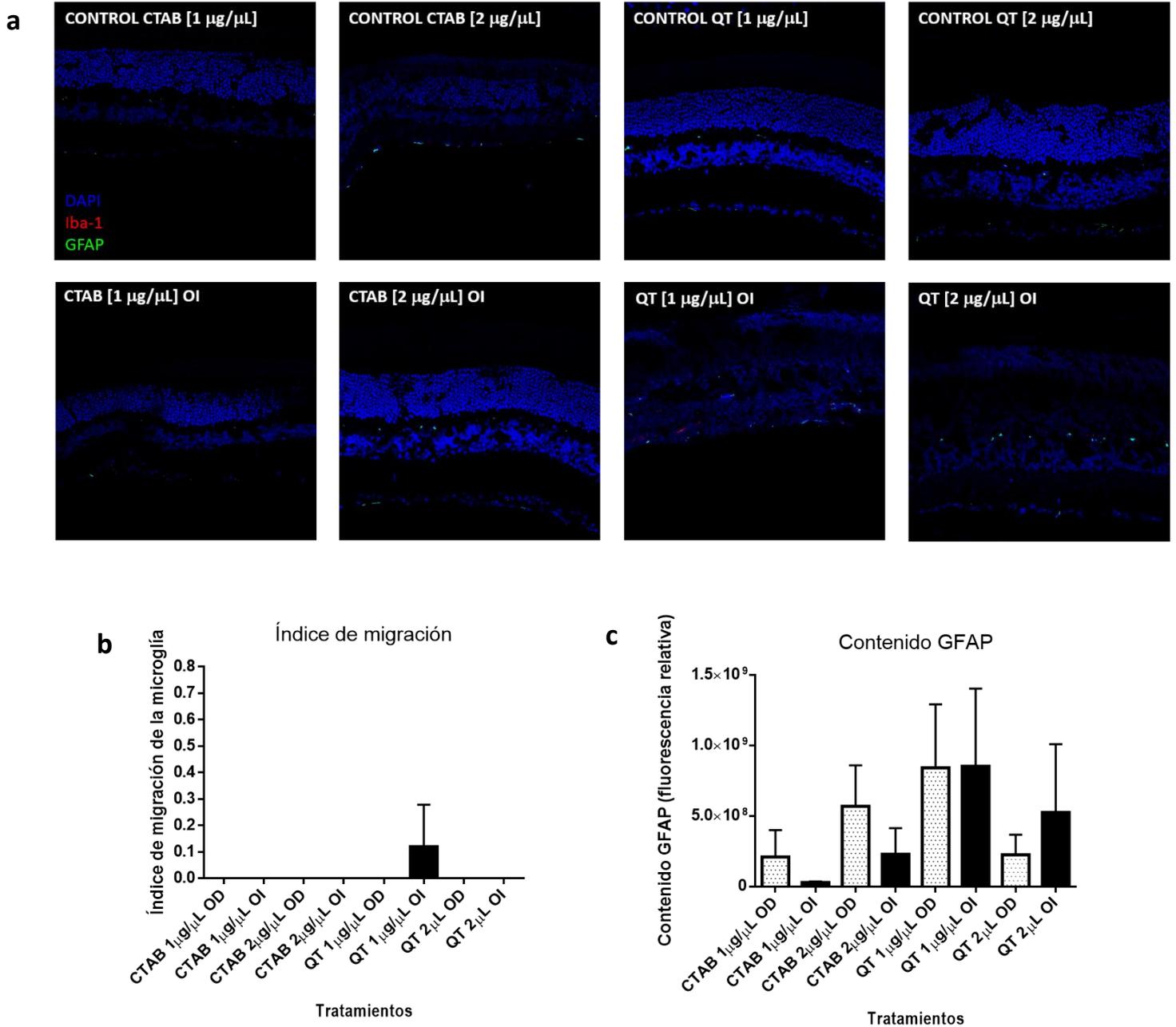


Figura 15. Evaluación de la activación de las células gliales. (a) Microfotografías de secciones representativas de retinas pertenecientes a los grupos control (ojo derecho) y grupos tratados (ojo izquierdo) marcadas para visualizar la activación de las células gliales. (b) Gráfico de barras que ilustra el efecto de los diferentes tratamientos administrados en el índice de migración de la microglía. (c) Gráfico de barras que representa el efecto de los diferentes tratamientos administrados en el contenido de fluorescencia corregida de GFAP. Los valores representan la media \pm SD del recuento realizado para cada grupo.

5. CONCLUSIONES

1. De los tres tipos de *Quatsomes* que se ha evaluado la citotoxicidad *in vitro*, las nanovesículas formadas por el surfactante amónico cuaternario CTAB han resultado las menos citotóxicas y por tanto, las elegidas para continuar realizando estudios.
2. El análisis preliminar de la toxicidad *in vivo* de los *Quatsomes* formados por el surfactante CTAB ha dado resultados positivos pues no provocan un cambio en la estructura de la retina, no inducen un proceso apoptótico en las células y no estimulan reacciones inflamatorias.
3. Los resultados preliminares de la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* sugieren que los *Quatsomes* son unas nanovesículas adecuadas para encapsular agentes terapéuticos dirigidos a detener o disminuir la neuroinflamación generada en la patología RP.
4. El estudio de la citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas MSM 41 muestra que se tratan de unas nanopartículas no citotóxicas, incluso a las concentraciones más elevadas.
5. La evaluación de la capacidad de las MSM 41 en acceder al interior celular ha permitido conocer que estas nanopartículas pueden ser internalizadas por las células a diferentes tiempos y concentraciones.
6. Los resultados obtenidos sugieren que las nanopartículas MSM 41 son aptas para su uso como *nanocarriers* de principios activos dirigidos a tratar la RP.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AYUSO, C. & MILLAN, J. M. (2010). Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Medicine*, 2(5): 1-34.
- BOUGHMAN, J. A.; CONNEALLY, P. M. & NANCE, W. E. (1980). Population genetic studies of retinitis pigmentosa. *American Journal of Human Genetics*, 32(2): 223–235.
- BOULTON, M. & DAYHAW-BARKER, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye*, 15(3): 384–389.
- BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; WIEDEMANN, P.; SKATCHKOY, S.N.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A.(2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25: 397–424.
- BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A. & WIEDEMANN, P. (2004). Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Research*, 36(5): 241–249.
- BUNT-MILAM, A. H. & SAARI, J. C. (1983). Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *The Journal of Cell Biology*, 97(3): 703–712.
- CANO-SARABIA, M.; VENTOSA, N.; SALA, S.; PATIÑO, C.; ARRANZ, R. & VECIANA, J. (2008). Preparation of uniform rich cholesterol unilamellar nanovesicles using CO₂-expanded solvents. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 24(6): 2433–2437.
- CASPI, R. R. & ROBERGE, F. G. (1989). Glial cells as suppressor cells: Characterization of the inhibitory function. *Journal of Autoimmunity*, 2(5): 709–722.
- CHEN, L.; YANG, P. & KIJLSTRA, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocular Immunology and Inflammation*, 10: 27–39.
- COLL, C.; BERNARDOS, A.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. & SANCENÓN, F. (2013). Gated silica mesoporous supports for controlled release and signaling applications. *Accounts of Chemical Research*, 46(2): 339–349.
- DEL POZO-RODRÍGUEZ, A.; DELGADO, D.; GASCÓN, A. R. & SOLINÍS, M. Á. (2013). Lipid nanoparticles as drug/gene delivery systems to the retina. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 29(2): 173–188.
- DURAIYAN, J.; GOVINDARAJAN, R.; KALIYAPPAN, K. & PALANISAMY, M. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4(2): 307–309.
- ELIZONDO, E.; LARSEN, J.; HATZAKIS, N. S.; CABRERA, I.; BJØRNHOLM, T.; VECIANA, J.; STAMOU, D. & VENTOSA, N. (2012). Influence of the Preparation Route on the Supramolecular Organization of Lipids in a Vesicular System. *Journal of the American Chemical Society*, 134(4): 1918–1921.
- FERRER-TASIES, L.; MORENO-CALVO, E.; CANO-SARABIA, M.; AGUILELLA-ARZO, M.; ANGELOVA, A.; LESIEUR, S.; RICART, S.; FARAUDO, J.; VENTOSA, N. & VECIANA, J. (2013). Quatsomes: vesicles formed by self-assembly of sterols and quaternary ammonium surfactants. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 29(22): 6519–6528.
- FRANCKE, M.; MAKAROV, F.; KACZA, J.; SEEGER, J.; WENDT, S.; GÄRTNER, U.; FAUDE, F.; WIEDEMANN, P. & REICHENBACH, A. (2001). Retinal pigment

- epithelium melanin granules are phagocytosed by Müller glial cells in experimental retinal detachment. *Journal of Neurocytology*, 30(2): 131–136.
- FREBERG, L. (2009). *Discovering Biological Psychology*. Cengage Learning. 608 pp.
 - GARCÍA, M. & VECINO, E. (2003). Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histology and Histopathology*, 18(4): 1205–1218.
 - GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y. & BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. (1992). *The Journal of Cell Biology*, 119(3): 493–501.
 - GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C. & GAGE, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6): 918–934.
 - HAMEL, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1: 1-40.
 - HANISCH, U.-K. & KETTENMANN, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11): 1387–1394.
 - HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E. & BERG, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, 119(2): 203–210.
 - HELGA, K.; FERNANDEZ, E. & NELSON, R. (1995a). Glial Cells of the Retina, in: *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
 - HELGA, K.; FERNANDEZ, E. & NELSON, R. (1995b). Simple Anatomy of the Retina, in: *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
 - KANAN, Y.; CENTOLA, M.; BART, F. & AL-UBAIDI, M. R. (2010). Analysis of genes differentially expressed during retinal degeneration in three mouse models. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 664:3–13.
 - KAUR, I. P.; GARG, A.; SINGLA, A. K. & AGGARWAL, D. (2004). Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 269(1): 1–14.
 - KELLER, J. N.; HANNI, K. B.; GABBITA, S. P.; FRIEBE, V.; MATTSON, M. P. & KINDY, M. S. (1999). Oxidized lipoproteins increase reactive oxygen species formation in microglia and astrocyte cell lines. *Brain Research*, 830(1): 10–15.
 - KIRBY, C.; CLARKE, J. & GREGORIADIS, G. (1980). Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *The Biochemical Journal*, 186(2): 591–598.
 - KRESGE, C. T.; LEONOWICZ, M. E.; ROTH, W. J.; VARTULI, J. C. & BECK, J. S. (1992). Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, 359(6397): 710–712.
 - LANGMANN, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(6): 1345–1351.
 - LIN, X.; XIE, J.; NIU, G.; ZHANG, F.; GAO, H.; YANG, M.; QUAN, Q.; ARONOVA, M.A.; ZHANG, G.; LEE, S.; LEAPMAN, R. & CHEN, X. (2011). Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging. *Nano Letters*, 11(2): 814–819.

- MAMAEVA, V.; SAHLGREN, C. & LINDÉN, M. (2013). Mesoporous silica nanoparticles in medicine--recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5): 689–702.
- MANO, T. & PURO, D. G. (1990). Phagocytosis by human retinal glial cells in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31(6): 1047–1055.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ DE LA CÁMARA, C.; HERNÁNDEZ-PINTO, A. M.; OLIVARES-GONZÁLEZ, L.; CUEVAS-MARTÍN, C.; SÁNCHEZ-ARAGÓ, M.; HERVÁS, D.; SALOM, D.; CUEZVA, J.M.; DE LA ROSA, E.J.; MILLÁN, J.M. & RODRIGO, R. (2015). Adalimumab Reduces Photoreceptor Cell Death in A Mouse Model of Retinal Degeneration. *Scientific Reports*, 5.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ DE LA CÁMARA, C.; OLIVARES-GONZÁLEZ, L.; HERVÁS, D.; SALOM, D.; MILLÁN, J. M. & RODRIGO, R. (2014). Infliximab reduces Zaprinas-induced retinal degeneration in cultures of porcine retina. *Journal of Neuroinflammation*, 11.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ DE LA CÁMARA, C.; SALOM, D.; SEQUEDO, M. D.; HERVÁS, D.; MARÍN, C.; ALLER, E.; JAIJO, T.; DÍAZ, M.; MILLÁN, J.M. & RODRIGO, R. (2013). Altered antioxidant-oxidant status in the aqueous humor and peripheral blood of patients with retinitis pigmentosa. *PloS One*, 8(9)
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ DE LA CÁMARA, C.; SEQUEDO, M. D.; GÓMEZ-PINEDO, U.; JAIJO, T.; ALLER, E.; GARCÍA-TÁRRAGA, P.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; MILLÁN, J.M. & RODRIGO, R. (2013). Phosphodiesterase inhibition induces retinal degeneration, oxidative stress and inflammation in cone-enriched cultures of porcine retina. *Experimental Eye Research*, 111: 122–133.
- MATSUI, K.; HOSOI, N. & TACHIBANA, M. (1999). Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(16): 6755–6766.
- NAGATA, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3): 355–365.
- NEWMAN, E. A. (1996). Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(1): 159–168.
- NEWMAN, E. & REICHENBACH, A. (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*, 19(8): 307–312.
- POITRY-YAMATE, C. L.; POITRY, S. & TSACOPOULOS, M. (1995). Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15: 5179–5191.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J. & WILLIAMS, S. (2001). *Neuroscience*. Sinauer Associates. Sunderland (MA). 759 pp.
- ROBERGE, F. G.; CASPI, R. R.; CHAN, C.-C. & NUSSENBLATT, R. B. (1991). Inhibition of T lymphocyte proliferation by retinal glial Müller cells: Reversal of inhibition by glucocorticoids. *Journal of Autoimmunity*, 4(2): 307–314.
- ROY, A.; JANA, A.; YATISH, K.; FREIDT, M. B.; FUNG, Y. K.; MARTINSON, J. A. & PAHAN, K. (2008). Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(5): 686–699.

- SAWANT, R. R. & TORCHILIN, V. P. (2012). Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *The AAPS Journal*, 14(2): 303–315.
- SAXENA, S.; KHANNA, V. K.; PANT, A. B.; MEYER, C. H. & SINGH, V. K. (2011). Elevated tumor necrosis factor in serum is associated with increased retinal ischemia in proliferative eales' disease. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 78(5): 261–265.
- SCHUETZ, E. & THANOS, S. (2004). Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Current Drug Targets*, 5(7): 619–627.
- SCHULZ, M.; DOTZLAW, H. & NEECK, G. (2014). Ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: serum levels of TNF- α and its soluble receptors during the course of therapy with etanercept and infliximab. *BioMed Research International*, 2014.
- SEYFODDIN, A.; SHAW, J. & AL-KASSAS, R. (2010). Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug Delivery*, 17(7): 467–489.
- SHEN, J.; YANG, X.; DONG, A.; PETTERS, R. M.; PENG, Y.-W.; WONG, F. & CAMPOCHIARO, P. A. (2005). Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of Cellular Physiology*, 203(3): 457–464.
- SILVER, I. A.; DEAS, J. & ERECIŃSKA, M. (1997). Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*, 78(2): 589–601.
- STONE, J.; MASLIM, J.; VALTER-KOCSI, K.; MERVIN, K.; BOWERS, F.; CHU, Y.; BARNETT, N.; PROVIS, J.; LEWIS, G.; FISHER, S.K.; BISTI, S.; GARGINI, C.; CERVETTO, L.; MERIN, S. & PEÉR, J. (1999). Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18(6): 689–735.
- THRIMAWITHANA, T. R.; YOUNG, S.; BUNT, C. R.; GREEN, C. & ALANY, R. G. (2011). Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discovery Today*, 16(5–6): 270–277.
- TOUT, S.; CHAN-LING, T.; HOLLÄNDER, H. & STONE, J. (1993). The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*, 55(1): 291–301.
- TSACOPOULOS, M. & MAGISTRETTI, P. J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(3): 877–885.
- WADHWA, S.; PALIWAL, R.; PALIWAL, S. R.; & VYAS, S. P. (2009). Nanocarriers in ocular drug delivery: an update review. *Current Pharmaceutical Design*, 15(23): 2724–2750.
- YOSHIDA, N.; IKEDA, Y.; NOTOMI, S.; ISHIKAWA, K.; MURAKAMI, Y.; HISATOMI, T.; ENAIDA, H. & ISHIBASHI, T. (2013). Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 120(1).
- ZENG, H.-Y.; TSO, M. O. M.; LAI, S. & LAI, H. (2008). Activation of nuclear factor-kappaB during retinal degeneration in rd mice. *Molecular Vision*, 14, 1075–1080.
- ZENG, H.-Y.; ZHU, X.-A.; ZHANG, C.; YANG, L.-P.; WU, L.-M. & TSO, M. O. M. (2005). Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(8): 2992–2999.