



# **O**ptimización de la transfección *in vivo* e *in vitro* mediante nanopartículas magnéticas

**Biotecnología**

Facultad de Ciencias Experimentales

**Yaiza Maestre Deltell**

*Curso 2015/2016*

**TUTORES**

**Eduardo Fernández Jover**

**Gema Martínez Navarrete**

Instituto de Bioingeniería  
Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual

## DECLARACIÓN DE LOS TUTORES

D. EDUARDO FERNÁNDEZ JOVER, Catedrático de Universidad y Director del Grupo de Neuroingeniería Biomédica y Neuroprótesis del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

DÑA. GEMA MARTÍNEZ NAVARRETE, Dra. en Biología y perteneciente al Grupo de Neuroingeniería Biomédica y Neuroprótesis del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de fin de Grado titulado: “Optimización de la transfección in vivo e in vitro mediante nanopartículas magnéticas”, presentado por YAIZA MAESTRE DELTELL, ha sido realizada bajo su dirección en la Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual, del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández, estimando que se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado y defendido públicamente para optar al título de Grado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche, a 22 de febrero de 2016.



Fdo.: Prof. Dr. Eduardo Fernández Jover



Fdo.: Dra. Gema Martínez Navarrete

## RESUMEN

La discapacidad visual supone la segunda discapacidad más numerosa de la población mundial. La retina es un tejido extremadamente sensible a los cambios, por lo que cualquier alteración puede derivar en patologías incurables a día de hoy. Actualmente el uso de vectores víricos en terapia génica está muy extendido en el tratamiento del sistema nervioso, sin embargo presenta problemas. Los vectores no víricos presentan grandes dificultades en la transfección en neuronas, por lo que las nanopartículas magnéticas son una alternativa prometedora en terapia génica para patologías del sistema nervioso, como vehículo con una alta tasa de transfección, no tóxica y asequible. El objeto del presente estudio de este trabajo se ha basado en técnicas optogenéticas mediante la transfección del plásmido pLenti-Synapsin-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE junto con las nanopartículas magnéticas NeuroMag y FluoMag-N como vehículo en células del sistema nervioso. Durante el estudio se han realizado ensayos *in vitro* en cultivo primario tanto de corteza como de retina, a partir de cuyos resultados se han realizado ensayos *in vivo* en retina de ratón.

**Palabras clave:** *Channelrhodopsin2, Nanopartículas magnéticas, Neurona, Optogenética, Retina, Transfección.*

## ABSTRACT

Retinal dystrophies are the leading cause of visual disability in countries with middle and high income, with this population set to increase in the coming years. Currently, gene therapy has drawn considerable investment in research attempting to discover viable treatments for various retinopathies. Viral vectors have the advantage of high expression rates but carry inherent issues. These include immunological responses, carcinogenesis and expression in non-specified targets should the virus enter the bloodstream. Non-viral vectors suffer from low expression however, they are non-toxic, more cost effective and can be mass produced. Here, we test the transfection efficiency on magnetic nanoparticles *in vitro* and *in vivo* and use the optogenetic plasmid Channelrhodopsin2, which has been suggested as a viable therapy in visual restoration. We use optogenetics as a potential tool to express ChR2 in cell membrane in non-photoreceptor cells from degenerated retinas to light detection.

**Keywords:** *Channelrhodopsin2, Magnetic nanoparticles, Neuron, Optogenetics, Retina, Transfection.*

## ABREVIATURAS

BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*

CCG, capa de células ganglionares

CEP, capa del epitelio pigmentaria

ChR2, del inglés *Channelrhodopsin2*

CNE, capa nuclear externa

CNI, capa nuclear interna

CPE, capa plexiforme externa

CPI, capa nuclear interna

DMEM, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO, del inglés *Dimethyl Sulfoxide Minimum*

DNA, del inglés *DeoxyriboNucleic Acid*

EDTA, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*

FITC, del inglés *Fluorescein Isotiocyanate*

GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*

HBSS, del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*

MAP2, del inglés *Microtubule Associated Protein 2*

MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

OCT, del inglés *Optical Coherence Tomography*

OMS, Organización Mundial de la Salud

PB, del inglés *Phosphate Buffered*

PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*

PDL, Poli-D-Lisina

PFA, Paraformaldehído

TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*

UV, Ultravioleta

YFP, del inglés *Yellow Fluorescent Protein*

# ÍNDICE

Resumen .....	Pág. 1
Abstract .....	Pág. 1
Abreviaturas .....	Pág. 2
Introducción .....	Pág. 5
1.- Retina .....	Pág. 5
1.1.- Estructura y proceso visual .....	Pág. 5
1.2.- Patologías de la retina .....	Pág. 7
2.- Optogenética .....	Pág. 8
2.1.- Opsinas .....	Pág. 8
3.- Vectores .....	Pág. 11
Antecedentes y objetivos .....	Pág. 13
Materiales y métodos .....	Pág. 14
1.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	Pág. 14
2.- Ensayos <i>in vitro</i> .....	Pág. 14
2.1.- Construcción de magnetoplexos .....	Pág. 14
2.2.- Ratio plásmido:nanopartículas .....	Pág. 14
2.3.- Preparación de placas de cultivo .....	Pág. 14
2.4.- Cultivo primario de corteza y retina embrionaria de rata (E17-E19) .....	Pág. 15
2.5.- Transfección .....	Pág. 15
2.6.- Inmunocitoquímica .....	Pág. 15
2.7.- Citometría de flujo .....	Pág. 16
2.8.- MTT y toxicidad .....	Pág. 16
3.- Ensayos <i>in vivo</i> .....	Pág. 17
3.1.- Aprobación ética .....	Pág. 17
3.2.- Animales .....	Pág. 17
3.3.- Tomografía de coherencia óptica (OCT) pre-inyección .....	Pág. 17

3.4.- Inyección intravítrea.....	Pág. 18
3.5.- Sacrificio y perfusión intracardiaca.....	Pág. 18
3.6.- Histología.....	Pág. 18
3.7.- Citometría de flujo.....	Pág. 20
4.- Tablas para los procedimientos <i>in vitro</i> .....	Pág. 20
5.- Tablas para los procedimientos <i>in vivo</i> .....	Pág. 21
Resultados.....	Pág. 22
1.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	Pág. 22
2.- Ensayos <i>in vitro</i> .....	Pág. 22
2.1.- Inmunocitoquímica en las transfecciones de los cultivos primarios.....	Pág. 22
2.2.- Citometría de flujo.....	Pág. 24
2.3.- MTT y toxicidad.....	Pág. 26
3.- Ensayos <i>in vivo</i> .....	Pág. 27
3.1.- Tomografía de coherencia óptica (OCT).....	Pág. 27
3.2.- Reconstrucción de las retinas enteras y fluorescencia directa.....	Pág. 28
3.3.- Inmunohistoquímica en retinas enteras.....	Pág. 31
3.4.- Inmunohistoquímica en secciones verticales de retinas.....	Pág. 33
3.5.- Citometría de flujo.....	Pág. 34
Discusión de resultados.....	Pág. 36
Conclusiones.....	Pág. 38
Proyección futura.....	Pág. 39
Agradecimientos.....	Pág. 40
Bibliografía.....	Pág. 41

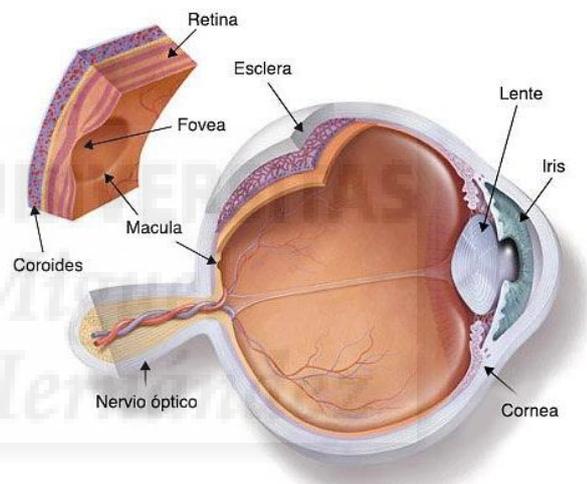
# INTRODUCCIÓN

## 1.- Retina

La retina es esencial en la percepción y procesamiento de la información visual. Es una parte del sistema nervioso proveniente del prosencéfalo que se proyecta hacia las estructuras superficiales del organismo con la finalidad de recibir la luz proveniente del entorno y procesarla. Dado que está altamente especializada, y además presenta fácil acceso, es de gran interés y utilidad para estudios fisiológicos y morfológicos del sistema nervioso, convirtiéndola en un modelo único (Fernández, 2007).

### 1.1.- Estructura y proceso visual

La retina se encuentra en la parte interna del ojo. Los rayos de luz entran al ojo a través de la córnea, atraviesan la cámara anterior, el cristalino, el humor vítreo y finalmente llegan a la retina. En el centro de ésta se localiza la mácula, región altamente especializada donde se da la máxima agudeza visual, que permite una distinción muy precisa entre detalles similares (Figura 1). En su lateral se encuentra la papila, lugar por donde pasan los vasos sanguíneos encargados de nutrir

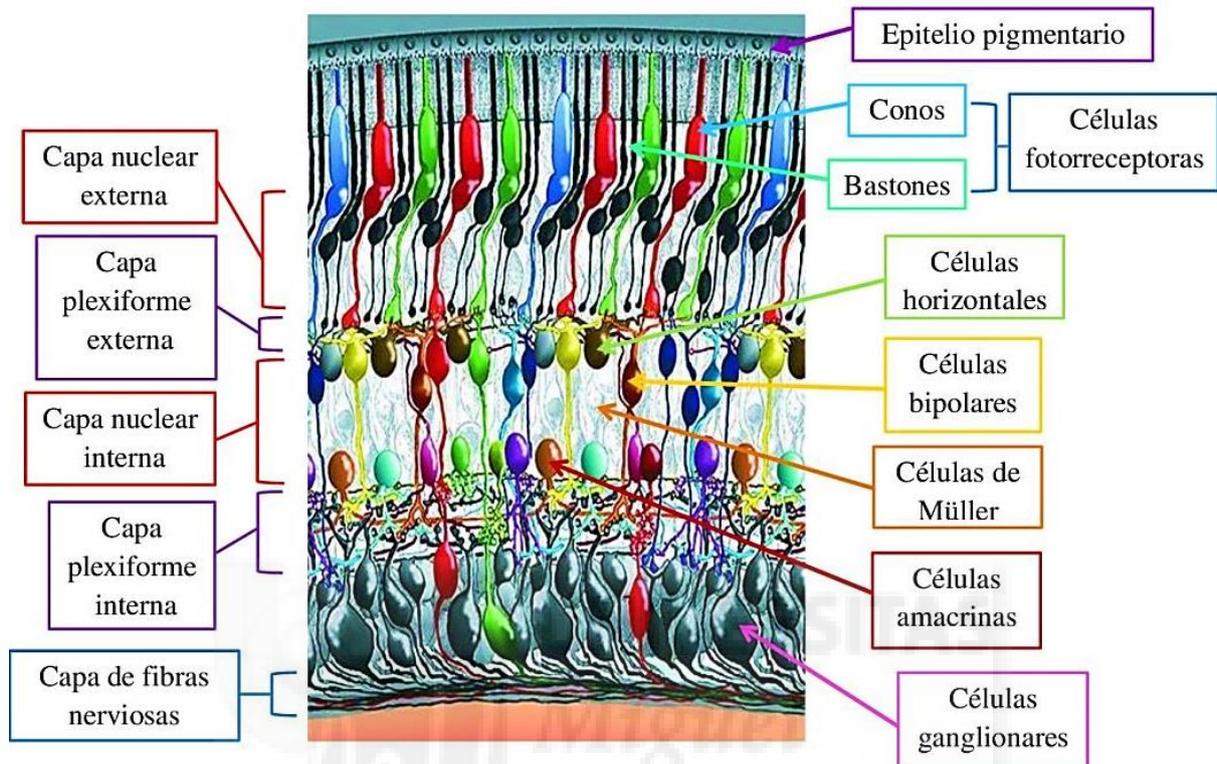


**Figura 1.** Esquema del globo ocular.

Fuente: American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus.

la retina, y las fibras nerviosas que derivan al nervio óptico, encargado de llevar la información desde el ojo hasta la corteza cerebral. Una vez llegada la luz a la retina, se produce la excitación de las células fotorreceptoras (conos y bastones) dando lugar a la fototransducción de la energía lumínica, que pasa a transformarse en una señal nerviosa. Estos impulsos nerviosos se combinan entre sí y llegan a las fibras del nervio óptico, las cuales se encargan de transportarlos al cerebro, donde éste analiza, traduce e interpreta los datos obtenidos, dando lugar a la sensación visual de luz y color (Remington, 2005). La retina posee tres capas que contienen cuerpos celulares (nuclear externa, interna y capa de células ganglionares) y dos capas, denominadas plexiformes, donde se encuentran las conexiones entre las células (Forrester *et al.*, 2002; Kolb *et al.*, 2005). Además en la retina también se

encuentran las células del epitelio pigmentario y las células gliales, donde se pueden encontrar las células de Müller (que proporcionan sostén a la retina), los astrocitos (que proporcionan soporte) y las células de la microglía (Kolb *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de la retina.

Fuente: (Kolb *et al.*, 2008).

Tal y como se muestra en la Figura 2, la capa más externa de la retina es la del epitelio pigmentario. Son células hexagonales que se organizan como una sola capa, caracterizadas por la presencia de gránulos de pigmento en su interior que absorben la luz que llega hasta ellas. Están implicadas en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, además de metabolizar y almacenar vitamina A, utilizada para formar nuevos pigmentos. A continuación se presenta la capa nuclear externa formada por fotorreceptores, las únicas células sensibles directamente a la luz. Los bastones se encuentran en mayor densidad en la región periférica, donde se detecta el movimiento y se determinan las formas (Kolb *et al.*, 2005). Son funcionales principalmente en condiciones de baja luminosidad y proporcionan la visión en blanco y negro, mientras que los conos, localizados mayoritariamente en la región central (utilizada para la agudeza visual) (Kolb *et al.*, 2005) están adaptados para situaciones de mucha luminosidad y proporcionan la visión en color. Se encargan de la fototransducción, transformando los impulsos luminosos en señales nerviosas. Seguidamente se encuentra la

capa plexiforme externa, en la que se produce la sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares y horizontales (con función moduladora). Los núcleos de las células horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes y de Müller se encuentran en la capa nuclear interna. Justo debajo, se encuentra la capa plexiforme interna formada por la sinapsis entre los axones de las células bipolares, amacrinas y las dendritas de las células ganglionares. La siguiente capa se corresponde con la formada por las células ganglionares, que conecta con la capa de fibras nerviosas que dan lugar al nervio óptico.

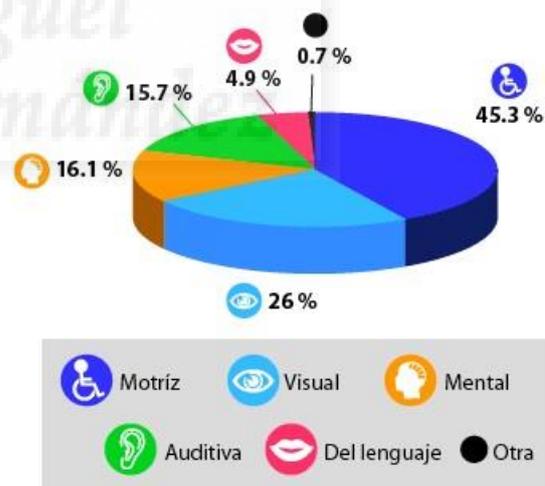
## 1.2.- Patologías de la retina

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2010, el número estimado de personas con discapacidad visual en todo el mundo ascendía a 285 millones, siendo la segunda discapacidad con mayor cantidad de afectados (Figura 3), de las cuales 39 millones eran ciegos. En estudios realizados por la OMS se especifica que las enfermedades de la retina son la principal causa de discapacidad visual en los países de ingresos medios-altos y altos, y se estima que esta cifra se duplicará en 2020. Entre las múltiples patologías que afectan a la retina, se destacan las siguientes:

- La retinosis pigmentaria es un grupo de enfermedades oculares degenerativas que se caracterizan por la pérdida lenta y progresiva de la visión por la destrucción gradual de los bastones.

- La degeneración macular asociada a la edad. Se divide en húmeda o seca. La húmeda es la forma menos frecuente y se debe al crecimiento de vasos sanguíneos a nivel de la coroides. La seca provoca atrofia de la retina, dándose la degeneración del epitelio pigmentario y de los conos, afecta al 90% de los pacientes, aproximadamente el 30% de la población mundial mayor de 60 años.

- La retinopatía diabética es una complicación ocular de la diabetes en la que los vasos sanguíneos que irrigan la retina son dañados debido a los niveles anormalmente elevados de azúcar.



**Figura 3.** Distribución porcentual de la población según tipo de discapacidad.

Fuente: INEGI, 2003.

## 2.- Optogenética

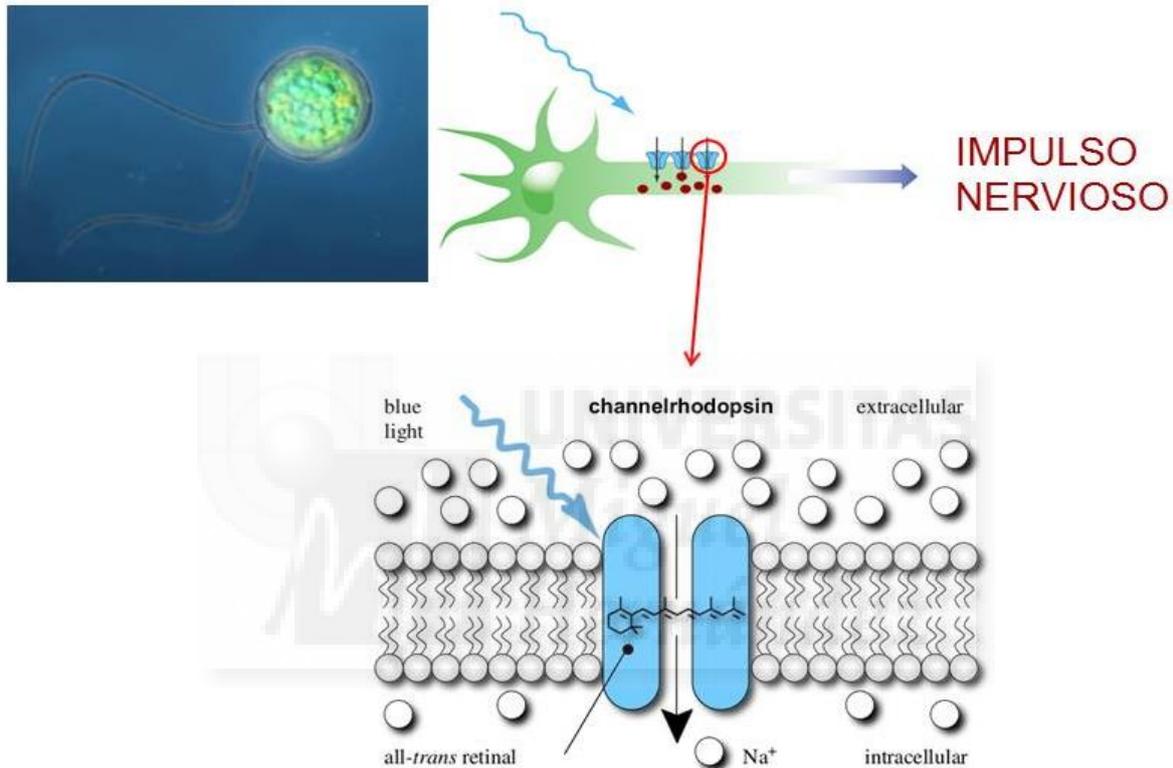
La optogenética es una combinación de métodos ópticos y genéticos que permite el control rápido y dirigido de eventos específicos en sistemas biológicos diana tanto simples (células) como complejos (tejidos y animales), basados en la transfección de un segmento de DNA específico que codifica proteínas fotosensibles, las opsinas. Dado que la luz es usada como agente inductor, la velocidad de la respuesta generada está en el orden de milisegundos. Se trata de una tecnología de vanguardia iniciada en el año 2005 por el Dr. Karl Deisseroth (Universidad de Stanford).

### 2.1.- Opsinas

Las opsinas son proteínas naturales sensibles a la luz, normalmente integradas en la membrana celular y que tienen un cromóforo unido covalentemente que produce un color específico al absorber y transmitir en una determinada longitud de onda. Éste cromóforo isomeriza cuando es excitado por la luz, produciendo la activación de la proteína a la cual está unido covalentemente. Cada opsina es sensible a una determinada longitud de onda, mediante la cual es posible modular su respuesta. Existen opsinas en nuestra retina localizadas en los fotorreceptores, responsables de la capacidad de percibir la luz y el color, pero el mayor avance de la optogenética es la adaptación de opsinas exógenas procedentes de microorganismos para su utilización en terapia génica. Estas opsinas combinan un dominio sensible a la luz y un canal iónico en la misma proteína, convirtiéndolas en excelentes candidatas para modular el potencial de membrana e inducir despolarizaciones o hiperpolarizaciones en las neuronas. De este modo, las opsinas funcionan abriendo o cerrando un poro en la membrana en la que se encuentran y permiten o delimitan el paso específico de iones a través de la membrana celular en cuestión.

Los estudios sobre el alga *Chlamydomonas reinhardtii*, mostrada en la Figura 4, sustentan la base de la optogenética. Posee una proteína llamada *Channelrhodopsin2* (ChR2) que le confiere la capacidad para moverse hacia una fuente luminosa. Tras el descubrimiento, se han desarrollado variantes de esta opsina (*halorhodopsin* o *bacteriorhodopsin*), capaces de despolarizar o hiperpolarizar neuronas rápidamente en respuesta a luces de diferente longitud de onda (Figura 4), o de controlar el tráfico, la cinética o la sensibilidad a la luz. Las últimas investigaciones utilizan estas herramientas combinadas, logrando un control multimodal de la actividad neuronal. Así, dependiendo del tipo de canal iónico que exprese la opsina en una neurona puede provocar que ésta se active o se inhiba (Hille, 2001).

La ChR2 fue la primera opsina utilizada con fines terapéuticos, ya que es capaz de despolarizar la membrana de las neuronas al ser activada mediante un haz luminoso de 473 nm (luz azul) (Deisseroth *et al.*, 2005). Al ser estimulada se abre permitiendo el paso de sodio al interior de la neurona a través del canal iónico gracias al gradiente electroquímico de la célula, transformando los impulsos luminosos en potenciales de acción, y por tanto, activando la neurona en cuestión (Nagel *et al.*, 2003). Asimismo, la ChR2 no presenta toxicidad para las neuronas retinianas en roedores (Doroudchi *et al.*, 2011).



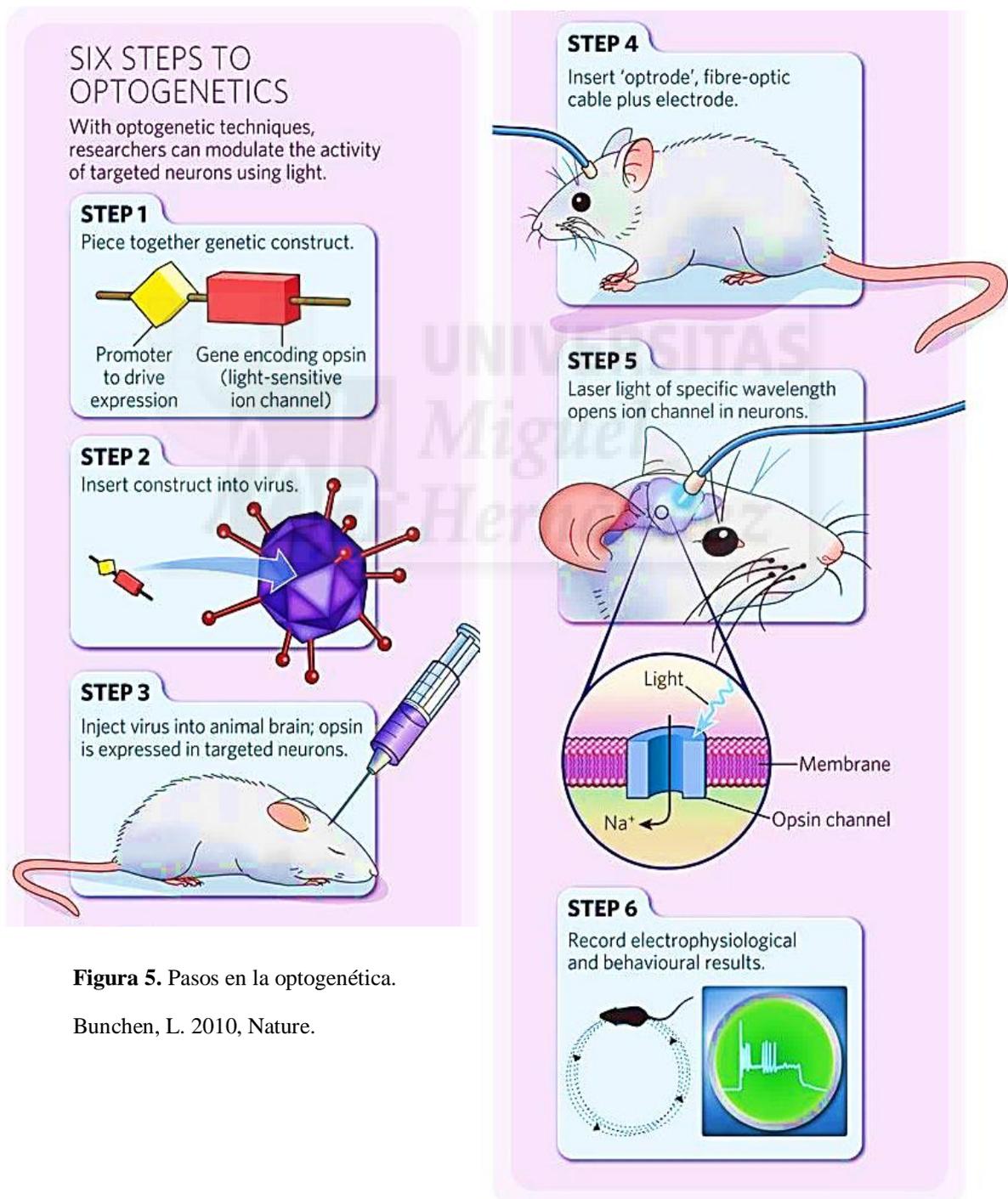
**Figura 4.** Activación de la ChR2 por luz azul.

Obtenido de: New technology illuminates neuronal conversions in [www.openoptogenetics.org](http://www.openoptogenetics.org)

La neurología y la neurofisiología son las especialidades más beneficiadas por la optogenética hasta la fecha, ya que se trata de una técnica particularmente atractiva para estudiar las complejas redes de interacciones y para proporcionar nuevas terapias alternativas a desórdenes de la excitabilidad. Específicamente, en retina, la idea fundamental consiste en dotar de fotosensibilidad directamente a las neuronas de las capas internas. Cuando la fototransducción no puede ser realizada por los fotorreceptores, ya sea porque no funcionan correctamente o porque han degenerado, las opsinas exógenas integradas pueden generar un

estímulo suficiente como para iniciar la señal nerviosa equivalente a la generada por éstos (Esteve *et al.*, 2012).

La optogenética es una técnica experimental que implica una serie de pasos (Figura 5). En primer lugar, para insertar el gen se utilizan vectores víricos o no víricos. Una vez expresada esta proteína en la célula, se debe activar dicha proteína, para lo cual se utiliza una fibra óptica con un láser de longitud de onda determinada. Finalmente, se recogen resultados sobre el comportamiento y las respuestas electrofisiológicas del animal.



**Figura 5.** Pasos en la optogenética.

Bunchen, L. 2010, Nature.

### 3.- Vectores

Un vector es un sistema que se utiliza en el proceso de transferencia de uno o varios genes exógenos al interior de una célula, facilitando la entrada y la biodisponibilidad intracelular del mismo. Los vectores son ampliamente utilizados en la terapia génica, proceso por el cual se inserta material genético en una célula por medio de vectores, con el fin de reemplazar una función defectuosa, introducir una función adicional o prevenir alguna patología.

Insertar directamente el DNA desnudo presenta un gran inconveniente, ya que se degrada rápidamente al introducirlo, dando lugar a una mala absorción celular y por tanto baja efectividad de transfección. Es por ello que se han desarrollado vehículos con la finalidad de incrementar el éxito de la terapia génica (Rolland, 2005). Los vectores se pueden clasificar en víricos o no víricos:

- Vectores víricos: se basan en la modificación de un virus mediante la anulación parcial del genoma vírico, convirtiéndolo en un ente deficiente en replicación en el interior de la célula diana pero totalmente capacitado para infectar. Las regiones codificadoras eliminadas son reemplazadas por el gen o genes de interés. Se utilizan como vectores los retrovirus, los adenovirus, los adenoasociados y los herpesvirus.

- Vectores no víricos: se utilizan vehículos donde el material genético es introducido mediante métodos químicos o físicos. El fosfato cálcico es un método recurrente, ya que la capacidad que poseen los iones de calcio para precipitar el DNA provocan que la célula, mediante endocitosis, lo introduzca en su interior. La integración de liposomas es otro método químico ampliamente utilizado (Zhang *et al.*, 2003), cuya finalidad es proteger el DNA en su interior formando una membrana lipídica a su alrededor, permitiendo su paso al interior celular. Otros vectores utilizados son la introducción de nanopartículas lipídicas sólidas (Delgado *et al.*, 2012) o polímeros (Bejjani *et al.*, 2005). Actualmente, un ejemplo de vehículos no virales utilizados en retina son los niosomas, vesículas surfactantes no iónicas que protegen y liberan el material genético, presentando una estabilidad y almacenamiento mucho mayor que los liposomas. (Puras *et al.*, 2013). En cuanto a los métodos físicos, es destacable la biobalística, basada en el bombardeo de microprojectiles donde se encuentra el plásmido de DNA a transfectar, la electroporación que consiste en generar poros en la membrana celular mediante una corriente eléctrica, los cuales permiten la entrada del material

genético exógeno al interior de la célula, o la microinyección, que introduce el DNA en el núcleo mediante un micromanipulador.

Los vectores víricos son ampliamente utilizados pero presentan problemas de seguridad importantes, tales como la mutagénesis, la toxicidad o la inmunogenicidad, además de su alto costo de producción y la limitación del tamaño de DNA transportado, por lo que se ha considerado necesario desarrollar vectores menos citotóxicos y más seguros (Jafari *et al.*, 2012). La investigación sobre vectores no víricos ha demostrado que no presentan un antígeno específico inmune ni una respuesta inflamatoria posterior, son más baratos y el tamaño del DNA no se encuentra tan limitado (Charbel Issa y MacLaren, 2012).

La entrega de material genético en la retina es un campo amplio y prometedor, dada su anatomía compartimentada que facilita la entrega localizada a tejidos oculares específicos. Al poseer un medio transparente, el proceso de transfección puede ser fácilmente detectado, facilitando su seguimiento con la ayuda de un gen *reporter*. Asimismo, la zona afectada a tratar es tan reducida que las dosis necesarias para que se detecten efectos terapéuticos son muy reducidas, minimizando de este modo las reacciones adversas (Liu *et al.*, 2011). Dado que es necesaria la protección del DNA exógeno dentro de las neuronas para una buena integración, es de gran interés la búsqueda de vehículos que ayuden a su transfección. Las nanopartículas magnéticas como vector no vírico son una opción alternativa a los métodos mencionados anteriormente, dado que presentan una alta tasa de transfección junto con una neurocirugía mínima invasiva (Soto *et al.*, 2015). El interés de las nanopartículas magnéticas deriva fundamentalmente de las propiedades físicas de su núcleo magnético y su capacidad de unir moléculas de interés a su superficie. Son capaces de dispersarse fácilmente en soluciones fisiológicas formando suspensiones homogéneas denominadas ferrofluidos. Estas suspensiones son capaces de interactuar con un campo magnético externo y ser atraídas y transportadas hacia un área específica (Ramos *et al.*, 2011).

A la unión de las nanopartículas magnéticas con el plásmido de interés se les llama magnetoplexos. Esta unión ha permitido el desarrollo de una técnica cuyo objetivo es ser asequible y poseer una ejecución sencilla y segura. De hecho, su finalidad es poder utilizarse regularmente para la obtención de altas tasas de transfección de construcciones genéticas grandes. Además, es posible adquirir dichas nanopartículas magnéticas asociadas a un gen *reporter*, lo que facilita su seguimiento y posibilita la cuantificación de las partículas a lo largo del tiempo así como su degradación.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Según datos obtenidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), 285 millones de personas en el mundo padecían discapacidad visual en 2010, existiendo una alta probabilidad de que dicho número aumente durante los próximos años. La retina está tan especializada que es incapaz de regenerar daños, por lo que cualquier alteración puede derivar en patologías incurables actualmente. Existen diversos estudios en los cuales se ha utilizado terapia génica para la mitigación o cura de estas enfermedades. La modulación de la expresión génica no deseada, el reemplazo de genes defectuosos o alterados, la adición de nuevas propiedades o agentes y la inhibición de efectos dañinos llevados a cabo mediante terapia génica dota a ésta técnica de una importancia creciente, dada su gran utilidad como tratamiento médico en el desarrollo e investigación continua. Teniendo en cuenta los problemas que presentan los vectores víricos, como la inmunogenicidad y la carcinogénesis, se hace evidente y necesaria la búsqueda de vectores no víricos que eviten dichos inconvenientes. Las nanopartículas magnéticas son una opción alternativa, que no presentan la agresividad de las técnicas físicas o la limitada transfección otros vectores no víricos comúnmente utilizados. Poseen una alta tasa de transfección y no presentan un antígeno específico inmune ni una respuesta inflamatoria notoria. Asimismo, su coste es relativamente barato y el tamaño del inserto de DNA no es excesivamente limitado.

El objetivo general del presente proyecto es la transfección de un plásmido con el gen de la *Channelrhodopsin2* humana junto con nanopartículas magnéticas como vehículo en células del sistema nervioso, específicamente en neuronas de la retina.

Dado que el sistema nervioso actualmente continúa presentando grandes dificultades para ser transfectado, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Corroborar los resultados de transfecciones con magnetoplexos de estudios previos llevados a cabo en esta unidad.
2. Estudio de las diferencias entre los resultados obtenidos con nanopartículas magnéticas NeuroMag y FluoMag-N.
3. Transfección de los magnetoplexos en cultivos celulares primarios de corteza y retina, así como en las retinas de animales.
4. Comprobar la expresión de la *Channelrhodopsin2* en las células transfectadas, tanto *in vivo* como *in vitro*.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para el estudio del tamaño y la morfología de las nanopartículas magnéticas, se procedió a colocar sobre la rejilla del microscopio una gota de la solución de nanopartículas. A continuación, se visualizó en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 y se obtuvieron imágenes correspondientes de cada una de las magnetopartículas.

## 2.- Ensayos *in vitro*

### 2.1.- Construcción de magnetoplexos

Se utilizó el plásmido pLenti-Synapsin-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE de un tamaño de 9000pb (20945, Addgene, laboratorio de Karl Deisseroth). El plásmido fue combinado con nanopartículas magnéticas de óxido de hierro cargadas positivamente, NeuroMag (Ozbiosciences), y con una variante de las mismas que porta un fluoróforo rojo, FluoMag-N (Ozbiosciences).

Tanto el plásmido como las nanopartículas magnéticas se diluyeron en Opti-MEM<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) por separado y posteriormente se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente para formar los complejos magnetoplexos.

### 2.2.- Ratio plásmido:nanopartículas

Tomando como referencia estudios previos realizados en el laboratorio por el grupo de investigación, se eligieron los ratios plásmido:magnetopartículas [1:2] y [1:3] para la realización de estudios *in vitro*.

### 2.3.- Preparación de placas de cultivo

En placas de 12 pocillos fueron colocados cubreobjetos de vidrio esterilizados previamente en autoclave y bajo luz UV en cada pocillo, y se añadió 1 mL de poli-D-lisina (PDL, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) por pocillo durante 24 horas a 37°C. Tras esto, se retiró el PDL, se realizaron tres lavados con tampón fosfato salino (PBS, BioWest<sup>®</sup>), se añadió laminina y se dejó incubar durante 3 horas a 37°C. Finalmente se eliminó la laminina para sembrar el cultivo celular.

## 2.4.- Cultivo primario de corteza y retina embrionaria de rata (E17-E19)

Se sacrificó a las ratas de 17-19 días de gestación por dislocación cervical y se extrajeron los embriones mediante cesárea. En campana de flujo laminar se decapitaron en *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, Gibco®) se extrajeron las meninges y se aisló y seccionó la corteza cerebral. Tras esto se retiró el medio, se añadió medio de tripsinización (Tabla 2.1) y se incubó a 37°C durante 15 minutos en el caso del cultivo primario de corteza y 10 minutos en el caso del cultivo primario de retina. Una vez transcurrido este tiempo, se eliminó el medio, se añadió medio neutralizante (Tabla 2.1) para finalizar la digestión proteolítica, se disgregó y se centrifugó durante 5 minutos a 500G a una temperatura de 17°C. A continuación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el medio de neuronas de cultivo primario (Tabla 2.1) en el caso de cultivo de corteza, mientras que para el cultivo de retina se resuspendió en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco®) y se sembró en medio de retina (Tabla 2.1).

La viabilidad celular fue determinada manualmente mediante una cámara de Neubauer con Azul-tripán (Invitrogen™) y automáticamente con el contador celular Adam MC-Digital Bio para una posterior comparación de resultados.

La densidad de siembra por pocillo fue de 100.000 células por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C, con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub>. Se mantuvo el cultivo celular reemplazando el 50% del medio por medio fresco cada 3 días y el día previo a la transfección.

## 2.5.- Transfección

Se realizaron transfecciones con los ratios 1:2 y 1:3 de plásmido frente a magnetopartículas respectivamente, diluidos en Opti-MEM®, tanto para los cultivos primarios de corteza como de retina. Se añadieron los magnetoplexos al pocillo y se incubaron las placas a 37°C durante 1 hora y 30 minutos sobre un imán para dirigir las magnetopartículas hacia el interior de las células. Transcurrido este tiempo, se dejaron incubar durante 3 horas y 30 minutos a 37°C sin el imán, tras lo cual se eliminó el medio y se añadió medio fresco.

## 2.6.- Inmunocitoquímica

Se trata de una técnica que permite la identificación y seguimiento de antígenos específicos mediante la utilización de anticuerpos, empleados para la detección de tipos celulares específicos.

Tras 96 horas, se fijaron los cubreobjetos con las células con paraformaldehído al 4% (PFA, Sigma-Aldrich®) a temperatura ambiente durante 25 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno, se permeabilizaron con PB Tritón x-100 (0'5%) y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich®) al 10% durante 1 hora. Se añadieron 50 µL por pocillo de mezcla de anticuerpos primarios (Tabla 2.2) y se dejó *overnight* en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se añadieron los anticuerpos secundarios (Tabla 2.3) 1 hora en cámara húmeda a 4°C. Tras esto, se lavaron, se contrastaron con Hoechst (Sigma-Aldrich®) y se montaron con *antifading* (tampón carbonato-bicarbonato sódico 0'1M con glicerol 1:2), utilizado como medio de montaje. Posteriormente, se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) equipado con un sistema ApoTome.

## 2.7.- Citometría de flujo

Es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz láser.

Tras 96 horas desde la transfección, se procedió a la tripsinización con tripsina+EDTA 0'25%. Se añadió medio neutralizante para citometría (Tabla 2.1) y se recogieron las células en eppendorfs estériles para ser resuspendidas. Se centrifugaron a 200g durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS con suero fetal bovino al 2% (FBS, BioWest®). Posteriormente, se utilizó un citómetro Becton Dickinson, con el fin de realizar un análisis cualitativo y semicuantitativo de la transfección. La YFP posee un espectro de absorción entorno a los 515 nm y de emisión de 528 nm aproximadamente, por lo que tanto para el cultivo primario de corteza como de retina, se analizaron los datos obtenidos sobre eventos y los resultados del rango de longitudes de onda con el filtro de isotiocianato de fluoresceína (FITC).

## 2.8.- MTT y toxicidad

Es un ensayo para la detección de citotoxicidad basado en la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. En este ensayo se determina la funcionalidad mitocondrial que indica la supervivencia y proliferación celular, es decir, la cantidad de formazán en el medio

es proporcional a la viabilidad celular. El formazán se solubiliza con dimetil sulfóxido (DMSO) que se oxida, dando lugar a una solución con viraje de color violeta.

En primer lugar, se retiró el medio de la placa de 12 pocillos transfectada tras 96 horas, se añadieron 200  $\mu$ L por pocillo de MTT y se dejó durante 3 horas a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se retiró el MTT y se añadieron 100  $\mu$ L por pocillo de DMSO (Sigma-Aldrich®). Tras esto se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman Coulter AD 340 a 595 nm.

### **3.- Ensayos *in vivo***

#### **3.1.- Aprobación ética**

Todos los procedimientos experimentales realizados se ajustan a la Directiva 2012/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, y el RD 53/2013 de regulación española sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos y aprobados por el Comité de la Universidad Miguel Hernández para el uso de animales en laboratorio.

#### **3.2.- Animales**

Se utilizaron un total de 10 ratones C57BL6J de 12 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones óptimas de luz, temperatura, humedad y ventilación, con libre acceso a comida y agua, con exposiciones a ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Se establecieron 4 grupos: grupo control sin tratamiento (C), grupo control inyectado con el plásmido desnudo (CP), grupo de animales inyectados con magnetoplexos con NeuroMag (M) y grupo de animales inyectados con magnetoplexos con FluoMag-N (MF), reflejados en la Tabla 3.1.

#### **3.3.- Tomografía de coherencia óptica (OCT) pre-inyección**

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica no invasiva basada en la interferometría que permite obtener imágenes de alta resolución del fondo retiniano, la cámara anterior y cortes histológicos de la retina *in vivo* de forma rápida.

Se anestesiaron los animales con una inyección intraperitoneal de ketamina (45 mg/kg, Imogene®, Merial) y xilacina (10 mg/kg, Rompun, Bayer Health Care). Se dilató la pupila de los ratones con Tropicamida 1% (Colircusí Tropicamida®, Alcon Cusí), y se puso lente de contacto (3,2 mm, Cantor+Nissel Market Place) para evitar la deshidratación corneal. A

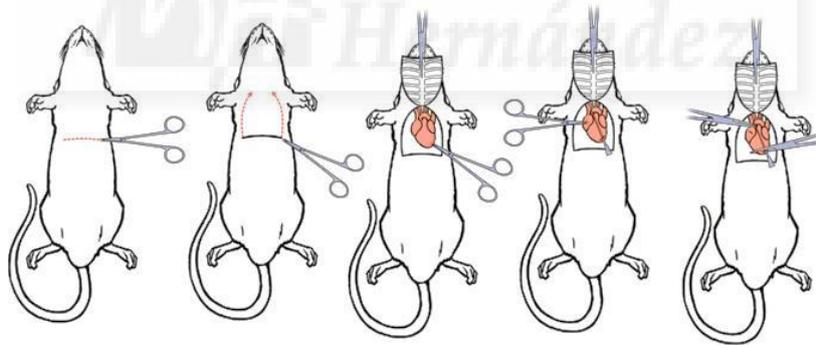
continuación, se examinaron los ojos utilizando tomografía de coherencia óptica con láser de barrido confocal (cSLO-OCT) Spectralis™ HRA+OCT (Heidelberg Engineering), antes de la inyección de los magnetocomplejos, así como una vez transcurridas 96 horas.

### 3.4.- Inyección intravítrea

Las inyecciones se realizaron bajo un microscopio de cirugía Zeiss OPMI®pico (Carl Zeiss) tras la perforación de la conjuntiva y la esclerótica en la región superotemporal adyacente a la ora serrata con microjeringas Hamilton de 5 µL (Hamilton®), y se inyectó un volumen de 1 µL de magnetoplexos en cada ojo. Se tuvo la precaución de no tocar el cristalino y se mantuvo la aguja en el ojo durante 5-10 segundos aproximadamente antes de retirarla para evitar el reflujo. Se expuso el globo ocular a un campo magnético (imán bajo la cabeza) durante 90 minutos para conducir los magnetoplexos al interior de la retina.

### 3.5.- Sacrificio y perfusión intracardiaca

Después de 4 días tras la inyección, se procedió al sacrificio de los animales. Para ello, se les aplicó una sobredosis de pentobarbital sódico (Doletal®) mediante una inyección intraperitoneal. La perfusión (Figura 6) se realizó con PFA al 4% tras varios lavados con PB 0'1M.



**Figura 6.** Procedimiento de perfusión.

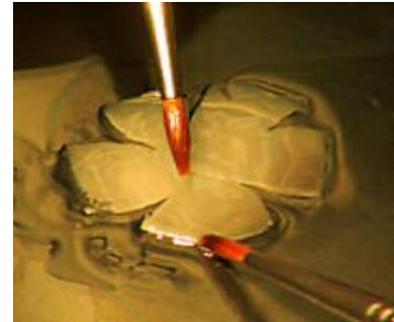
Fuente: [www.jove.com](http://www.jove.com) “Whole animal perfusion fixation for rodents”.

### 3.6.- Histología

Los ojos fueron enucleados, se realizó un pequeño corte en el limbo esclero-corneal para permitir la entrada del PFA en el globo ocular, y se dejaron en PFA 4% durante 1 hora. Algunos ojos fueron destinados para sacar la retina entera en plano (*Wholemout*) y otros para cortar y obtener secciones verticales de la retina.

- **Wholemout o retinas enteras, e inmunohistoquímica.-** Se trata de una técnica que consiste en colocar la retina completa en un mismo plano, lo que permite su posterior examen.

Una vez la retina fue extraída, se extendió y se realizaron cuatro cortes para poder aplanarla, dejando que adoptara la característica estructura de trébol (Figura 7). Fueron postfijadas durante 1 hora entre papeles de filtro, se lavaron y se incubaron toda la noche con Hoechst. Al día siguiente, se montaron y se examinó la fluorescencia directa con el microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) y con el microscopio confocal Leica TCS-SPE. En



**Figura 7.** Preparación de una retina entera (*Wholemout*).

Fuente: Ullmann, 2011.

algunas de las retinas enteras se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos. Para ello, se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PB Tritón x-100 (0'5%) y se dejó *overnight* en PB Tritón x-100 (2%). Transcurrido ese tiempo, se añadió la mezcla de los anticuerpos primarios durante 5 días a 4°C en agitación continua. Tras ello, se realizaron 3 lavados de 15 minutos con PB Tritón x-100 (0'5%) y se incubaron los anticuerpos secundarios durante 2 días a 4°C y agitación. Por último, se montaron las retinas con *antifading* sobre un portaobjetos y se procedió a la obtención de imágenes con el microscopio confocal Leica TCS-SPE.

- **Secciones verticales de retina (crioprotección, inclusión, corte e inmunohistoquímica).-** Los ojos fijados se lavaron 3 veces y se crioprotegieron en gradientes crecientes de sacarosa en PB 0'1M: 1 hora en sacarosa al 15% a temperatura ambiente, 1 hora en sacarosa al 20% a temperatura ambiente, y en sacarosa al 30% *overnight* a 4°C. Tras realizar la crioprotección, las muestras se incluyeron en O.C.T. (*Tissue Tek OCT Compound*, Sakura), un medio de inclusión específico para criostato, y se realizaron cortes de 16 µm en el criostato (Microm HM 505E), los cuales fueron recogidos sobre portaobjetos especiales para muestras criocongeladas (Superfrost®). Dichos cortes fueron sometidos a técnicas inmunohistoquímicas. Para ello, se realizaron 3 lavados con PB 0'1M y se bloquearon con BSA al 10% durante 1 hora. Posteriormente, las secciones de retina se incubaron *overnight* con la mezcla de anticuerpos primarios (Tabla 3.2) en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios

correspondientes (Tabla 3.3) durante 1 hora y en cámara húmeda. Finalmente, se montaron y se tomaron imágenes en el microscopio confocal Leica TCS-SPE.

### 3.7.- Citometría de flujo

96 horas tras la transfección, los ojos fueron enucleados y se procedió a la extracción de las retinas. Estas se dejaron durante 1 hora en la disolución de papaína 10 U/mL en HBSS a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se centrifugaron las muestras y se resuspendieron en PBS. Por último, las muestras se analizaron con un citómetro Becton Dickinson.

## 4.- Tablas para los procedimientos *in vitro*

Medio	Componentes
Medio de tripsinización	50% Tripsina (Gibco®) - Etilendiaminotetraacético (EDTA, Gibco®) 0'25% + 50% Glucosa (Panreac®) 33mM + HBSS
Medio neutralizante	50% Glucosa 33mM + HBSS
Medio de neuronas de cultivo primario	95'2% Neurobasal Medium + 2% FBS + 2% B27 50x (Gibco®) + 0'4% GlutaMAX (Gibco®) + 0'4% Penicilina-Streptomina (Pen-Strept, Gibco®)
Medio de retina de cultivo primario	87% DMEM + 10% FBS + 2% B27 50x (Gibco®) + 0'4% GlutaMAX (Gibco®) + 0'4% Penicilina-Streptomina (Pen-Strept, Gibco®)
Medio neutralizante para citometría	20% FBS + DMEM

Tabla 2.1.- Medios de cultivo empleados durante el estudio *in vitro*.

Anticuerpo primario	Tipo/Especie	Dilución	Solución de incubación	Casa comercial
anti-GFP	Monoclonal/Ratón	1:100	BSA 3%	Millipore™
anti-MAP2	Policlonal/Conejo	1:200	BSA 3%	Millipore™

Tabla 2.2.- Anticuerpos primarios empleados durante el estudio *in vitro*.

Anticuerpo secundario	Fluorocromo	Dilución	Solución de incubación	Casa comercial
anti-Mouse	Alexa Fluor 488	1:100	BSA 3%	Invitrogen™
anti-Rabbit	Alexa Fluor 555	1:100	BSA 3%	Invitrogen™

Tabla 2.3.- Anticuerpos secundarios empleados durante el estudio *in vitro*.

## 5.- Tablas para los procedimientos *in vivo*

Grupo	Partícula	Ojos histología	Ojos citometría
C	-	1	1
CP	-	0	1
M	NeuroMag	9	3
MF	FluoMag-N	4	0
			Total: 19

Tabla 3.1.- Grupos de animales y técnicas a las que se destinaron los ojos.

Anticuerpo primario	Tipo/Especie	Dilución	Solución de incubación	Casa comercial
anti-GFP	Monoclonal/Ratón	1:100	PBS + Tritón x-100 (0'5%)	Millipore™
anti-NeuN	Policlonal/Conejo	1:200	PBS + Tritón x-100 (0'5%)	Millipore™
anti-Calretinina	Policlonal/Cabra	1:200	PBS + Tritón x-100 (0'5%)	Millipore™

Tabla 3.2.- Anticuerpos primarios empleados durante el estudio *in vivo*.

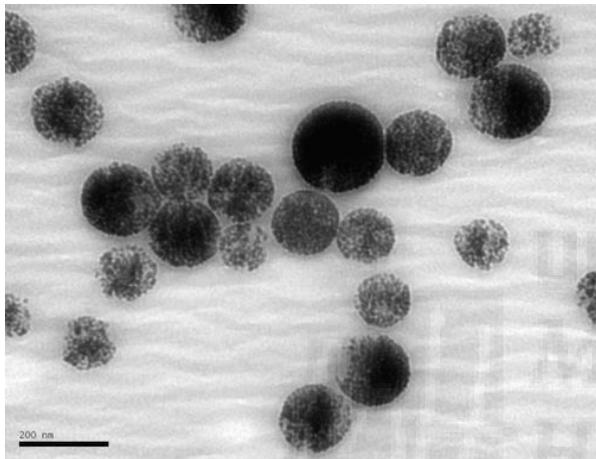
Anticuerpo secundario	Fluorocromo	Dilución	Solución de incubación	Casa comercial
anti-Mouse	Alexa Fluor 488	1:100	PBS + Tritón x-100 (0'5%)	Invitrogen™
anti-Rabbit	Alexa Fluor 555	1:100	PBS + Tritón x-100 (0'5%)	Invitrogen™
anti-Goat	Alexa Fluor 633	1:100	PBS + Tritón x-100 (0'5%)	Invitrogen™

Tabla 3.3.- Anticuerpos secundarios empleados durante el estudio *in vivo*.

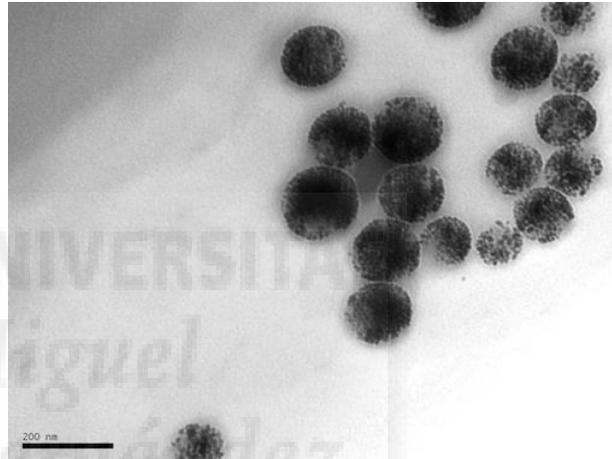
# RESULTADOS

## 1.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Mediante microscopía electrónica, se corroboró un tamaño medio de las nanopartículas NeuroMag entre los 170 y los 200 nm. Sin estudios precedentes, se observaron también las nanopartículas magnéticas FluoMag-N, iguales a las primeras con un fluoróforo incorporado, cuyo tamaño oscilaba entre los 180 y los 200 nm. La morfología de ambos tipos de nanopartículas se puede observar en las Figuras 8 y 9, donde se aprecia una estructura esférica.



**Figura 8.** Imagen de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro cargadas positivamente (NeuroMag), obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. Escala: 200 nm.

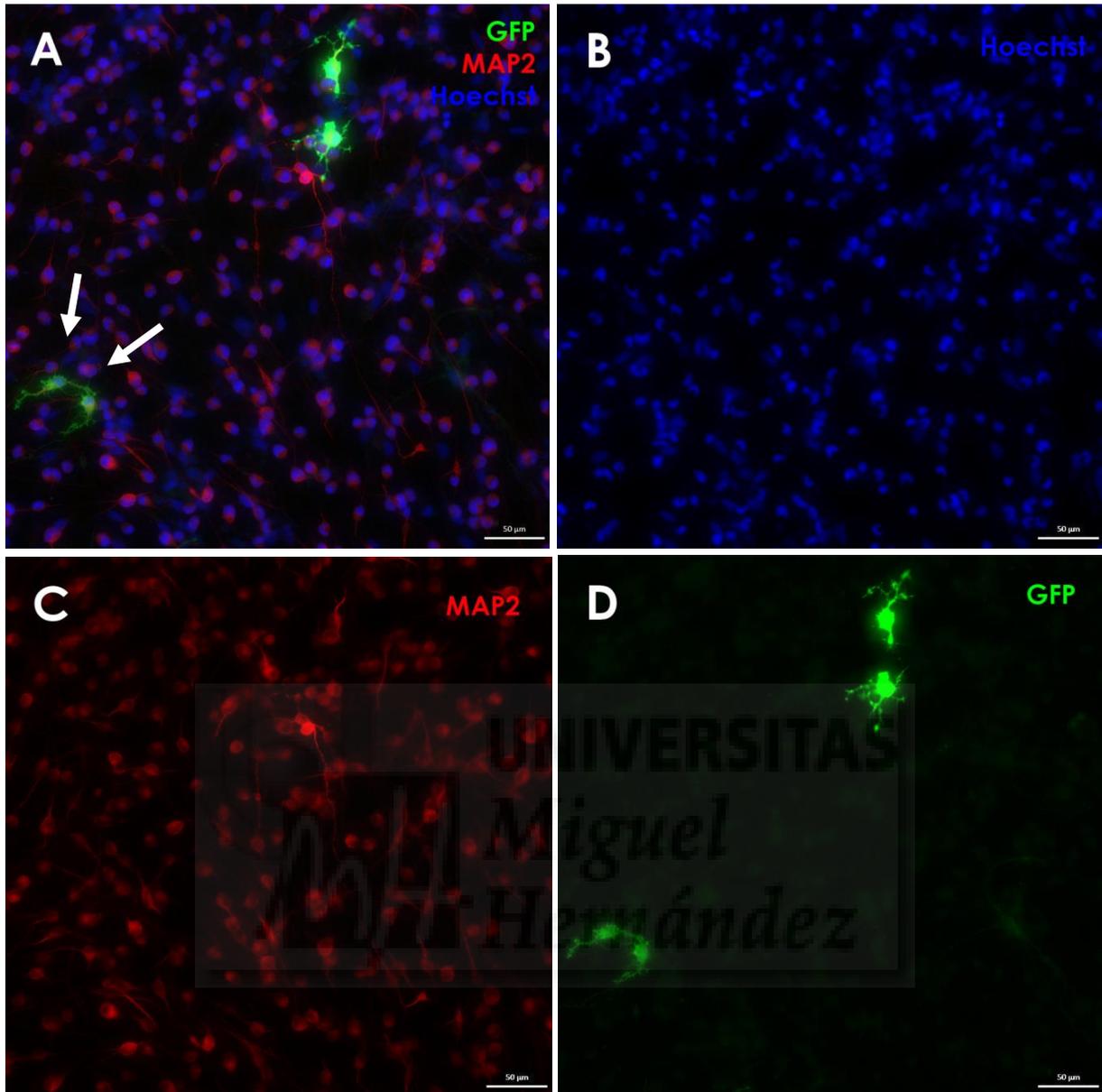


**Figura 9.** Imagen de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro cargadas positivamente con fluoróforo (FluoMag-N), obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión. Escala: 200 nm.

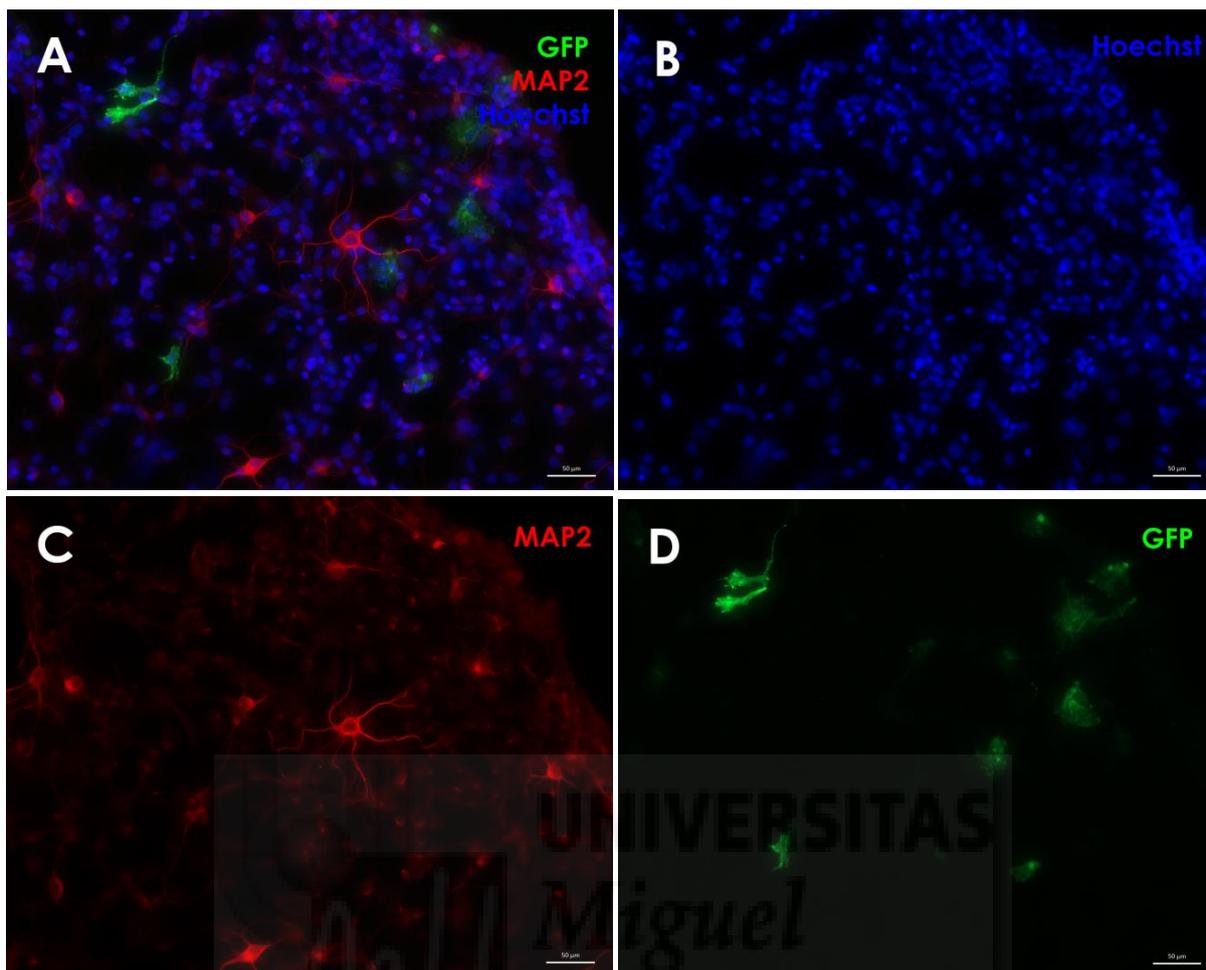
## 2.- Ensayos *in vitro*

### 2.1.- Inmunocitoquímica en las transfecciones de los cultivos primarios

En las Figuras 10 y 11, se muestran las inmunocitoquímicas realizadas con anticuerpos contra la GFP y contra MAP2 en cultivo primario de corteza y en el de retina, respectivamente. En cada una de ellas aparecen por separado los distintos canales, en el canal azul los núcleos teñidos (10B y 11B), en el canal verde las células que expresaban la GFP (10D y 11D) y en el rojo las neuronas maduras marcadas con MAP2 (10C y 11C). En la superposición de los tres canales (Figuras 10A y 11A), se observó expresión para la GFP en diferentes tipos celulares. En ciertas muestras se apreció colocalización de algunas células GFP positivas con MAP2 (Figura 3A, flechas blancas).



**Figura 10.** Cultivo primario de corteza transfectado con magnetoplexos con NeuroMag. En la imagen A aparecen superpuestas las imágenes obtenidas en los tres canales (B-D), pudiendo observarse los núcleos en azul (B), las neuronas en rojo (C) y la transfección en verde (D), además de la colocación células transfectadas con los magnetoplexos y que expresaban la GFP., señaladas con una flecha blanca (A). Escala: 50 µm.

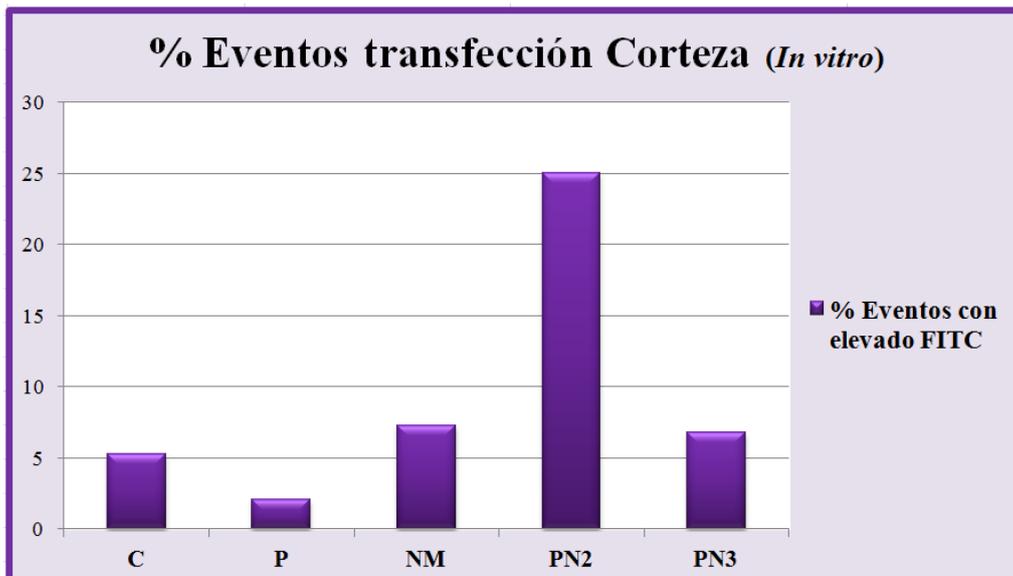


**Figura 11.** Cultivo primario de retina transfectado con magnetoplexos con NeuroMag. En la imagen A aparecen superpuestas las imágenes obtenidas en los tres canales (B-D). En la imagen B se aprecian los núcleos celulares teñidos con Hoechst. En la imagen C las neuronas maduras marcadas con MAP2. En la imagen D células transfectadas con los magnetoplexos que expresaban la GFP. Escala 50 µm.

## 2.2.- Citometría de flujo

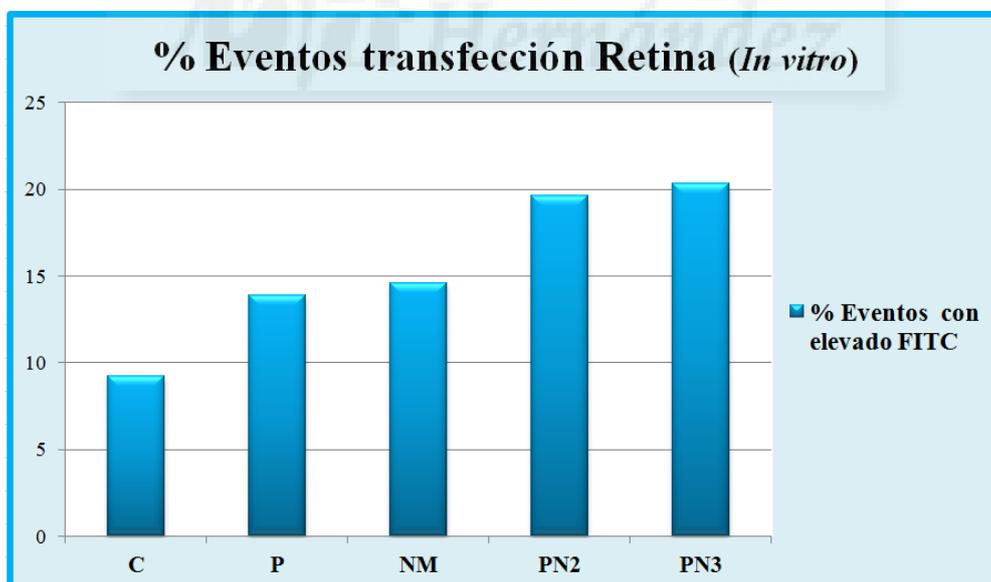
Se establecieron 5 grupos: grupo control sin tratamiento (C), grupo control tratado con el plásmido desnudo (P), grupo control tratado con nanopartículas magnéticas NeuroMag (NM), grupo tratado con una concentración 1:2 de plásmido frente a magnetopartículas NeuroMag (PN2) y grupo con una concentración 1:3 de plásmido frente a magnetopartículas NeuroMag (PN3).

En los resultados obtenidos en las transfecciones de cultivo primario de corteza a la concentración 1:2, el 25% de la población de células presentaba una elevada intensidad para el FITC, frente al 7% a la concentración 1:3 (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Porcentaje de población celular que presentaba elevados niveles de intensidad para el FITC en la transfección de cultivo primario de corteza. El número de células transfectadas para el grupo PN2 es mayor que para el resto. En concentración 1:2 (grupo PN2) el 25% de las células presentaban transfección, frente al 7% del 1:3 (grupo PN3).

En los resultados obtenidos en las transfecciones de cultivo primario de retina tanto a la concentración 1:2 como a 1:3, el 20% de la población de células de la retina presentaban una elevada media de la intensidad para el FITC (Gráfica 2).

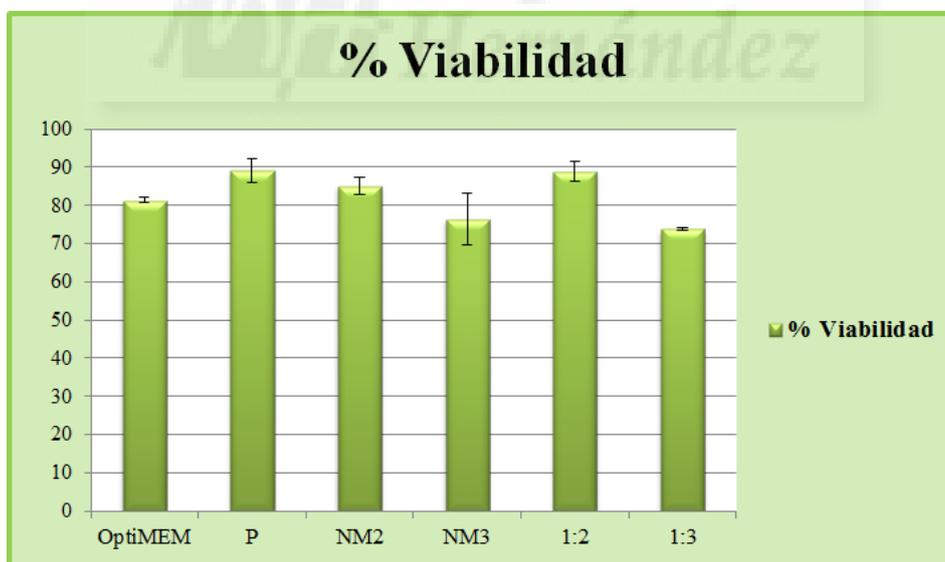


**Gráfica 2.** Porcentaje de población celular que presentaba transfección obtenido en la transfección de cultivo primario de retina. En concentración 1:2 (grupo PN2) y en concentración 1:3 (grupo PN3), el 20% de las células presentaban elevada intensidad para FITC.

### 2.3.- MTT y toxicidad

En la transfección de cultivo primario de corteza se establecieron 6 grupos para el ensayo de viabilidad: grupo control en cultivo primario de corteza con OptiMEM (OptiMEM), grupo control en cultivo primario de corteza tratado con el plásmido desnudo (P), grupo control en cultivo primario de corteza tratado con las nanopartículas magnéticas NeuroMag en concentración 0:2 (NM2), grupo control en cultivo primario de corteza tratado con las nanopartículas magnéticas NeuroMag en concentración 0:3 (NM3), grupo en cultivo primario de corteza con concentración 1:2 de plásmido frente a magnetopartículas NeuroMag (1:2) y grupo en cultivo primario de corteza con concentración 1:3 de plásmido frente a magnetopartículas NeuroMag (1:3).

Según los datos mostrados en la Gráfica 3, el OptiMEM reduce la viabilidad celular casi un 20% y el plásmido desnudo en un 10%. A mayor concentración de magnetopartículas NeuroMag, la viabilidad celular se vio disminuida hasta en un 25%. Sucede lo mismo si se aumenta la concentración de magnetopartículas en los magnetoplexos, siendo la viabilidad celular para la concentración 1:2 de casi el 90%, mientras que para la concentración 1:3 tan solo llega al 74%.

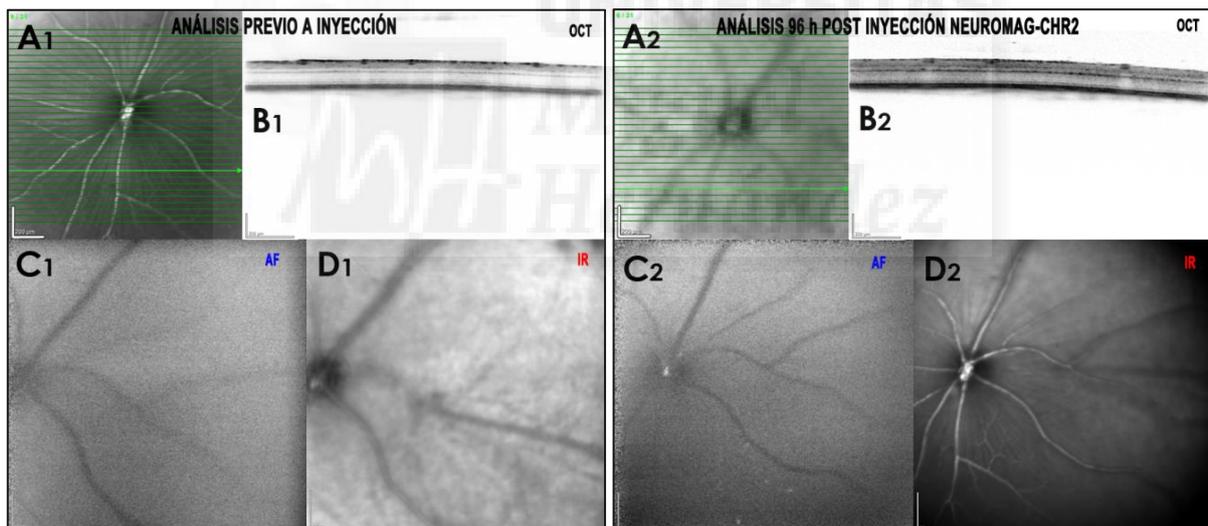


**Gráfica 3.** Ensayo de MTT para comprobar la citotoxicidad en las transfecciones de cultivo primario de corteza con las magnetopartículas NeuroMag tras 96 horas. Las muestras sometidas al estudio son: cultivo primario con OptiMEM, cultivo primario con el plásmido desnudo (P), cultivo primario con dos concentraciones de magnetopartículas NeuroMag 0:2 y 0:3 (NM2 y NM3), y cultivo primario con los magnetoplexos en proporciones 1:2 y 1:3 (1:2 y 1:3).

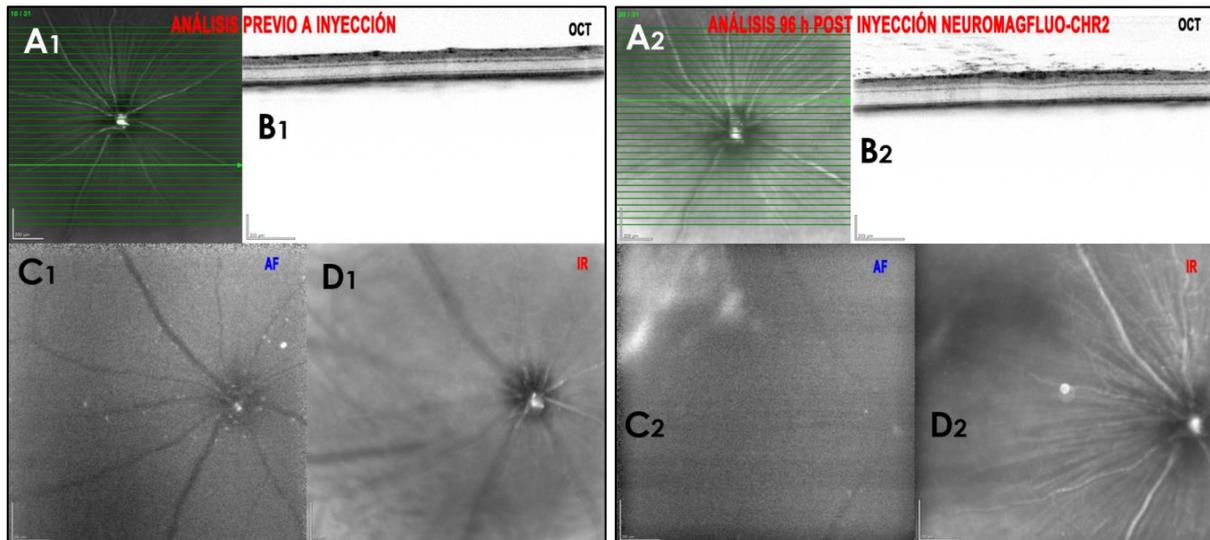
### 3.- Ensayos *in vivo*

#### 3.1.- Tomografía de coherencia óptica (OCT)

Se obtuvieron imágenes previas a la inyección y 96 horas tras la misma. En la Figura 12 se muestra un grupo de imágenes tomadas para el ensayo con las magnetopartículas NeuroMag, antes y después de la inyección. En ellas se corrobora que no existen desprendimientos antes o después de la inyección y que la retina se mantiene en condiciones óptimas para llevar a cabo el ensayo (Figuras 12A y 12B). No se encontraron diferencias en la autofluorescencia antes y después de la inyección para el tratamiento con magnetopartículas NeuroMag (Figuras 12C y 12D). En la Figura 13 se muestra un grupo de imágenes tomadas mediante el mismo procedimiento para el ensayo con las magnetopartículas FluoMag-N. En este segundo grupo, se comprobó que el estado de la retina y el fondo de ojo permanecían en condiciones óptimas para la realización del ensayo antes de la inyección, destacando la presencia de pequeñas partículas en el vítreo pegado a la retina interna. Sin embargo, 96 horas tras la inyección se pueden apreciar claramente zonas con autofluorescencia.



**Figura12.** Imágenes obtenidas mediante tomografía de coherencia óptica de láser confocal durante el análisis previo (A1, B1, C1 y D1) y posterior (A2, B2, C2 y D2) a la inyección con los magnetoplexos con NeuroMag. En las imágenes A1 y A2 se aprecia una línea verde, que indica la zona de la retina en la que se está realizando el análisis. En B1 y B2 se pueden diferenciar las capas que componen la retina y su estado, que tras la inyección (B2) no presenta desprendimientos o daños al compararlo con B1. En las imágenes C1 y C2 no se detecta autofluorescencia antes (C1) o después (C2) de la inyección. Por último, en las imágenes D1 y D2 se muestra el fondo de ojo en su totalidad en condiciones óptimas para la realización del ensayo. Escala: 200  $\mu$ m.

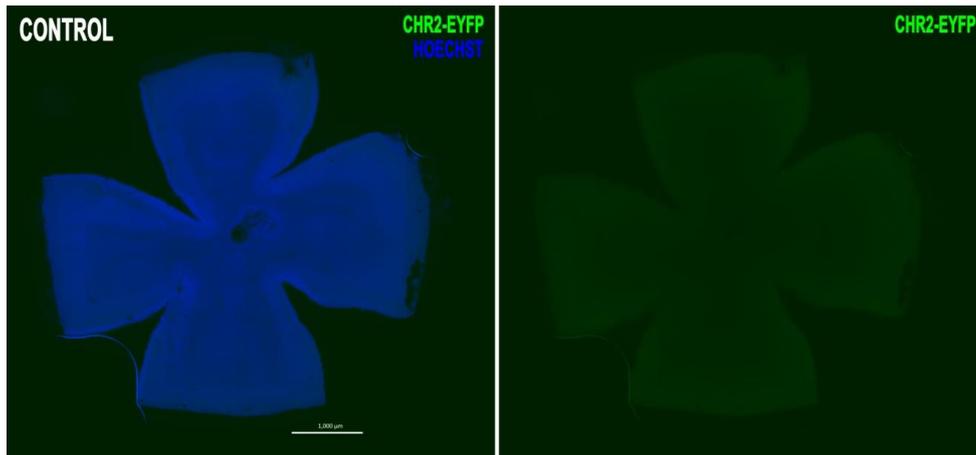


**Figura 13.** Imágenes obtenidas mediante tomografía de coherencia óptica de láser confocal durante el análisis previo (A1, B1, C1 y D1) y posterior (A2, B2, C2 y D2) a la inyección con los magnetoplexos con FluoMag-N. En las imágenes A1 y A2 se muestra una línea verde, que indica la zona de la retina en la que se está realizando el análisis. En B1 y B2 se pueden diferenciar las capas que componen la retina y su estado, que tras la inyección (B2) no presenta desprendimientos o daños al compararlo con B1, pero sí se aprecian partículas en la zona interna. En C1 no se detecta autofluorescencia, mientras que tras la inyección (C2) se puede apreciar claramente una zona autofluorescente en la zona superior izquierda. Por último, en las imágenes D1 y D2 se aprecia el fondo de ojo en su totalidad en condiciones óptimas para la realización del ensayo, apareciendo en D2 una zona más oscura, concordante a la zona con autofluorescencia de la imagen C2. Escala: 200  $\mu$ m.

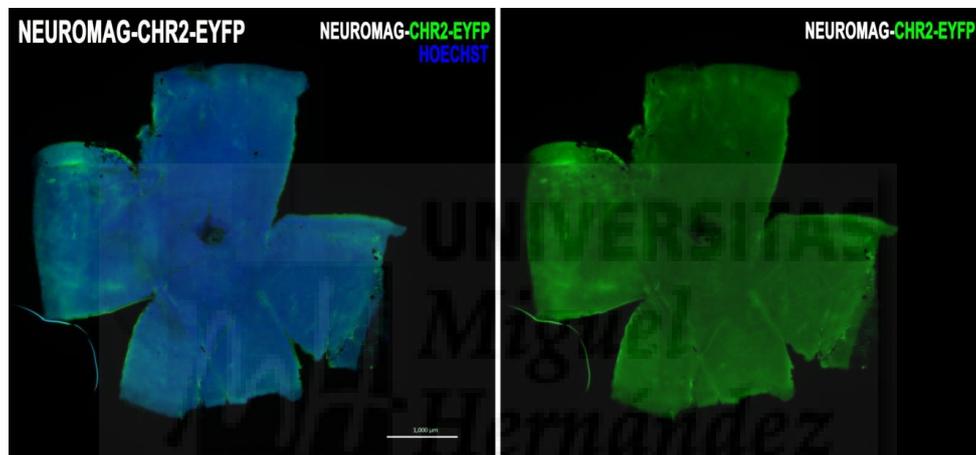
### 3.2.- Reconstrucción de las retinas enteras y fluorescencia directa

Se obtuvieron imágenes de las retinas *wholemout*, tanto del control como para las tratadas con NeuroMag y con FluoMag-N, pudiendo diferenciarse notablemente la transfección en zonas circundantes a la inyección.

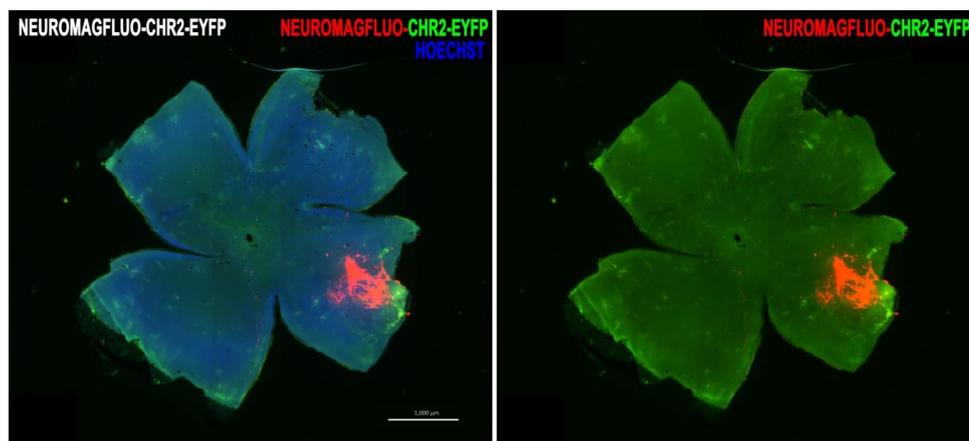
Al comparar las imágenes, se pudo distinguir la fluorescencia directa que proporcionan los magnetoplexos con las magnetopartículas NeuroMag frente al control que sólo portaba el plásmido en color verde, mostrados en las Figuras 15 y 14, respectivamente. Para las retinas inyectadas con los magnetoplexos con las magnetopartículas FluoMag-N, además, se pudo observar la zona de la inyección por el color rojo del fluoróforo que poseen partículas, mostrado en la Figura 16.



**Figura 14.** Imágenes de la retina *wholemount* control, en la que se inyectó el plásmido de la ChR2. A la izquierda, imagen tomada en el canal azul, donde se aprecia la retina cuyos núcleos han sido teñidos con Hoechst. A la derecha, imagen del canal verde. Escala: 1000 µm.



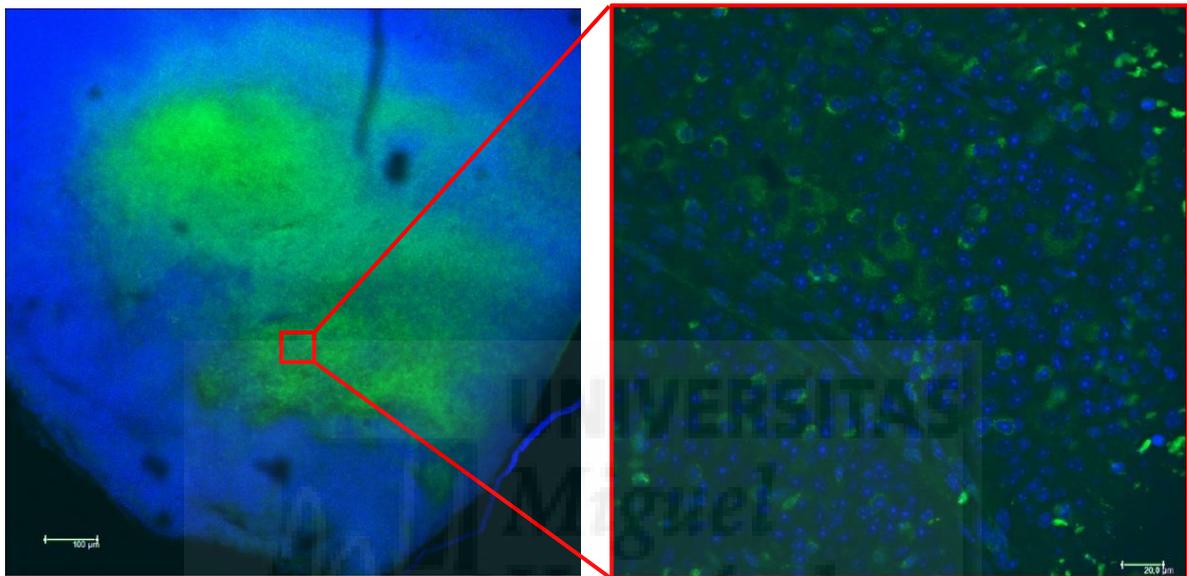
**Figura 15.** Retina *wholemount* tratada con los magnetoplexos formados por el plásmido de la ChR2 y las magnetopartículas NeuroMag. A la izquierda, retina cuyos núcleos han sido teñidos con Hoechst, se aprecia la fluorescencia directa de la transfección. A la derecha, imagen tomada la fluorescencia directa de la YFP de la misma retina. Escala: 1000 µm.



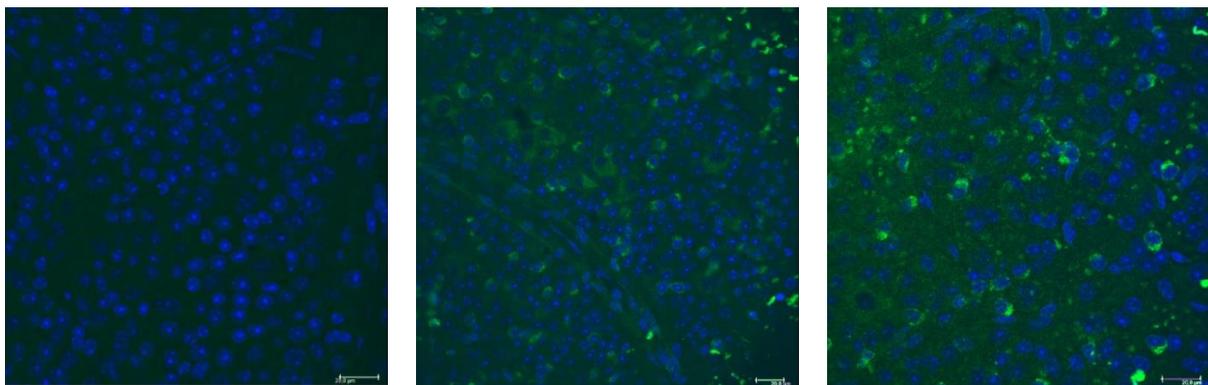
**Figura 16.** Retina *wholemount* tratada con los magnetoplexos formados por el plásmido de la ChR2 y las magnetopartículas FluoMag-N. A la izquierda, se aprecia la retina, cuyos núcleos han sido teñidos con Hoechst y la fluorescencia directa de la transfección, además de una zona roja en la que se encuentran las FluoMag-N. A la derecha, se muestra la fluorescencia directa de la YFP, en la que se aprecia además la zona roja perteneciente a las FluoMag-N. Escala: 1000 µm.

En las retinas en las que destacó esta fluorescencia directa, fueron tomadas imágenes detalladas mediante microscopía confocal tanto para las nanopartículas NeuroMag como para las FluoMag-N frente a un control, en las que se diferencia claramente la fluorescencia de la transfección.

En las Figuras 17 y 18 se aprecian los núcleos de las células ganglionares en retinas enteras teñidos de azul por Hoechst. En esta capa, los núcleos se encuentran rodeados de fluorescencia verde proveniente de la expresión para la YFP.



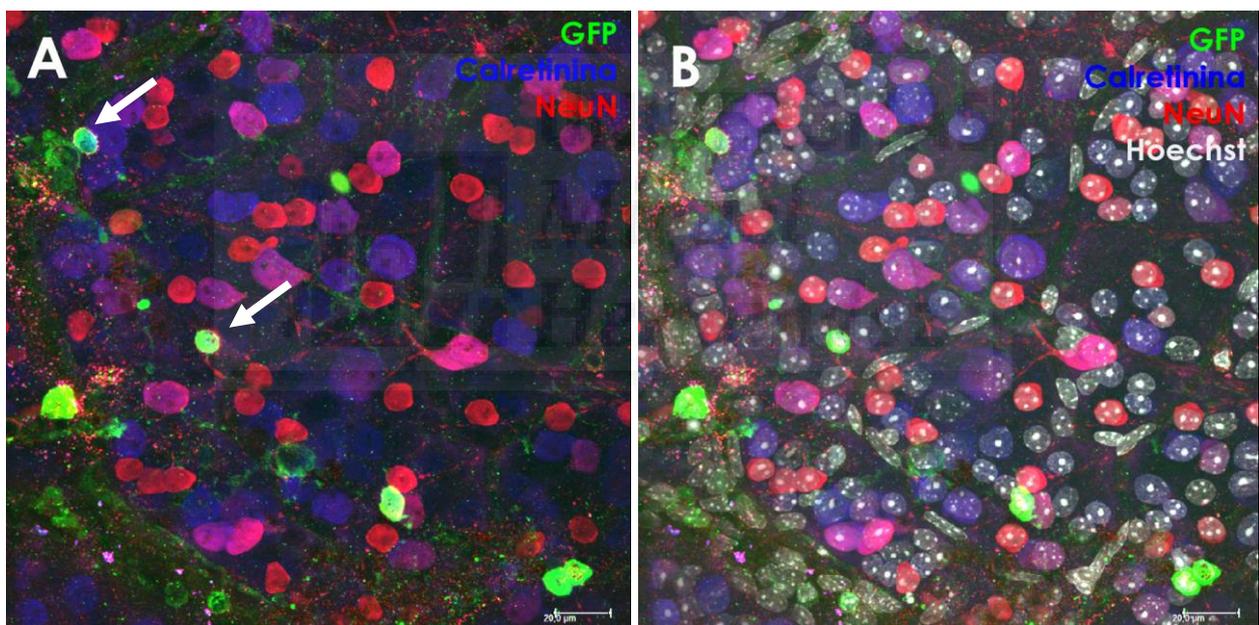
**Figura 17.** Transfección en retina entera con magnetopartículas NeuroMag. A la izquierda, a bajos aumentos se muestra fluorescencia directa de la zona de la inyección para las retinas tratadas con Hoechst y los magnetoplexos con el plásmido de la ChR2 y las nanopartículas NeuroMag. A la derecha, una imagen que muestra una pequeña zona de la transfección en detalle, donde los núcleos de las células ganglionares poseen YFP y se encuentran rodeados de fluorescencia verde. Escalas: 100  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18.** Transfección en retina con magnetopartículas NeuroMag y FluoMag-N. A la izquierda, imagen de células de la retina control teñida con Hoechst, en la que no se aprecia fluorescencia directa. En el centro, imagen de las células de la retina tratada con los magnetoplexos con NeuroMag, en la que se aprecia fluorescencia directa alrededor y en algunos de los núcleos celulares de la capa de células ganglionares. A la derecha, imagen de las células de la retina tratada con los magnetoplexos con FluoMag-N, en la que también se aprecia fluorescencia directa alrededor y en algunos de los núcleos celulares de la capa de células ganglionares. Escala: 20  $\mu\text{m}$ .

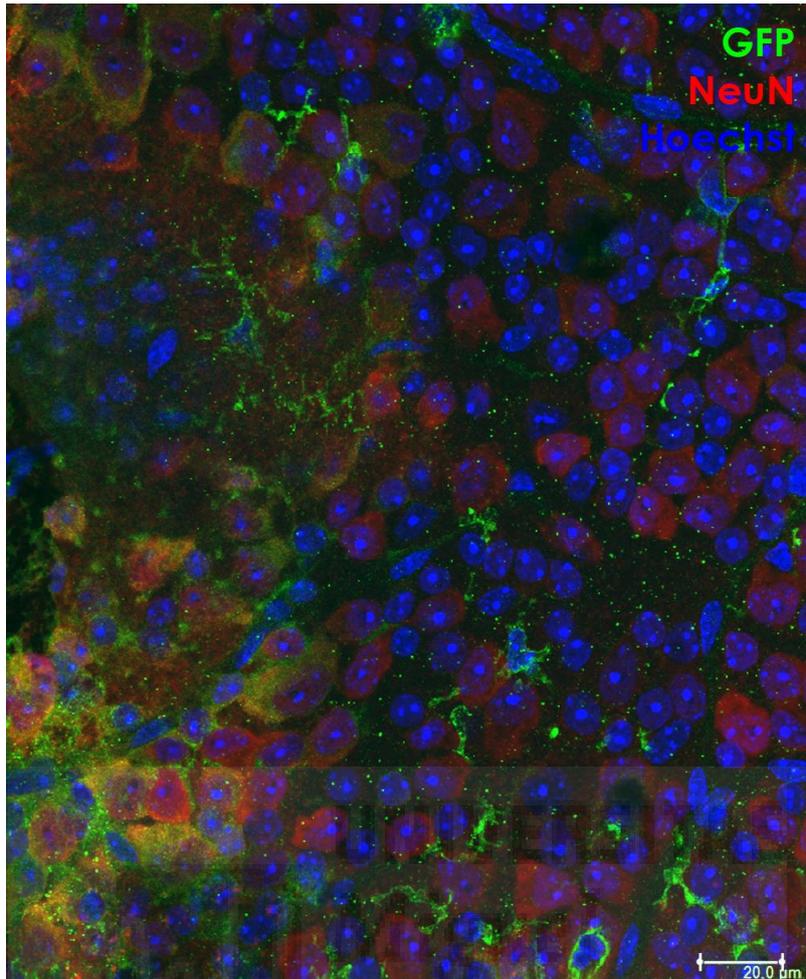
### 3.3.- Inmunohistoquímica en retinas enteras

Se obtuvieron imágenes detalladas en las que se pudo diferenciar la señal producida por el anticuerpo anti-GFP (en verde). Además, se observó en la capa de células ganglionares la colocalización de algunas células que expresaban la GFP con NeuN y calretinina (señalado mediante flechas en la Figura 19A). En las Figuras 19 y 20 se muestra la transfección con magnetopartículas NeuroMag, donde se aprecian células de una retina tratada con los magnetoplexos con NeuroMag (19A). En estas figuras, se representan las células que presentaron GFP en verde, las neuronas marcadas con NeuN en rojo y las marcadas con calretinina en azul. Se observa la colocalización de algunas células transfectadas (GFP) con NeuN y calretinina, señaladas con flechas blancas. En la Figura 19B se puede ver la misma imagen añadiendo el Hoechst en gris, para la visualización y diferenciación de los núcleos celulares.



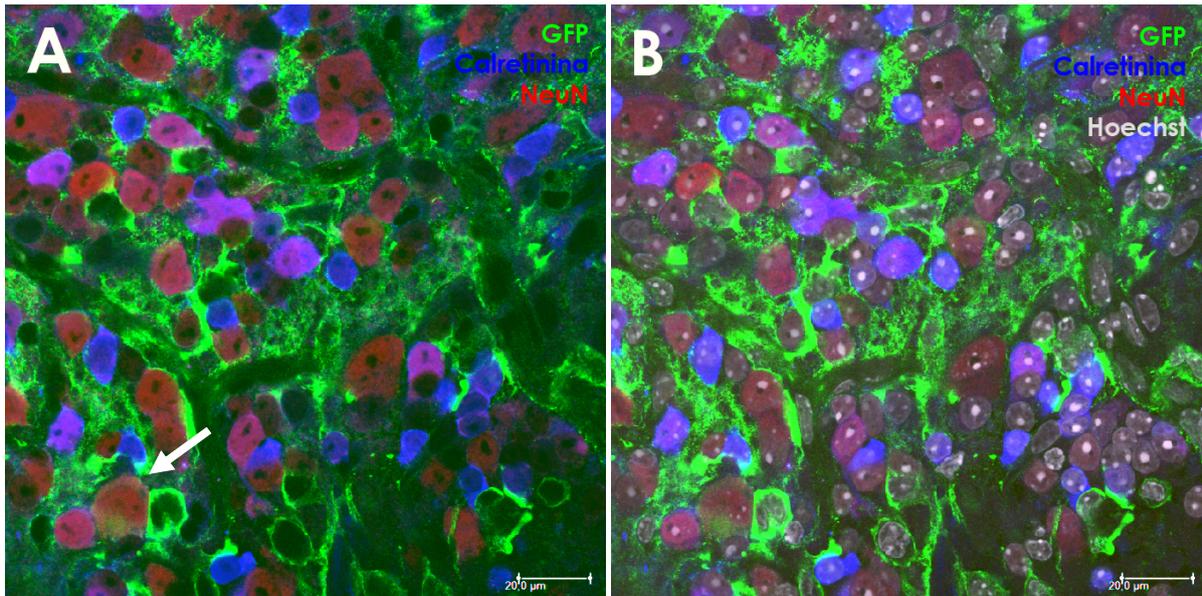
**Figura 19.** Transfección en retina con magnetopartículas NeuroMag en inmunohistoquímica. En la imagen A se aprecian células de una retina tratada con los magnetoplexos con NeuroMag. Se representa la GFP en verde, las neuronas marcadas con NeuN en rojo y las marcadas con calretinina en azul. Las flechas blancas señalan la colocalización de neuronas transfectada. En B, la misma imagen en la que se observan los núcleos celulares en gris, teñidos previamente con Hoechst. Escala: 20 µm.

En la Figura 20 se pueden apreciar las células de una retina transfectada con los magnetoplexos con NeuroMag. Se representan los núcleos celulares en azul, teñidos con Hoechst, en rojo las neuronas marcadas con NeuN y en verde la transfección de la GFP. Se aprecia la colocalización de los tres marcajes con mayor incidencia en la zona inferior izquierda.



**Figura 20.** Inmunohistoquímica de una retina transfecteda con NeuroMag. Teñidos con Hoechst, se pueden apreciar los núcleos celulares en azul, las neuronas marcadas con NeuN representadas en rojo y en verde la transfección de la GFP. En la zona inferior izquierda de la imagen se aprecia la colocalización de los tres marcadores. Escala: 20  $\mu\text{m}$ .

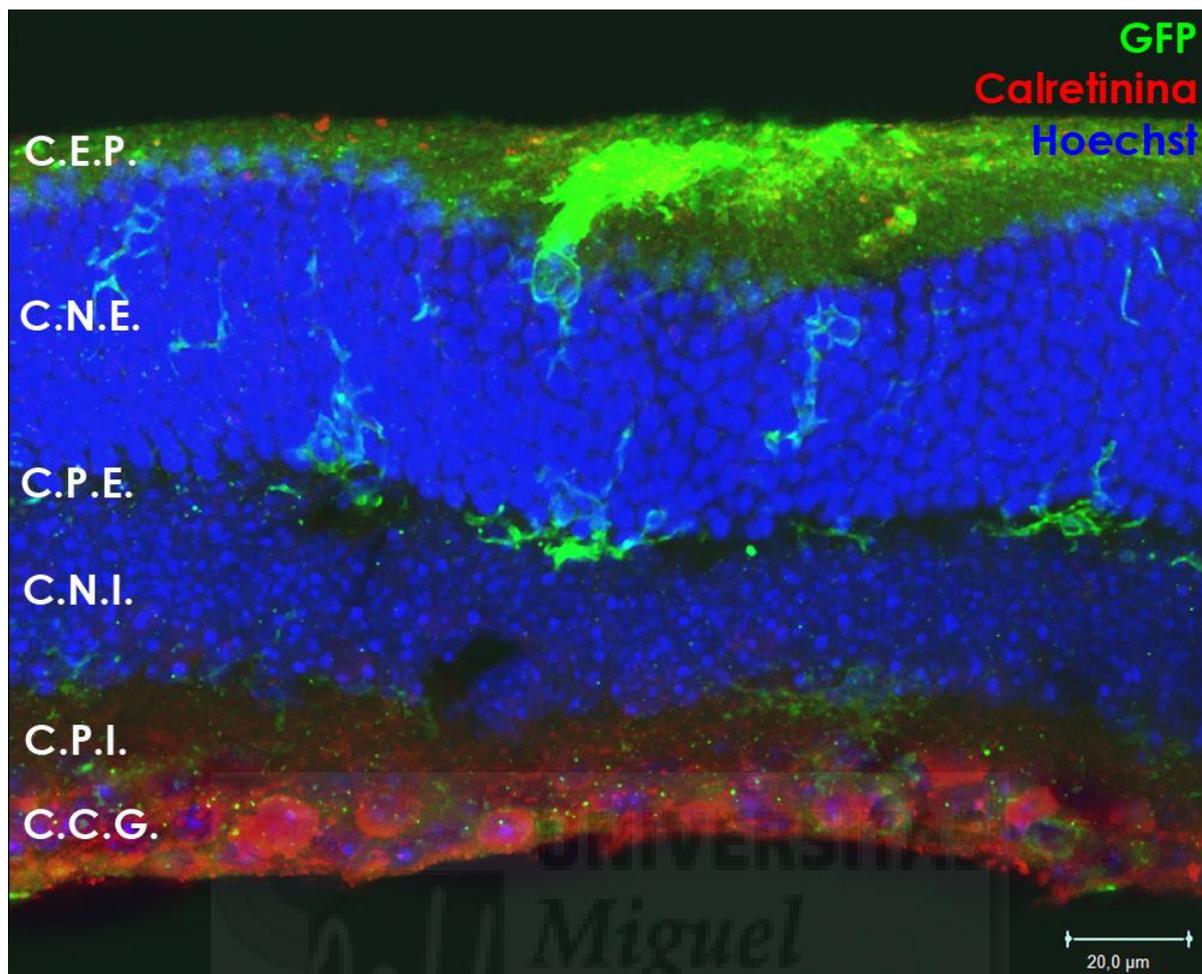
En la Figura 21A aparecen células de una retina tratada con los magnetoplexos con las nanopartículas FluoMag-N, en la que se muestran las células que presentaron GFP en verde, las neuronas marcadas con NeuN en rojo y las marcadas con calretinina en azul. Se puede observar gran cantidad de GFP rodeando a las neuronas y colocalizaciones puntuales de las neuronas y la GFP, señalizadas con una flecha blanca. En 21B, la misma imagen añadiendo el Hoechst en gris, para la visualización y diferenciación de los núcleos celulares.



**Figura 21.** Inmunohistoquímica en retinas transfectadas con FluoMag-N. En verde, células transfectadas con GFP, en rojo y azul se diferencian las neuronas marcadas con NeuN y calretinina respectivamente. La colocalización de células ganglionares transfectadas está señalizada con una flecha blanca. En B, la misma imagen añadiendo el Hoechst en gris, para la visualización y diferenciación de los núcleos celulares. Escala: 20 µm.

### 3.4.- Inmunohistoquímica en secciones verticales de retinas

Se utilizaron las retinas tratadas con los magnetoplexos tanto con NeuroMag como FluoMag-N. Los ojos fueron cortados y sometidos a inmunohistoquímica previamente a la obtención de las imágenes. En dichas imágenes se pudo observar transfección de los magnetoplexos en la capa de células ganglionares, colocalizando con la calretinina, en la capa plexiforme interna y externa, en los cuerpos celulares de los fotorreceptores y en el epitelio pigmentario. Las capas con mayor cantidad de transfección resultaron ser el epitelio pigmentario y la capa de células ganglionares, como se puede apreciar en la Figura 22.

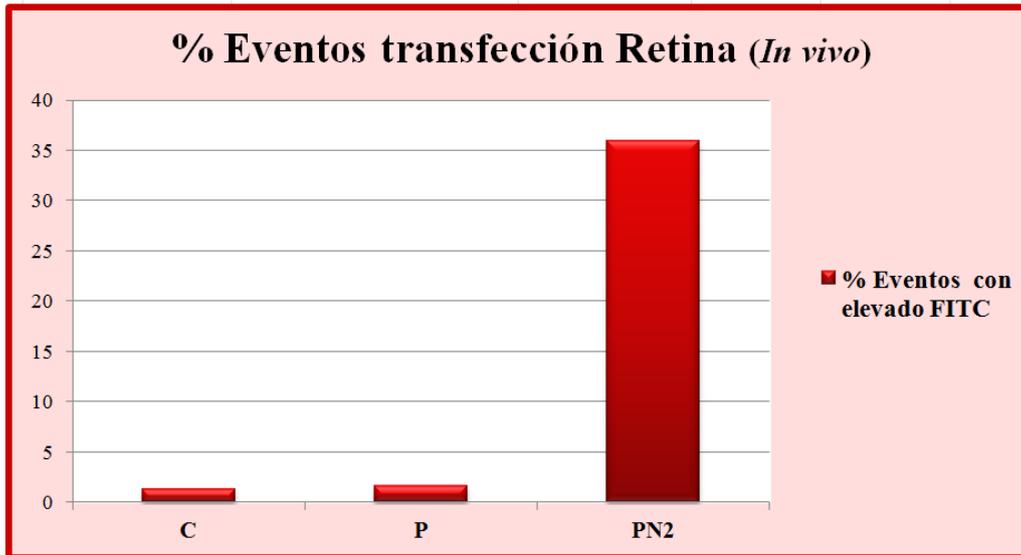


**Figura 22.** Sección vertical de una retina tratada con los magnetoplexos con las NeuroMag. Se observan los núcleos celulares teñidos en azul con Hoechst, en rojo las neuronas marcadas con calretinina y en verde las transfección con la expresión de la GFP. La expresión de la GFP se dio con mayor incidencia en el epitelio pigmentario (C.E.P.), como en la capa de células ganglionares (C.C.G.). También se aprecia expresión de la GFP en la capa plexiforme tanto externa (C.P.E.), como interna (C.P.I.), y en los cuerpos celulares de los fotorreceptores en la capa nuclear externa (C.N.E.). Escala: 20  $\mu$ m.

### 3.5.- Citometría de flujo

Se establecieron 3 grupos de muestras: grupo control sin tratamiento (C), grupo control inyectado con el plásmido desnudo (P) y grupo inyectado con una concentración 1:2 de plásmido frente a magnetopartículas NeuroMag (PN2).

En los resultados obtenidos para el grupo PN2, el 21% de la población de células de la retina presentaban elevadas intensidades para el FITC (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Porcentaje de población celular que presentaba elevados niveles de intensidad para el FITC obtenido en retina. El número de células transfectadas para el grupo PN2 representa el 21% de la población de células.



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La terapia génica combina el tratamiento médico en desarrollo y la investigación continua con el fin de modular, reemplazar, adicionar o inhibir genes. Además, invierte grandes esfuerzos intelectuales y financieros para optimizar la administración de genes en cualquier tipo celular. Actualmente, el sistema nervioso continúa presentando grandes dificultades para ser transfectado. Adicionalmente, la terapia génica con vectores víricos añade problemas de estabilidad, versatilidad, carcinogénesis, tamaño del inserto o expresión a largo plazo. Los magnetoplexos se presentan como una excelente alternativa a la utilización de vectores víricos en la terapia génica del sistema nervioso.

Con el fin de continuar estudios anteriores realizados por el grupo de investigación sobre la magnetotransfección, se ha estudiado la transfección del plásmido pLenti-Synapsin-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE junto con magnetopartículas NeuroMag y FluoMag-N, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tras determinar un tamaño de entre 180 y 200 nm de las magnetopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión, se observó una morfología similar para ambos tipos de magnetopartículas. Estos datos corroboran la hipótesis de que la adición del fluoróforo a las FluoMag-N no influye en el tamaño o morfología con respecto a las NeuroMag.

Una vez caracterizadas las magnetopartículas, se realizaron ensayos *in vitro*. Estudios previos en la Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual optimizaron la concentración óptima para la transfección de dichos magnetoplexos *in vitro*. En el presente trabajo se ha confirmado la transfección en diversos tipos celulares (entre ellos neuronas), en los cultivos primarios de corteza, en un ratio 1:2 de plásmido:magnetopartícula. Adicionalmente, la citometría de flujo mostró en el ratio 1:2 el mayor porcentaje de población que presentaba una intensidad elevada para el filtro FITC, reflejando así la población que mayor transfección presentaba respecto a 1:3. Sin embargo, es necesaria la repetición del ensayo hasta alcanzar una cantidad de valores suficiente para poder validar los resultados.

En cuanto a la viabilidad celular, los resultados de los controles indicaron que el OptiMEM disminuía la viabilidad en un 20%, por lo que la disminución de la viabilidad en las muestras tratadas con diferentes ratios de concentraciones podría deberse parcialmente a la adición de OptiMEM. También se comprobó que la viabilidad era inversamente proporcional a la concentración de las magnetopartículas, siendo esta menor a concentraciones mayores.

No obstante, es necesario repetir el ensayo hasta alcanzar una cantidad de datos suficientes para que dicho ensayo sea reproducible.

Para los estudios de magnetotransfección en ojos de ratones, se tomaron imágenes mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) previamente y 96 horas tras la inyección. En las imágenes obtenidas se pudo comprobar que el estado del fondo de los ojos era óptimo en todos los animales antes y después de las inyecciones. Los fondos de ojo y las retinas permanecieron en buena condición para ambos tipos de partículas. Sin embargo, en algunos casos tras la inyección de magnetopartículas FluoMag-N, existían algunas partículas en el vítreo además de una pequeña cantidad de autofluorescencia, siendo un vehículo excelente para realizar el seguimiento de la transfección en retina.

Los animales control tratados con el plásmido desnudo no mostraron evidencias de fluorescencia directa, mientras que aquellas retinas tratadas con las magnetopartículas sí que presentaron dicha fluorescencia con mayor intensidad en la zona de inyección y a lo largo de toda la retina, pudiendo diferenciar claramente la zona de la inyección en aquellas tratadas con FluoMag-N gracias al fluoróforo rojo que llevan incorporado las partículas.

El análisis inmunohistoquímico en las retinas enteras desveló una elevada inmunofluorescencia para GFP en la capa de células ganglionares. En secciones verticales de retina, además, se pudo observar fluorescencia para la GFP en diferentes capas, habiendo una mayor incidencia en la capa del epitelio pigmentario y en la de células ganglionares, donde se hace muy difícil la transfección *in vivo* con vectores no víricos.

Finalmente, la citometría de flujo de la transfección *in vivo* mostró un aumento del porcentaje de la población que presenta una elevada intensidad para el filtro FITC. Este valor sería equivalente a la población de células transfectadas que expresan la YFP en retina. La existencia de fluorescencia en los animales control podría deberse a la autofluorescencia propia de ésta, aunque sería necesario repetir el ensayo hasta obtener resultados suficientes como para que dicho ensayo sea reproducible.

Los resultados obtenidos durante el estudio apoyan a las magnetopartículas como vectores no víricos ideales para la transfección en células del sistema nervioso tanto para ensayos *in vivo* como *in vitro*. Este proyecto presenta un enfoque prometedor para el control de la actividad neuronal y conduce hacia nuevos estudios para otras construcciones con diferentes opsinas.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado la eficacia de la transfección de los complejos magnetoplexos formados por nanopartículas magnéticas y el plásmido portador de la *Channelrhodopsin2*. Mediante los datos obtenidos se vio que:

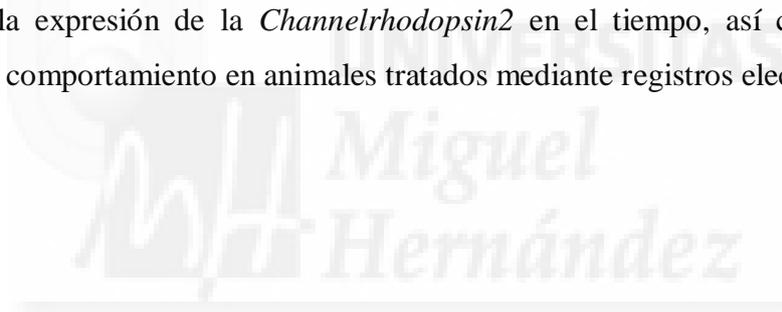
1. Las nanopartículas magnéticas FluoMag-N son similares en tamaño y morfología a las NeuroMag, por lo que no afectan en modo alguno de manera diferente a los ensayos realizados con las mismas. Además, el fluoróforo que incorporan las nanopartículas magnéticas FluoMag-N hace posible su seguimiento y localización *in vivo*.
2. En cultivos primarios de corteza y retina existe transfección de los magnetoplexos en diversos tipos celulares, entre ellos neuronas.
3. La transfección con las nanopartículas magnéticas es mayor a concentración 1:2 (plásmido frente a partículas magnéticas, respectivamente) que en otros ratios utilizados previamente y en este estudio.
4. Las nanopartículas magnéticas NeuroMag y FluoMag-N presentan niveles de toxicidad muy bajos a las concentraciones utilizadas durante el estudio.
5. Los magnetoplexos tanto con las nanopartículas magnéticas NeuroMag como con las FluoMag-N presentan niveles de fluorescencia directa altos, claramente diferenciables de los controles, corroborados mediante técnicas inmunohistoquímicas.
6. Existe transfección de los magnetoplexos en la capa de células ganglionares así como en otras capas de la retina de ratones en las transfecciones *in vivo* llevadas a cabo mediante los dos tipos de magnetopartículas, NeuroMag y FluoMag-N.

## PROYECCIÓN FUTURA

A partir de los resultados obtenidos, el estudio proporciona evidencias sobre la transfección de los magnetoplexos utilizados en neuronas tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, es necesario aumentar la cantidad de valores de las distintas técnicas llevadas a cabo en este estudio.

Como continuación a los estudios *in vitro*, sería interesante realizar estudios sobre la viabilidad de las células neuronales transfectadas y su funcionalidad mediante registros electrofisiológicos. También sería de interés el estudio sobre el ratio de concentraciones óptimas de magnetoplexos para tipos celulares neuronales específicos, como por ejemplo en células ganglionares. Además el estudio podría ser realizado con diferente material genético con el fin de expresar otras opsinas diferentes.

En estudios *in vivo*, sería de gran interés llevar a cabo estudios moleculares sobre la estabilidad de la expresión de la *Channelrhodopsin2* en el tiempo, así como estudios de funcionalidad y comportamiento en animales tratados mediante registros electrofisiológicos.



## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer a mis padres el haber llegado hasta aquí, por ser mi inspiración y mi guía y porque sin su apoyo incondicional nunca habría llegado hasta aquí. A mis tutores Eduardo y Gema, por convertirse en mi ejemplo a seguir, por su paciencia, apoyo y humildad, por enseñarme y darme la oportunidad de poder participar en un proyecto tan apasionante y hacerme recordar cuánto amo las neurociencias. A mi hermano, porque la distancia no es barrera y siempre puedo contar con él por muchos kilómetros que nos separen. A Imanol, por seguir caminando a mi lado en los peores días y ser mi apoyo incondicional cada segundo. A Josemi, Tamara y especialmente a Luz, por haber podido abrir una etapa de mi vida junto a ellos, por haber compartido todas esas horas de estudio y trabajos y por haberse hecho un hueco en mi corazón. A Luz (de nuevo) y a Melania, por su ayuda e interés por el proyecto y por compartir sus conocimientos continuamente. A Pilar, Fer y Jorge, por aguantarme cuando les hablo durante horas sobre lo apasionantes que me parecen temas que a ellos no les interesan. A Lawrence, Desireé y Sonia, por tener la paciencia para enseñarme y por haber aportado su granito de arena al proyecto. Y finalmente, a todas las personas que han participado en el proyecto y han hecho posible llevarlo a cabo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Soto-Sánchez, C., Martínez-Navarrete, G., Humphreys, L., Puras, G., Zárate, J., Pedraz, J.L., Fernández, E. (2015) “Enduring high-efficiency *in vivo* transfection of neurons with non-viral magnetoparticles in the rat visual cortex for optogenetic applications”. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 11(4): 835-843. doi: 10.1016/j.nano.2015.01.012.
2. Puras, G., Mashal, M., Zárate, J., Agirre, M., Ojeda, E., Grijalvo, S., Eritja, R., Díaz-Tahoces, A., Martínez-Navarrete, G., Avilés-Trigueros, M., Fernández, E., Pedraz, J.L. (2013) “A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina”. *Journal of Controlled Release*. 174:27-36. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.11.004.
3. Jafari, M., Soltani, M., Naahidi, S., Karunaratne, D.N., Chen, P. (2012) “Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery”. *Current Medicinal Chemistry*. 19(2):197-208.
4. Esteve-Rudd, J., Cuenca, N. (2012) “La optogenética: una nueva aproximación terapéutica para enfermedades de la retina” *Visión*. 41: 12-16.
5. Delgado, D., del Pozo-Rodríguez, A., Solinís, M.Á., Avilés-Triqueros, M., Weber, B.H., Fernández, E., Gascón, A.R. (2012) “Dextran and protamine-based solid lipid nanoparticles as potential vectors for the treatment of X-linked juvenile retinoschisis”. *Human Gene Therapy*. 23(4):345-355. doi:10.1089/hum.2011.115.
6. Ullmann, J.F., Moore, B.A., Temple, S.E., Fernández-Juricic, E., Collin, S.P. (2012). “The retinal wholemount technique: a window to understanding the brain and behavior”. *Brain, Behavior and Evolution*. 79(1): 26-44. doi:10.1159/000332802.
7. Charbel Issa, P., MacLaren, R.E. (2012) “Non-viral retinal gene therapy: a review”. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 40(1):39-47. doi:10.1111/j.1442-9071.2011.02649.x.
8. Deisseroth, K. (2011) “Optogenetics” *Nature Methods*. 8: 26-29. doi:10.1038/nmeth.f.324
9. Liu, M., Tuo, J., Chan, C.C. (2011) “Republished review: Gene therapy for ocular diseases”. *Postgraduate Medicine*. 87(1029): 487-495. doi: 10.1136/pgmj.2009.174912rep
10. Ramos, M., Castillo, C.G. (2011) “Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas” *Ide@s CONCYTEG*. 6(72): 629-646.
11. Doroudchi, M.M., Greenberg, K.P., Liu, J., Silka, K.A., Boyden, E.S., Lockridge, J.A., Arman, A.C., Janani, R., Boye, S.L., Gordon, G.M., Matteo, B.C., Sampath, A.P., Hauswirth, W.W., Horsager, A. (2011) “Virally delivered channelrhodopsin-2 safely and effectively restores visual function in multiple mouse models of blindness”. *Molecular Therapy*. 19(7):1220-1229. doi:10.1038/mt.2011.69.

12. Kolb, H. (2008) "How the Retina Works". *American Scientist*. 91(1): 28  
doi: 10.1511/2003.1.28.
13. Fernández, E. (2007) "Retinosis Pigmentaria. Preguntas y respuestas" (Primera Edición). *Cátedra de Investigación. Retinosis pigmentaria. Bidons Egara*.
14. Remington, L.A., (2005) "Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System" (Third Edition). *Elsevier Butterworth Heinemann*.
15. Rolland, A. (2005) "Gene medicines: The end of the beginning?" *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57(5):669-673.
16. Kolb H., Fernandez E., Nelson R. (2005) "Webvision: The Organization of the Retina and Visual System". *Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995*.
17. Bejjani, R., Behar-Cohen, F., Benezra, D., Gurny, R., Delie, F. "Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye". *CHIMIA: International Journal for Chemistry*. 59(6): 344-347.  
doi:10.2533/000942905777676281
18. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berhold, P., Ollig, D., Hagemann, P., Bamberg, E. (2003) "Channelrhodopsin-2. A directly light-gated cation-selective membrane channel". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(24): 13940-13945.
19. Zhang, Y., Calon, F., Zhu, C., Boado, R.J., Pardridge, W.M. (2003) "Intravenous nonviral gene therapy causes normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism". *Human Gene Therapy*. 14(1): 1-12.
20. Forrester J.V., Dick A.D., McMenemy P.G., Lee W.R. (2002) "The Eye: Basic Sciences in Practice". *W.B. Saunders, London*.
21. Hille, B. (2001) "Ion Channels of Excitable Membranes" (Third Edition). *Sinauer Associates Inc*.
22. [www.who.int](http://www.who.int)
23. [www.ozbiosciences.com](http://www.ozbiosciences.com)