



Universidad de Valladolid



ESTUDIO *IN VITRO* DE LA FUNCIONALIDAD DE FORMULACIONES LIPOSOMALES DE ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA PARA LA TERAPIA TÓPICA OCULAR

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Realizado por:

Laura Soriano Romaní

Tutora:

Dra. Yolanda Diebold Luque

Valladolid, junio 2012

Agradecimientos

- Al Grupo de Superficie Ocular del IOBA, especialmente a la tutora de este trabajo, la Dra. Diebold, y a los miembros más cercanos de mi grupo, Antonio López, Isabel Arranz y Laura García; por todo.
- Al grupo del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid. En especial a las Dras. Rocío Herrero, Irene Molina y Marta Vicario, por su efectividad en los envíos con las formulaciones en estudio y su implicación en el trabajo.

Financiación

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la siguiente financiación:

1. Programa de Becas de Iniciación a la Investigación del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Biomateriales, Bioingeniería y Nanomedicina (CIBER-BBN).
2. Proyecto “Combinación de hidrogeles biomiméticos y nanopartículas como plataformas terapéuticas avanzadas para enfermedades oculares”. Ministerio de Ciencia e Innovación, CICYT MAT-2010-20452-C03-01. Investigador responsable: Dra. Yolanda Diebold Luque. Duración: desde 01/01/2011 hasta 31/12/2013.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. La superficie ocular y la inflamación.....	13
1.2. Tratamientos antiinflamatorios para la superficie ocular	14
1.3. Vías de administración ocular de fármacos: la vía tópica	16
1.4. Sistemas de liberación controlada de fármacos para la administración tópica en oftalmología.....	18
1.4.1. Los liposomas	19
2. JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO	23
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS	31
4.1. Reactivos y equipos	33
4.1.1. Reactivos	33
4.1.2. Equipos.....	34
4.2. Línea celular de epitelio corneal humano (HCE).....	35
4.3. Formulaciones liposomales	35
4.4. Estudio de la viabilidad celular	39
4.5. Estudio de la proliferación celular	40
4.5.1. Medida de la proliferación tras tratar las células HCE con las formulaciones A, B y C.....	41

4.5.2. Medida de la proliferación de las células HCE durante el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación y posterior mantenimiento	41
4.6. Inmunodetección por fluorescencia de receptores para el acMDX.....	43
4.7. Extracción y determinación de proteínas	44
4.8. Identificación de proteínas mediante electroforesis y Western blotting	45
4.9. Microscopía de contraste de fases	47
4.10. Protocolo de simulación de las condiciones de inflamación o modelo de inflamación	48
4.11. Tratamientos antiinflamatorios control	48
4.12. Evaluación del efecto antiinflamatorio: medida de la IL-6 mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	49
4.13. Estudio estadístico	50
5. RESULTADOS	51
FASE I: Puesta a punto de los métodos a emplear para evaluar el efecto antiinflamatorio de las formulaciones liposomales	53
5.1. Detección de receptores para el acetato de medroxiprogesterona	53
5.1.1. Electroforesis y Western blotting	53
5.1.2. Inmunodetección por fluorescencia	53
5.2. Estudio de viabilidad de las células al ser tratadas con las formulaciones de estudio	55
5.3. Ensayo de proliferación: selección de la concentración de acetato de medroxiprogesterona candidata para los estudios <i>in vitro</i>	57
5.4. Adaptación del protocolo de inflamación <i>in vitro</i> para la línea celular HCE	59

5.4.1. Seguimiento mediante microscopía óptica y ensayo de proliferación.....	59
5.4.2. Medida de los niveles de IL-6 tras aplicar el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación o modelo de inflamación	62
5.5. Selección de los antiinflamatorios control: estudio de la viabilidad de las células al ser tratadas con DEX y Medrivás®	63
FASE II: Evaluación del efecto antiinflamatorio <i>in vitro</i> de un corticoide control...	64
5.6. Detección de la IL-6 tras exponer a las células a DEX.....	64
5.6.1. ELISA	64
5.6.2. Electroforesis y Western blotting	66
FASE III: Evaluación del efecto antiinflamatorio <i>in vitro</i> de las formulaciones liposomales en estudio	68
5.7. Estudio de viabilidad de las células HCE al ser tratadas con las formulaciones liposomales en estudio	68
5.8. Evaluación de cambios en los receptores para el acMDX tras el tratamiento con las formulaciones en estudio	69
5.9. Detección de la IL-6 tras exponer a las células a tratamientos con las formulaciones liposomales	72
5.9.1. ELISA	72
6. DISCUSIÓN.....	75
7. CONCLUSIONES PRELIMINARES Y TRABAJO FUTURO	83
8. BIBLIOGRAFÍA	87
9. ANEXOS	97
Índice de figuras.....	99

Índice de tablas	104
Abreviaturas.....	105

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La superficie ocular y la inflamación

La superficie ocular (SO) está formada por la película lagrimal, la córnea, el limbo y la conjuntiva, integrándose en una unidad funcional, llamada unidad funcional lagrimal (UFL) (Stern ME *et al.*, 1998). Además de estos componentes, la UFL también cuenta con la participación de las glándulas lagrimales, así como de mecanismos de comunicación y regulación en los que participan no sólo el sistema nervioso, sino también, el hormonal y el inmune (figura 1). Estos sistemas aportan hormonas, elementos celulares y humorales, como las citoquinas, de vital importancia en diversos procesos. Todos ellos serán los encargados, mediante un funcionamiento correcto e integrado, de mantener la homeostasis de la superficie ocular asegurando, entre otras cosas, la conservación del epitelio corneal íntegro, necesario para la visión.

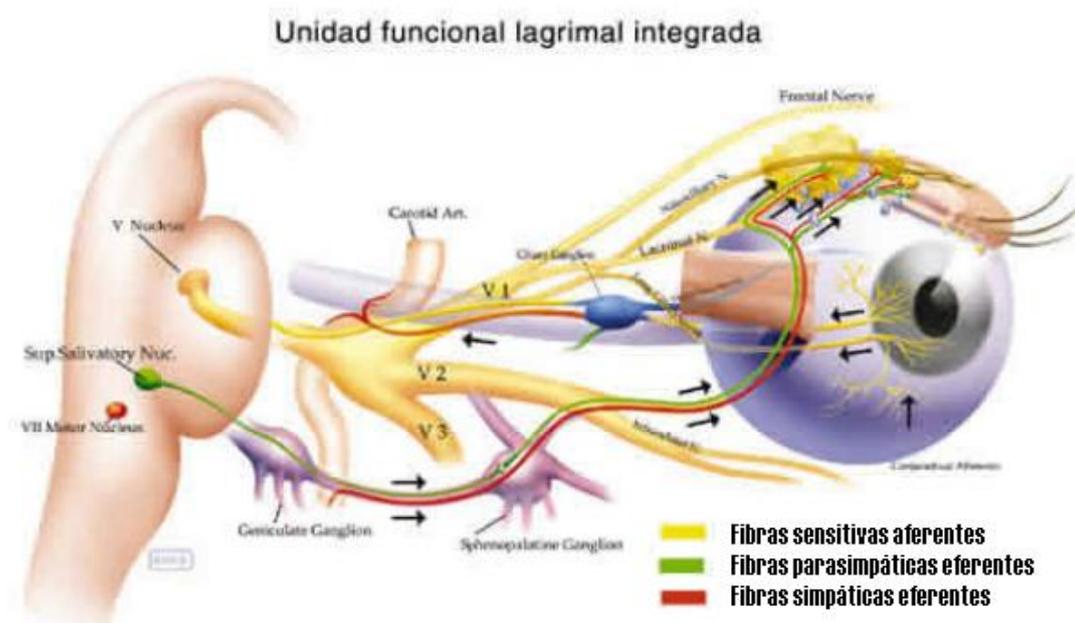


Figura 1: Representación de la unidad funcional lagrimal. Adaptación de Stern ME *et al.*, 1998.

Se ha demostrado que la base de importantes enfermedades de la SO es un proceso inflamatorio que afecta a todas sus estructuras. Este proceso altera la barrera corneal estructural y funcionalmente (Contreras-Ruiz L *et al.*, 2012) aumentando el riesgo de

sufrir una infección bacteriana concomitante o provocando un estado de inflamación crónico que puede llegar a autoperpetuarse (Stern ME *et al.*, 2004). La etiología de una inflamación ocular puede ser una alergia, una infección, una lesión o una cirugía, entre otros. Un ejemplo de patología inflamatoria es el síndrome de ojo seco, el cual puede incluso provocar la pérdida de la visión en los casos más severos. Este ejemplo ilustra la gravedad de estas enfermedades dentro del campo de la oftalmología, que en ocasiones se ve incapaz de dar una solución eficaz a estos problemas, por otra parte, tan comunes entre la población. Se sabe que el síndrome de ojo seco afecta aproximadamente, al 5.7 % de las mujeres menores de 50 años, prevalencia que se ve aumentada con la edad (Schaumberg DA *et al.*, 2003). En nuestro entorno, llega a afectar a un 24 % de las personas mayores de 50 años (Fuentes-Páez G *et al.*, 2010).

Estos problemas inflamatorios se caracterizan por un desequilibrio entre mediadores pro- y anti-inflamatorios. Así, ciertas citoquinas se ven sobreexpresadas en diferentes patologías oculares inflamatorias, pudiendo servir como marcadores de inflamación (Solomon A *et al.*, 2001; Lam H *et al.*, 2009; Enríquez de Salamanca *et al.*, 2010). La interleuquina-6 (IL-6) es una de estas citoquinas, muy involucrada en los procesos inflamatorios en la fase aguda, junto con la IL-1 α , IL-1 β o el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) (McDermott AM *et al.*, 2005). En casos como los síndromes de ojo seco graves, de Sjögren o de Stevens-Johnson, así como en el penfigoide ocular cicatricial, todos ellos de naturaleza inflamatoria, se detectan niveles altos de IL-6 en la lágrima (Tishler M *et al.*, 1998; Yoon KC *et al.*, 2007; Lam H *et al.*, 2009; Stern ME *et al.*, 2010), evidenciando su participación en los procesos inflamatorios oculares.

1.2. Tratamientos antiinflamatorios para la superficie ocular

La terapia habitual frente a la inflamación ocular se basa en emplear sustancias capaces de modular los procesos inflamatorios (Jap A *et al.*, 2008). Convencionalmente, los fármacos más empleados se dividen en esteroideos y no esteroideos (Diebold Y *et al.*, 2011), siendo ambos tipos válidos frente a enfermedades inflamatorias, como el síndrome del ojo seco (Pflugfelder SC, 2004).

Aunque la administración de moléculas esteroideas o corticosteroides constituye la terapia de elección, se están estudiando otras alternativas (Araújo J *et al.*, 2009). Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos pueden ser de origen natural o químico, pero no son producidos por el cuerpo humano. Algunos son la indometacina, el diclofenaco o el ibuprofeno (Ahuja M *et al.*, 2008). Un ejemplo relevante en el campo de las ciencias de la visión es el péptido obtenido de un hongo, la ciclosporina A, que se ha empleado durante las últimas décadas vehiculizándose en micro o nanopartículas (Juberías JR *et al.*, 1998; Vallelado AI *et al.*, 2002) o liposomas (Mosallaei N *et al.*, 2012), entre otros. Otra alternativa novedosa frente a la inflamación ocular es el empleo de ácidos grasos esenciales incorporados en distintas formulaciones oftálmicas de aplicación tópica (Roncone M *et al.*, 2010). Se han obtenido resultados prometedores aplicando formulaciones que vehiculizan ácido α -linoleico en ratones a los que se les había inducido un ojo seco de forma experimental (Rashid S *et al.*, 2008).

De un modo general, los corticosteroides o corticoides se caracterizan por ser derivados del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano. Su principal función antiinflamatoria es debida a que provoca, actuando a nivel genético, una disminución directa de la liberación de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Barnes PJ, 2006). La hidrocortisona, la prednisona o la dexametasona son los antiinflamatorios de corta, media o larga duración, respectivamente, más demandados. Sin embargo, los corticosteroides pueden resultar complejos y polivalentes, ya que llevan a cabo otras funciones no descifradas por completo. En su aplicación tópica oftálmica pueden provocar efectos secundarios relevantes, como son la aparición de glaucoma, el desarrollo de cataratas, la mayor susceptibilidad a padecer queratitis infecciosa y la interferencia en la cicatrización corneal. Por ello hay una tendencia hacia el uso de corticosteroides denominados “suaves” (Bodor N y Buchwald P, 2005).

Un ejemplo de estos corticosteroides es el acetato de medroxiprogesterona (acMDX)(figura 2). Se trata de uno de los preferidos por los oftalmólogos para aplicaciones crónicas debido, precisamente, a su menor tasa de efectos secundarios. Además de su acción antiinflamatoria, también se ha descrito su acción androgénica (Ghatge RP *et al.*, 2005; Cops J *et al.*, 2008). Uno de los mecanismos de acción

descritos para el acMDX actuaría a nivel de las glándulas lagrimales favoreciendo tanto la secreción acuosa de la película lagrimal como la síntesis de la fracción lipídica de la misma. De este modo, se disminuiría la osmolaridad de la lágrima, uno de los signos relacionados con la inflamación ocular. Esta regulación de la función de las glándulas lagrimales, por parte de las ciertas hormonas sexuales, dio lugar al empleo de la terapia hormonal sustitutiva como tratamiento de patologías inflamatorias oculares. Sin embargo, la administración sistémica de estrógenos resulta controvertida (Schaumberg DA *et al.*, 2001; Lange C *et al.*, 2003), prefiriéndose la de hormonas de acción androgénica, como el acMDX, mediante aplicación tópica para evitar efectos sistémicos.

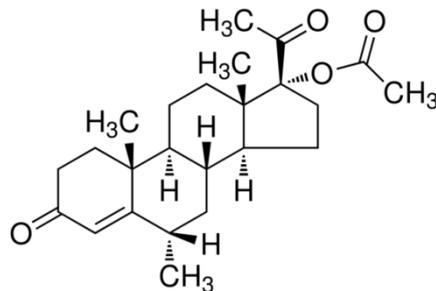


Figura 2: Estructura molecular del acetato de medroxiprogesterona, donde se observa el anillo de esterano como base de su estructura. Fórmula molecular $C_{24}H_{34}O_4$ y peso molecular 386.52 g/mol (M1629, Sigma-Aldrich).

1.3. Vías de administración ocular de fármacos: la vía tópica

Las principales vías de administración ocular son la periocular, la intraocular y la tópica. La vía periocular consiste en la inyección del fármaco en zonas adyacentes a la esclera; la vía intraocular, en el depósito directo del fármaco en el humor acuoso o en la cavidad vítrea, según sea intracameral o intravítrea, respectivamente; y la vía tópica, contacta con la superficie ocular de modo directo. La vía tópica es la preferida para la administración de fármacos no solo porque es un método no invasivo, sino que, además, tiene otras ventajas como el menor coste, la mayor seguridad y la mejor aceptación por parte de los pacientes debido a su fácil aplicación.

No obstante, la vía tópica tiene ciertas restricciones debidas a las propias barreras oculares de la SO, que necesita ser impermeable para mantener la transparencia en la córnea. Cuando el tratamiento tiene como diana las células epiteliales de la SO, la película lagrimal es la barrera más importante.

La película lagrimal, que antes se consideraba formada por 3 capas diferenciadas, ahora se concibe como un gel hidratado, compuesto por componentes acuoso-proteicos y mucinosos (Pflugfelder SC *et al.*, 2000). Sobre este “gel” se deposita una película de carácter lipídico, que impide la evaporación del resto de componentes, además de proporcionar una tensión superficial adecuada para mantener la integridad de la película lagrimal, entre otras funciones (Bron AJ *et al.*, 2004). Debajo de esta capa se encuentra el gel muco-acuoso, compuesto, fundamentalmente, por glucosa, electrolitos, proteínas, factores de crecimiento, vitaminas, citoquinas, inmunoglobulinas y hormonas (figura 3) (Gipson IK, 2004; Albertsmeyer AC *et al.*, 2010). Su continua renovación, de vital importancia para una buena visión, provocará indirectamente que los fármacos instilados en la SO sean drenados, junto con la lágrima, por el conducto nasolacrimal. El parpadeo, además, acelerará este proceso. También hay que considerar que cierta cantidad instilada es absorbida por la conjuntiva, pasando a la circulación sistémica, sin causar su efecto terapéutico en las células diana, pero pudiendo ocasionar algún efecto indirecto no deseado. La acción enzimática, tanto de la película lagrimal como de la córnea, también contribuirá a la reducción del porcentaje útil del fármaco. Por otra parte, el epitelio corneal presenta uniones de sellado, como las uniones estrechas o los desmosomas, que hacen que resulte impermeable para el paso de sustancias de más de 500 Da (Hämäläinen KM *et al.*, 1997).

En un estudio realizado en conejo en el que se buscaba determinar la cantidad de fármaco que realmente es efectivo empleando la vía tópica, se obtuvo que, tras la instilación de un volumen de 50 µL, hasta un 90 % de la dosis es eliminada en tan solo 2 minutos (Davies NM, 2000). En general, se acepta que solo el 1-5 % del fármaco instilado es capaz de atravesar las barreras corneales (Urtii A, 2006).

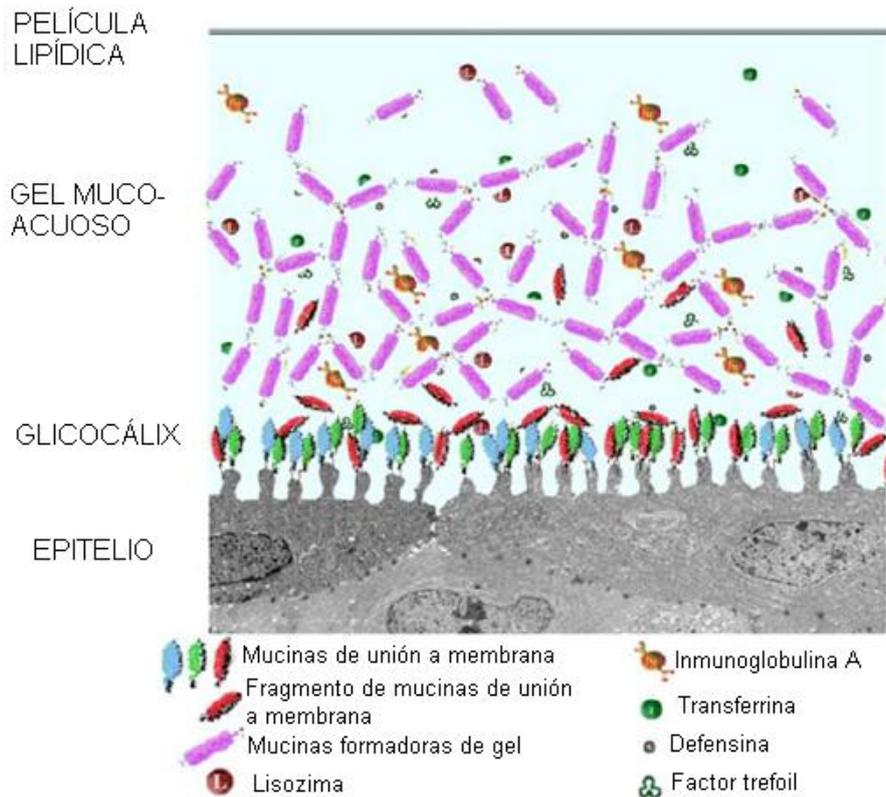


Figura 3: Representación de la estructura de la película lagrimal. Adaptación de Gipson IK et al., 2004.

En resumen, para mejorar la absorción de una sustancia activa aplicada de forma tópica, es necesario aumentar el tiempo de permanencia de la formulación que la vehiculiza en la SO, sin olvidar que, además, ha de ser bien tolerada por los pacientes.

1.4. Sistemas de liberación controlada de fármacos para la administración tópica en oftalmología

La mayoría de las formulaciones tópicas oculares se administran en forma de soluciones acuosas. Sin embargo, se caracterizan por tener baja eficacia ya que, aún con frecuentes aplicaciones, resulta difícil conseguir niveles terapéuticos. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad de las moléculas activas que se usan en los tratamientos y de aumentar su tiempo de contacto con las estructuras de la SO, se han desarrollado

diferentes estrategias destinadas a la vía tópica ocular. Entre estas estrategias cabe destacar el empleo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

Algunos de los sistemas de liberación controlada de fármacos son las micropartículas o los sistemas coloidales y vesiculares. Entre las micropartículas se encuentran las microcápsulas, de tipo reservorio, o las microesferas, de tipo matricial. Pero estos sistemas se emplean mayoritariamente para la vía intraocular, debido a su mayor tamaño.

Los sistemas coloidales se estudian frecuentemente en el campo de los nuevos desarrollos para el tratamiento oftalmológico tópico debido, especialmente, a que se encuentran dentro de la escala nanométrica. Además, presentan la ventaja de poder aplicarse como colirios, aumentando la permanencia del preparado en la región precorneal y la biodisponibilidad de la sustancia activa. Entre ellos se encuentran los liposomas, elaborados por primera vez en la década de los 60 (Bangham AD *et al.*, 1965), o las nanopartículas y microemulsiones, de aplicación más novedosa (Sahoo SK *et al.*, 2008; Gaudana R *et al.*, 2009; Diebold Y y Calonge M, 2010). En trabajos recientes, hay cierta tendencia a combinar los vehículos mencionados, con moléculas consideradas mucoadhesivas, como el quitosano o el ácido hialurónico (Sandri G *et al.*, 2006; Diebold Y *et al.*, 2007). Estos polímeros son capaces de captar el agua de la película lagrimal y establecer uniones no covalentes con sus mucinas, formando un entramado que controla la difusión de la sustancia activa (Ionov R *et al.*, 2004). Esta capacidad supondría una ventaja porque ayudaría a mejorar el tiempo de retención en la SO.

1.4.1. Los liposomas

Los liposomas son vesículas de naturaleza fosfolipídica, compuestas por una o más esferas concéntricas constituidas por bicapas lipídicas o lamelas, y cuyo diámetro puede oscilar desde 80 nm hasta 1 μm (figura 4). Se pueden clasificar según su tamaño y número de lamelas, pudiendo ser multilamelares grandes o unilamelares grandes o pequeños. Las lamelas se distribuyen separadas entre sí mediante compartimentos

acuosos. Debido a esta estructura anfifílica son capaces de encapsular sustancias activas hidrófilas, al distribuirse en los compartimentos acuosos, o sustancias hidrofóbicas, incluidas en las bicapas lipídicas. Por tanto, estos sistemas permitirán la aplicación de fármacos insolubles en medios acuosos (Mishra GP *et al.*, 2010).

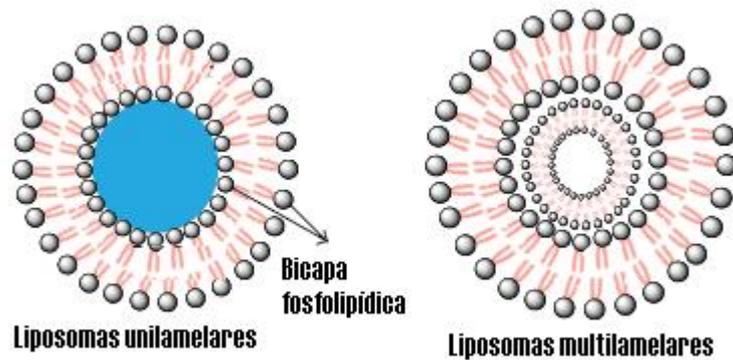


Figura 4: Representación de las posibles estructuras de los liposomas. Adaptación de Mishra GP *et al.*, 2010.

Por lo que respecta a la vía tópica ocular, los liposomas pueden mejorar la penetración de fármacos ya que establecen un contacto íntimo con la superficie córneoconjuntival, siendo los de carga positiva más adecuados, en comparación con los neutros o negativos, dada la interacción electrostática entre las cargas positivas de los liposomas y las negativas de los epitelios corneal y conjuntival (Rabinovich-Guilatt L *et al.*, 2004).

La principal desventaja de estos vehículos radica en su inestabilidad, que se intenta solventar mediante la adición de colesterol. Esta molécula orienta el grupo hidroxilo y la cadena alifática, presentes en la estructura de un fosfolípido, hacia la parte acuosa o el centro de la bicapa lipídica, respectivamente (Kaur IP *et al.*, 2004). La simplicidad del método de preparación, a pesar de estos problemas de inestabilidad y de su dificultad para ser esterilizados, confiere características únicas a estas vesículas para poder ser empleados en el ámbito de la oftalmología. La tabla 1 muestra algunos de los trabajos realizados con liposomas en el campo de las ciencias de la visión.

Tabla 1: Algunos de los avances obtenidos mediante la investigación sobre liposomas como vehículos de fármacos en el campo de la oftalmología. Adaptación de Kaur IP *et al.*, 2004.

Fármaco	Resultado	Referencia
Idoxuridina	Mejora la eficacia en el tratamiento de la queratitis por Herpes simplex	Smolin G <i>et al.</i> , 1981
Inulina	Aumento de la concentración intraocular del fármaco	Ahmed I <i>et al.</i> , 1987
Pilocarpina HCl	Aumento en la respuesta miótica y en la biodisponibilidad del fármaco	Khalil RM <i>et al.</i> , 1992
Cloranfenicol	Mayor concentración del fármaco en la formulación	De Laval W <i>et al.</i> , 1992
Acetazolamida	Marcada reducción de la presión intraocular	El-Gazayerty ON y Hikal AH, 1997
Oligonucleótidos	Mejora el control de la liberación del fármaco	Bochot A <i>et al.</i> , 1998

En cuanto al empleo de liposomas como vehículos para terapias antiinflamatorias, hay varios ejemplos publicados. Un trabajo interesante fue el de Yanagawa y su equipo (Yanagawa A *et al.*, 1987), que usó microesferas lipídicas cargadas con hidrocortisona marcada con el isótopo ^3H . Consiguió detectar las microesferas en los tejidos oculares de ratones, obteniendo además mejores resultados que con una suspensión de hidrocortisona. Posteriormente, se estudiaron los perfiles de liberación controlada *in vitro* de liposomas que contenían dexametasona (al-Muhammad J *et al.*, 1996). Un trabajo más reciente combinaba vesículas lipídicas con un polímero mucoadhesivo, el quitosano, para encapsular diclofenaco sódico. Las pruebas realizadas *in vivo* mostraron un aumento del tiempo de retención corneal, así como una mejora en la penetración transcorneal, comparada con las mismas dispersiones liposomales sin adicionar el polímero (Li N *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO

Se ha demostrado que la base de importantes enfermedades de la SO es un proceso inflamatorio que afecta a todas las estructuras de la misma. Un ejemplo de ello es el síndrome de ojo seco, el cual puede incluso provocar la pérdida completa de la visión (Stern ME *et al.*, 2004). Los esfuerzos para recuperar funcionalmente los tejidos dañados e inflamados en esas situaciones, no han dado aún los buenos resultados que serían de esperar, provocando la consiguiente pérdida de recursos y frustración para el paciente. Hay que considerar que las circunstancias impuestas por la anatomía y la fisiología del ojo dificultan la entrada de agentes antiinflamatorios e, incluso, estos agentes por lo general son poco solubles en disoluciones acuosas, lo que impide todavía más una aplicación tópica ocular efectiva. Todo ello hace necesario dirigir la investigación hacia el desarrollo de nuevas formulaciones que permitan aumentar la biodisponibilidad de las sustancias activas, lo que provocaría una disminución de la dosis y la frecuencia de administración, con el fin de dar una solución mejor a pacientes con esta clase de dolencias.

Nuestro grupo de investigación (Grupo de Superficie Ocular, -GSO- del IOBA) tiene experiencia concreta en ese ámbito y ha publicado diversos trabajos sobre sistemas nanotecnológicos para el tratamiento tópico de la inflamación ocular mediante la liberación controlada de fármacos (Enríquez de Salamanca A *et al.*, 2006; Diebold Y *et al.*, 2007; Contreras-Ruiz L *et al.*, 2010). Concretamente, el equipo de la Dra. Yolanda Diebold, tutora de este trabajo, lleva más de 10 años dirigiendo una línea de investigación centrada en estos nuevos sistemas (Diebold Y y Calonge M, 2010; Diebold Y *et al.*, 2011). Además, se cuenta con un modelo *in vitro* de inflamación, que está siendo muy útil para estudiar el papel de diversas moléculas en la inflamación ocular (Enríquez-de-Salamanca A *et al.*, 2008).

Por otro lado, el GSO lleva años colaborando con el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), especialistas en el diseño de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos de aplicación ocular (Barcia E *et al.*, 2009; Herrero-Vanrell R y Molina-Martínez I, 2005; Herrero Vanrell R *et al.*, 2005).

En este contexto, se pretende testar nuevas formulaciones antiinflamatorias en una línea celular derivada del epitelio corneal humano (células HCE). Estas formulaciones se han preparado usando como vehículo los componentes de unas lágrimas artificiales, recientemente patentadas por nuestros colaboradores del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la UCM (patente ES 2 284 398). Se espera que los liposomas empleados favorezcan la incorporación del acetato de medroxiprogesterona (acMDX) a las células del epitelio corneal *in vitro*. Además, la procedencia biológica de los materiales empleados y su carácter biodegradable, favorecerá su eliminación del organismo sin alterar otras estructuras.

De este modo se busca la posibilidad de mejorar el colirio de medroxiprogesterona comercializado actualmente (Medrivás[®], Alcon Cusí, S.A.) que se encuentra formulado con un vasoconstrictor e incluye un conservante, ninguno de los cuales son aconsejables en una SO dañada.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Es posible obtener un efecto antiinflamatorio *in vitro* en células del epitelio de la córnea, “inflamadas” previamente, empleando formulaciones liposomales que vehiculicen acMDX como una molécula terapéutica antiinflamatoria.

Objetivo general

Determinar si hay una respuesta antiinflamatoria *in vitro* en una línea celular derivada del epitelio corneal humano (HCE) tras ser tratada con formulaciones liposomales cargadas con acMDX, demostrando así la funcionalidad de los mismos.

Objetivos específicos

1. Detectar en la línea celular HCE posibles receptores para el acMDX, como el receptor de glucocorticoides o el de progesterona, y comprobar si estos receptores se activan tras el contacto de 1 hora con las formulaciones liposomales que incorporan el acMDX.
2. Determinar si las formulaciones liposomales diseñadas alteran la viabilidad de las células HCE o su tasa de proliferación.
3. Poner a punto un modelo *in vitro* de inflamación del epitelio corneal, medido como incremento en la producción de IL-6, que permita evaluar el efecto de moléculas antiinflamatorias.
4. Determinar si sucede una respuesta celular antiinflamatoria *in vitro* en las células HCE, medida como una disminución en los niveles de producción de IL-6, empleando una formulación liposomal cargada con acMDX.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y equipos

4.1.1. Reactivos

El medio de cultivo DMEM/F-12 + GlutaMAX_{TM}-I, el medio sin rojo fenol RPMI 1640, el suero fetal bovino (FBS), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la insulina, una mezcla de penicilina (100U/mL)-estreptomicina (0.1mg/mL), la tripsina al 0.25 % y el tampón fosfato salino (PBS) 1x fueron de Invitrogen-Gibco, Inchinnan, Reino Unido.

Las placas de cultivo de células fueron de Corning-Costar, NY, EE.UU. El reactivo alamarBlue[®] empleado para el ensayo de proliferación, y el antimicoplasma adicionado al medio de cultivo fueron de AbD Serotec, Oxford, Reino Unido.

El azul Tripán 0.4 %, el cloruro de benzalconio (BAC), la dexametasona (DEX), el buffer Laemmli (Simple Buffer S3401), el suero de burro y el reactivo XTT[®] fueron de Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, EE.UU. También lo fueron los reactivos empleados en la preparación del tampón RIPA: Tris HCl, cloruro sódico (NaCl), ácido desoxicólico, Tritón[®] X-100, dodecilsulfatosódico (SDS), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y los adicionados fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) y aprotinina.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) fue de PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EE.UU., y el Medrivás[®] fue de Alcon Cusí, S.A., Barcelona, España.

El kit empleado para la cuantificación de proteínas (Pierce[®] BCA Protein Assay Kit) fue de Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU., mientras que el kit para detectar la IL-6 humana (Human IL-6 ELISA kit: Cat.Nº. 950.030.096/192), fue de Gen-Probe Diaclone, Besançon Cedex, Francia.

Para la electroforesis y el Western blotting se empleó el marcador de peso molecular Precision Dual Color, la membrana de nitrocelulosa, el Buffer TBS (suplementado con 0.05 % de Tween20 de Sigma Aldrich), el Buffer Immun-StarTM HRP Peroxide Buffer y el Revelador Immun-StarTM HRP Luminol/Enhancer, todos ellos de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU. El extracto proteico de la línea celular HeLa fue de ProSci Inc., Poway, CA, EE.UU.

Los anticuerpos (Ac) primarios empleados, el anti-receptor de glucocorticoides (ab9568), el anti-receptor de progesterona (ab90577) y el anti-IL-6 (ab66231), todos ellos monoclonales y de ratón, fueron de Abcam, Cambridge, Reino Unido. El anti-GAPDH monoclonal de ratón (sc-51905), fue de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE.UU.

El Ac secundario de burro anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (715-035-150) fue de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EE.UU. El empleado en inmunofluorescencia fue burro anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor®488 (A21202) de Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU.

El yoduro de propidio fue de Molecular Probes®, Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU., y el medio de montaje de inmunofluorescencia, Vectashield®, de Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE.UU.

4.1.2. Equipos

Para el cultivo de las células se empleó el incubador de dióxido de carbono (CO₂) Touch 190S de LEEC, Nottingham, Reino Unido, y la cabina de flujo laminar de seguridad tipo II, fue la Gelaire BSB 4A de ICN biomedicals, Flow Laboratories, Sydney, Australia.

El microscopio empleado para obtener imágenes de fluorescencia fue el microscopio pseudo-confocal Leica CTR6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), que usa el *software* LAS AF Lite para analizar las imágenes. El microscopio óptico de contraste de fases fue un Nikon Eclipse TS 100 (Tokio, Japón). El multilector de placas empleado fue el SpectraMax® M5 (Molecular Devices Corporation, CA, EE.UU.), que usa el *software* SoftMaxPro.

Para llevar a cabo la electroforesis y el Western blotting, la fuente de electroforesis (Power Pac 200), así como el aparato para la lectura, el sistema de documentación de geles Chemi-Doc®, con el *software* Quantity One, fueron de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.

4.2. Línea celular de epitelio corneal humano (HCE)

Se empleó la línea celular de epitelio de córnea humano HCE (*Human Corneal Epithelium*) (Araki-Sasaki *et al.*, 1995) entre los pases 45 y 55.

Se cultivaron las células en lo que denominaremos “Medio Completo”: medio de cultivo DMEM/F-12 + GlutaMAX_{TM}-I, suplementado con 15 % de FBS, 10 ng/mL de EGF, 4 mg/mL de insulina, una mezcla de penicilina (100 U/mL)-estreptomicina (0.1 mg/mL) y 0.5 µg/mL de antimicoplasma. Las células se incubaron a 37 °C bajo condiciones de 5 % CO₂ y 95 % de humedad.

Las células se subcultivaron mediante la incubación con una solución de tripsina al 0.25 % tras un lavado con PBS. Se contaron y se evaluó su viabilidad en una cámara de Neubauer, empleando el reactivo azul Tripán 0.4 % para sembrarlas en la concentración adecuada en placas de poliestireno de 96 ó 24 pocillos. Se adecuó el número de células y la cantidad de medio de cultivo por pocillo, dependiendo del ensayo a realizar y la placa empleada.

4.3. Formulaciones liposomales

Las formulaciones de este estudio se prepararon en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, bajo la supervisión de las Dras. Rocío Herrero Vanrell e Irene Molina Martínez, y se enviaron en dos envíos independientes para su estudio en Valladolid.

De modo general, la dispersión de liposomas está formada por fosfatidilcolina (FC)(denominación comercial: Phospholipon 90G[®]), junto con colesterol y vitamina E, en una proporción 8:1:0.08, respectivamente. Para su elaboración se empleó la técnica de hidratación de la película lipídica de fosfolípidos, también conocida como método de Brangham (Bangham AD *et al.*, 1965). Los componentes se solubilizaron en triclorometano (CH₃CL₃), añadiendo en esta fase el cuarto componente en las formulaciones que contienen el agente activo liposoluble, el acMDX. Tras ello, se evaporaron en un rotavapor a 33 °C y presión reducida (200 ma). Así se consigue una

fina película lipídica que formará los liposomas al rehidratarse con una solución acuosa hipotónica de boratos y trehalosa. Los liposomas obtenidos en este punto son grandes y están formados por varias bicapas lipídicas (multilamelares). Por este motivo, una vez se hubo redispersado la película lipídica con la solución acuosa, los liposomas se sonicaron en un baño de ultrasonidos y a continuación, se filtraron o extrusaron por membranas de policarbonato de 0.22 μm (10 ciclos) utilizando el equipo Extruder® a sobrepresión con nitrógeno gas. El objetivo de la sonicación fue romper las vesículas lipídicas y transformar los liposomas grandes en unos más pequeños y, a la vez, disminuir el número de bicapas lipídicas de los liposomas. La extrusión tuvo la misma finalidad porque, además, facilita la obtención de liposomas con tamaños homogéneos y próximos a 200 nm.

Se usaron dos controles negativos, la solución de dispersión de los liposomas, formada por ácido bórico, borato sódico y trehalosa (**formulación A** o tampón hipotónico) y la dispersión de liposomas blancos, sin principio activo (**formulación B** o vehículo blanco). Por otro lado, se usó una dispersión de liposomas cargados con acMDX (**formulación C** o formulación activa). En la tabla 2 se indica la composición de cada formulación, inicialmente.

Tabla 2: Composición de las formulaciones en estudio facilitadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la UCM.

Formulaciones	Tipo	Composición
A	Tampón hipotónico	Ácido bórico (8.38 %), borato sódico (0.755 %) y trehalosa (16 %)
B	Vehículo blanco	Ácido bórico (8.38 %), borato sódico (0.755 %) y trehalosa (16 %) FC : colesterol : vitamina E (8 : 1 : 0.08)
C	Formulación activa: liposomas cargados con acMDX	Ácido bórico (8.38 %), borato sódico (0.755 %) y trehalosa (16 %) FC : colesterol : vitamina E (8 : 1 : 0.08) 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acMDX

Las variables de estudio fueron el tiempo de contacto de las formulaciones con los cultivos celulares, así como la concentración del fármaco (acMDX) y del vehículo (FC). Se fijó el tiempo de contacto a 1 hora.

Para los procedimientos de la primera fase del trabajo (ensayo de viabilidad celular y proliferación) se modificó la variable de concentración de acMDX, diluyendo las formulaciones A, B y C en medio sin suplementos, hasta obtener las condiciones representadas en la tabla 3.

Tabla 3: Condiciones empleadas en los ensayos de viabilidad celular (condiciones 2, 5 y 6) y proliferación (todas las condiciones). Formulaciones A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) y C (formulación activa) facilitadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la UCM.

Condiciones		Tampón hipotónico	FC (mg/mL)	acMDX (µg/mL)
1	A	✓	✗	✗
	B	✓	0.022	✗
	C	✓	0.022	0,1
2	A	✓	✗	✗
	B	✓	0.11	✗
	C	✓	0.11	0,5
3	A	✓	✗	✗
	B	✓	0.22	✗
	C	✓	0.22	1
4	A	✓	✗	✗
	B	✓	0.44	✗
	C	✓	0.44	2
5	A	✓	✗	✗
	B	✓	1.11	✗
	C	✓	1.11	5
6	A	✓	✗	✗
	B	✓	2.22	✗
	C	✓	2.22	10

Para el ensayo de la viabilidad celular, se aplicaron las condiciones 2, 5 y 6, y para el ensayo de proliferación, todas las condiciones de la tabla 3 (condiciones de la 1 a la 6).

Para la determinación de los niveles de producción de IL-6 tras simular condiciones de inflamación en las células HCE, se seleccionó la concentración de 5 µg/mL de acMDX y se modificó la variable de concentración de FC, haciendo diluciones 1:1 con el medio sin suplementos y las formulaciones A, B y C, hasta obtener las condiciones que se muestran en la tabla 4. También se determinó la viabilidad celular tras exponer a las HCE a estas nuevas formulaciones.

En total, se hicieron experimentos para estudiar 9 condiciones experimentales diferentes.

Tabla 4: Condiciones empleadas en los ensayos para detectar el nivel de producción de IL-6 tras aplicar el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación en las HCE. Formulaciones A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) y C (formulación activa) facilitadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, de la UCM.

Condiciones		Tampón hipotónico	FC (mg/mL)	acMDX (µg/mL)
7	A	✓	✗	✗
	B	✓	10	✗
	C	✓	10	5
8	A	✓	✗	✗
	B	✓	5	✗
	C	✓	5	5
9	A	✓	✗	✗
	B	✓	2.5	✗
	C	✓	2.5	5

4.4. Estudio de la viabilidad celular

La viabilidad celular se midió en dos situaciones: a) inmediatamente después de 1 hora de contacto con los tratamientos y b) tras un periodo de 24 horas de recuperación celular durante el cual se mantuvieron las células en medio completo. El objetivo fue determinar si, en caso de una reducción de la viabilidad causada por los tratamientos, ésta se recuperaba o, por el contrario, se mantenía, lo cual significaría que las formulaciones dañaban las células de un modo permanente.

El test de viabilidad celular empleado se basa en la reducción de la sal de sodio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxianilida (XTT) por las deshidrogenasas mitocondriales, que formarán cristales de formazán, modificando el color inicial de la solución si las células son viables. Este hecho puede ser monitorizado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm, con una longitud de onda de referencia de 620 nm.

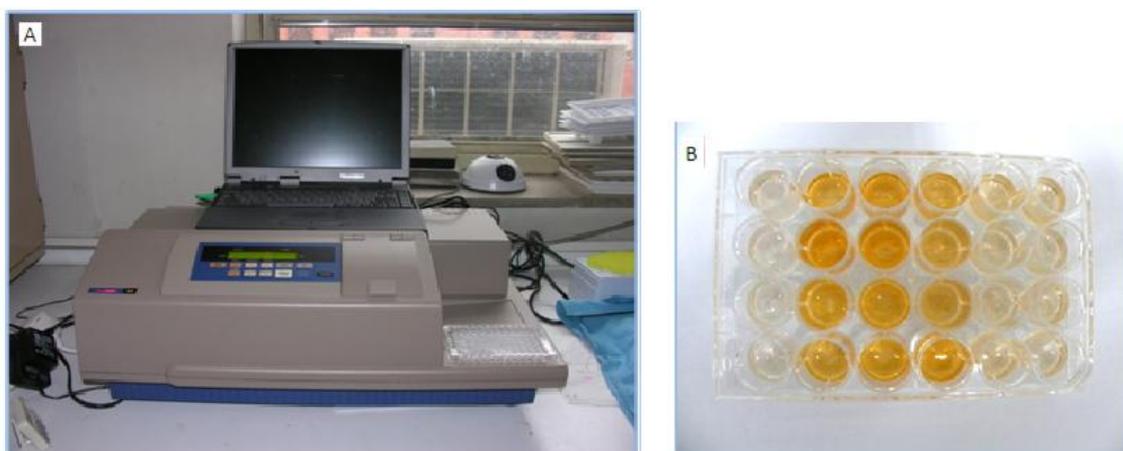


Figura 5: A) Multilector de placas empleado en modo absorbancia para la determinación de la viabilidad celular. B) Placa de 24 pocillos propia de un ensayo de viabilidad celular empleando el reactivo XTT[®]. Los tonos más intensos indican una mayor viabilidad celular.

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a razón de 10.000 células/pocillo. Tras 48 horas en medio completo, se sometieron a un periodo de lavado con medio sin suplementos previo al tratamiento.

El reactivo XTT[®] se diluyó en medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo fenol al 20 % respecto a la cantidad total. Para obtener la medida de la viabilidad celular inmediatamente después del tratamiento con las formulaciones, tras el tiempo de tratamiento se realizó un lavado con PBS, se añadió a los pocillos el reactivo XTT[®] diluido y se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, y protegido de la luz, durante 17 horas. Para obtener la medida de la viabilidad celular tras un periodo de recuperación de 24 horas, las células se cultivaron durante este tiempo en medio completo, tras haber sido tratadas con las formulaciones en estudio y posteriormente se añadió el reactivo diluido, incubándose en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo que en la medida anterior.

Se emplearon células sin ningún tratamiento como control negativo de toxicidad (100 % viables) y, como control positivo de toxicidad, células expuestas a una solución acuosa con 0.05% de cloruro de benzalconio (BAC) (viabilidad < 10 %). Los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad, normalizados respecto al control negativo.

4.5. Estudio de la proliferación celular

El ensayo que se utilizó para medir la tasa de proliferación de las células HCE expuestas a los distintos protocolos de estudio fue el alamarBlue[®]. El reactivo alamarBlue[®] tiene como componente principal el resazurin, un compuesto no tóxico y permeable para las células que, al entrar en el interior de las células viables, es reducido a resarufin, un compuesto que emite fluorescencia a unas longitudes de ondas determinadas. Este reactivo se diluyó al 10 % respecto de la cantidad total, en medio sin suplementos. Tras 4,5 horas en contacto con las células, se procedió a la lectura del resultado transfiriendo el medio a placas de 96 pocillos. Se detectó el valor de cada pocillo midiendo la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 560 nm y de emisión de 590 nm. Los resultados se presentan como porcentaje de proliferación, normalizados respecto a los valores obtenidos en la primera determinación realizada. n=3, por duplicado.

4.5.1. Medida de la proliferación tras tratar las células HCE con las formulaciones A, B y C

Se sembraron las células en placas de 24 pocillos a razón de 25.000 células/pocillo. Tras 48 horas de crecimiento, los cultivos celulares se lavaron con medio sin suplementos durante 24 horas y se trataron con las formulaciones liposomales, empleando para este ensayo las condiciones indicadas en la tabla 3 (página 37). En ese momento, el cultivo había alcanzado el 60 % de confluencia, es decir, momento en el que aproximadamente un 60 % de la superficie del pocillo estaba cubierta por la monocapa celular, y se realizó el ensayo de alamarBlue® considerando esta medida, como la obtenida a tiempo 0. Tras la detección, los pocillos se lavaron con PBS y se añadió medio completo. Se aplicó el reactivo alamarBlue® a diario, hasta obtener la curva de proliferación tras 48 horas de la primera determinación (figura 6).

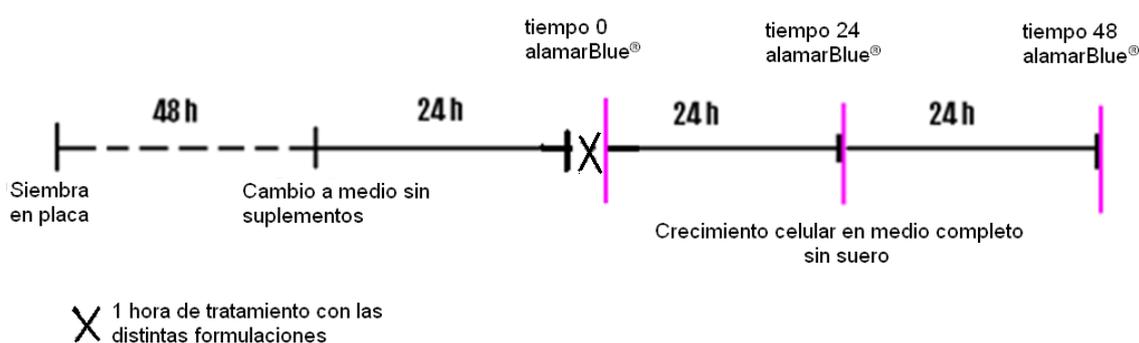


Figura 6: Esquema que representa el protocolo del estudio de proliferación tras tratar a los cultivos celulares con las condiciones indicadas.

4.5.2. Medida de la proliferación de las células HCE durante el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación y posterior mantenimiento

La curva de proliferación celular se midió en dos situaciones: a) durante 48 horas tras haber aplicado el modelo de inflamación, manteniendo las células en medios de cultivo diferentes, y b) durante 96 horas desde el inicio del ensayo, previamente a aplicar el modelo de inflamación, y tras haber seleccionado el medio de cultivo más adecuado en el que mantener las células tras inflamarlas con TNF α .

Se sembraron 40.000 células/pocillo y tras 48 horas de crecimiento en medio completo, el cultivo había alcanzado aproximadamente un 90 % de confluencia.

En la situación a), las células se sometieron al protocolo de simulación de las condiciones de inflamación y, una vez “inflamadas”, se realizó el ensayo alamarBlue®. Con los datos obtenidos se normalizaron las posteriores medidas, tras 24 y 48 horas, donde las células se mantuvieron con distintos medio de cultivo: i) medio completo, ii) medio completo sin suero o iii) medio sin suplementos (figura 7 A).

En la situación b), se realizó el ensayo alamarBlue® antes de aplicar el modelo de inflamación. Con estos datos se normalizaron las posteriores medidas a 48 horas, tras aplicar el modelo de inflamación, y a 72 y 96 horas, donde las células se mantuvieron en medio completo sin suplementos (figura 7 B). Este medio resultó el más adecuado tras los resultados del seguimiento durante 48 horas de la proliferación celular con distintos medios de cultivo (la situación a).

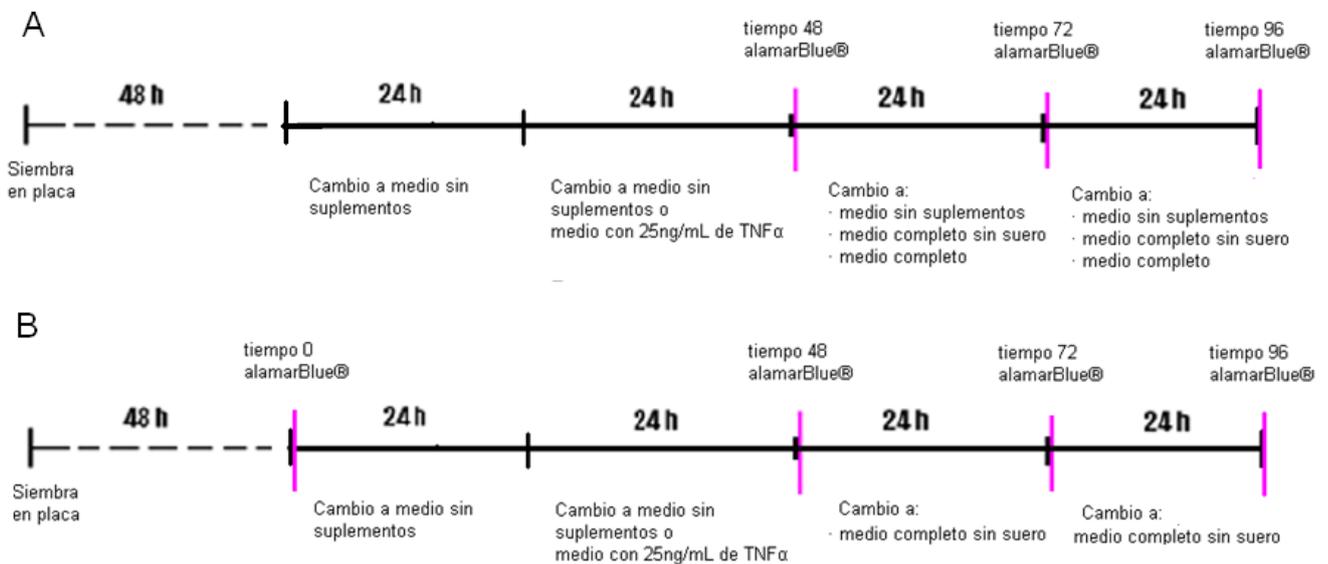


Figura 7: Esquema que representa los protocolos del estudio de la proliferación celular. En A) para conocer el crecimiento durante 48 horas en medios de cultivo diferentes, tras haber aplicado el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación, y en B) para conocer el crecimiento durante 96 horas, desde el inicio del ensayo, tras haber seleccionado el medio de cultivo más adecuado.

4.6. Inmunodetección por fluorescencia de receptores para el acMDX

Para la detección de los receptores del acMDX, se sembraron las células HCE en placas de 8 pocillos, a razón de 15.000 células/pocillo. Tras 48 horas de crecimiento en medio completo, una placa se lavó con PBS y se fijó durante 15 minutos con metanol frío. Otra placa se sometió a distintas condiciones. Unos pocillos sirvieron como control, donde las células crecieron en medio sin suplementos; y otros fueron tratados con la formulación B y C de la condición 8 (tabla 4, página 36). Tras esto, se procedió como anteriormente, lavando y fijando las células. Se guardaron las muestras a -20°C hasta el momento de uso.

Las placas se dejaron atemperar, y se permeabilizaron las células, empleando PBS con Tritón al 0.3 %, durante 10 minutos. Se realizaron tres lavados con PBS, de 5 minutos cada uno, y se incubó durante 1 hora con tampón de bloqueo para evitar uniones inespecíficas. La incubación con el Ac primario se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche, teniendo en cuenta las diluciones indicadas en la tabla 5. Posteriormente, se realizaron una serie de lavados con PBS y se incubaron las células con el Ac secundario, 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad (tabla 5). Finalmente, se realizó una contratinción nuclear con ioduro de propidio en dilución 1:10000 en PBS durante 10 minutos. Tras ello, se visualizó al microscopio. Como control negativo se usaron células a las que no se añadió el Ac primario. n = 2.

Tabla 5: Condiciones y Acs empleados en la inmunodetección por fluorescencia de receptores para el acMDX. *Acs diluidos en tampón de bloqueo, **Acs diluidos en PBS.

	Receptor de glucocorticoides	Receptor de progesterona
Tampón de bloqueo	PBS + 4 % de suero de burro	
Ac primario*	5 µg/mL Dilución 1:400	5 µg/mL Dilución 1:200
Ac secundario**	Dilución 1:200	

Para colocalizar el marcaje nuclear y el de los receptores, el microscopio nos permite obtener secciones ópticas de distintos planos de la muestra. Las secciones ópticas, de 0.6 μm cada una, contienen la información necesaria para poder hacer, posteriormente, un análisis tridimensional. Esto permite localizar la zona exacta donde está la fluorescencia. Igual que se localizan los receptores en la dimensión X-Y, también se pueden localizar en el eje Z.

En la placa que se sometió a las distintas formulaciones (B y C) de la condición 8, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia perteneciente a los receptores de glucocorticoides y progesterona, localizada en el núcleo de las células. Se procedió así para conocer si realmente había una activación del receptor (un aumento en la intensidad de fluorescencia nuclear) tras el tratamiento con la formulación C, que contenía acMDX. Se seleccionaron 10 células al azar entre 3 fotografías tomadas de la misma condición y se midió la intensidad de fluorescencia en la región nuclear. Los valores obtenidos para cada tratamiento se muestran normalizados con los valores obtenidos en las células control, que no habían sido sometidas a ningún tratamiento.

4.7. Extracción y determinación de proteínas

Para la extracción de proteínas, se lavaron las células con PBS frío y se añadió tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) compuesto por 10mM Tris HCl, 150mM NaCl, 1 % ácido desoxicólico, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, y 1mM EDTA, y cuyo pH había sido previamente ajustado a 7.4. Este tampón se suplementó con una mezcla de inhibidores de proteasas (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ PMSF, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de 100 mM de Na_3VO_4 , y 6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aprotinina). El tampón RIPA, junto con los inhibidores de proteasas añadidos, permite que se produzca el lisado celular y la disolución de las proteínas, evitando la degradación proteica por la interferencia de proteínas inmunoreactivas o con actividad biológica. Se rascó cada pocillo para romper las uniones célula-célula y obtener una solución proteica. En todos los casos se obtuvo un "pool" de proteínas al mezclar los duplicados. Se incubó 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 14.000

rpm y 4° C durante 30 minutos. Se recogieron los sobrenadantes, evitando el pellet formado, y se guardaron a -80° C hasta su utilización.

Para la determinación de proteínas se utilizó el kit Pierce® BCA Protein Assay Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. La determinación se realizó mediante un método de absorción colorimétrica en el multilector de placas, a una longitud de onda de 562 nm y una longitud de onda de referencia de 450 nm. El método de análisis cuantitativo fue una curva patrón utilizando diluciones seriadas de albúmina bovina de concentración conocida.

4.8. Identificación de proteínas mediante electroforesis y Western blotting

Se obtuvieron alícuotas de las muestras cuya cantidad de proteína total se había determinado previamente y se mezclaron con la misma cantidad del reactivo de Laemmli. Este reactivo indicará el frente de migración proteica durante la electroforesis, ya que contiene azul de bromofenol, una molécula coloreada de bajo peso molecular que avanza rápidamente actuando como marcador del frente de electroforesis, y aumentará la densidad de la muestra para que quede en los pocillos sin dispersarse, ya que contiene glicerol o sacarosa. Otro componente es el 2-mercaptoetanol o el ditioneitol (DTT), que romperá los enlaces intra o inter catenarios. Tras cocer las muestras a 110° C durante 5 minutos para romper el resto de enlaces y desnaturalizar las proteínas, se mantuvieron en hielo hasta cargarlas en un gel de poliacrilamida.

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Este detergente, el SDS, recubre el polipéptido, ya desnaturalizado, de cargas negativas, haciendo despreciables las cargas de la propia estructura aminoacídica de la proteína. Así, todas las proteínas tienen una densidad de carga uniforme, provocando la separación proteica según el peso molecular.

El tamaño de poro de un gel está determinado por la concentración total de acrilamida presente (%T, siendo T la concentración total de monómeros de acrilamida y bisacrilamida). Para detectar los receptores de glucocorticoides y de progesterona se

empleó un tamaño de poro mayor (10 %T) que para detectar la IL-6 (12 %T). Esto se debe al distinto peso molecular de las proteínas de estudio, de modo que a mayor peso molecular de la proteína de interés, menor %T será necesario para una buena separación electroforética y su posterior detección.

Se cargaron 15 μg de proteína por pocillo, añadiendo un pocillo con un marcador de peso molecular. Los tiempos y parámetros empleados para la electroforesis fueron de 15 minutos a 70 V seguido de 1 hora a 120 V.

Para la fase de transferencia, en la cual las proteínas, ya separadas por su peso molecular, son transferidas a una membrana de nitrocelulosa, se empleó un amperaje de 350 mA durante 1 hora y media, manteniendo la cubeta en frío. En la figura 8 se muestra el material empleado para llevar a cabo la electroforesis y la transferencia.

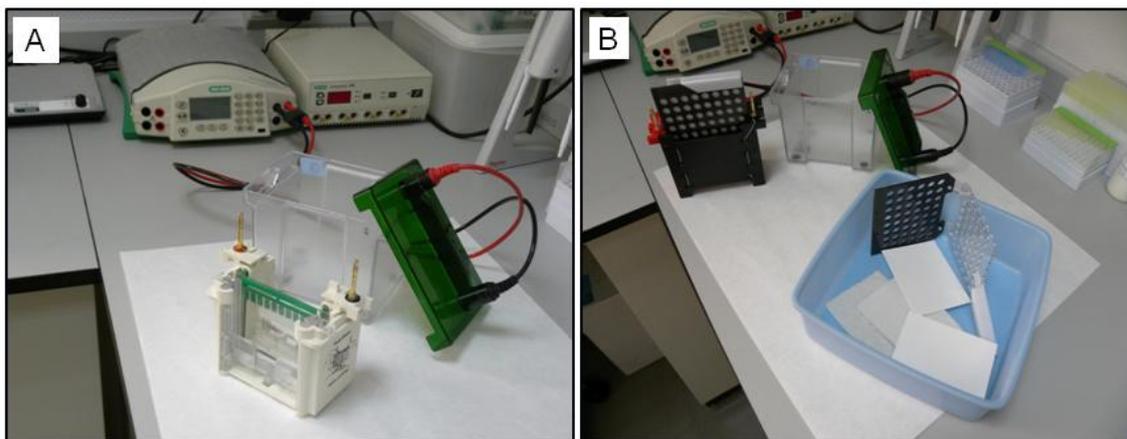


Figura 8: Fotografías de los materiales empleados durante A) la electroforesis y B) la transferencia, en la identificación de proteínas mediante electroforesis y Western blotting.

Para la inmunodetección de las proteínas de interés, se incubaron las membranas con tampón de bloqueo previamente, y con distintos Acs primarios y secundarios posteriormente, siempre con 3 lavados de TBS-T entre ellos, de 15 minutos cada uno (tabla 6). La concentración final de cada Ac se fijó según las recomendaciones de la casa comercial.

El revelado de las membranas se realizó por quimioluminiscencia. Para ello se mezclaron previamente y a partes iguales el Buffer Immun-Star™ HRP Peroxide Buffer y el Revelador Immun-Star™ HRP Luminol/Enhancer. La detección se realizó mediante un sistema de documentación de geles en el ChemiDoc®.

Para la detección de los receptores de glucocorticoides y de progesterona, se empleó como control el extracto proteico de la línea celular HeLa, derivada de un carcinoma cervical, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial de estos Acs. Para la cuantificación tanto de los receptores de glucocorticoides y de progesterona, como de la IL-6, los valores obtenidos tras el análisis volumétrico de las bandas correspondientes, se normalizaron con los valores de GAPDH obtenidos mediante el mismo análisis.

Tabla 6: Condiciones y Acs empleados para la detección de proteínas mediante electroforesis y Western blotting. *Acs diluidos en TBS-T con 4% leche, **Acs diluidos en TBS-T.

	Receptor de glucocorticoides	Receptor de progesterona	IL-6	GAPDH
Tampón bloqueo	4 % leche en polvo + 5 % de suero de burro en TBS-T			
Ac primario*	2,5 µg/mL Dilución 1:400	2,5 µg/mL Dilución 1:200	2, 5 µg/mL Dilución 1:400	Dilución 1:1000
Ac secundario**	Dilución 1:5000			

4.9. Microscopía de contraste de fases

Se evaluó la morfología de las células mediante microscopía óptica de contraste de fases. Las células se observaron a 10 ó 20 aumentos, directamente en las placas de poliestireno de 24 pocillos, sin emplear ningún procesamiento, tras haber sido tratadas con las formulaciones en estudio y durante el seguimiento tras inflamar las células y mantenerlas en ausencia de suero.

4.10. Protocolo de simulación de las condiciones de inflamación o modelo de inflamación

Se sembraron las células en placas de 24 pocillos a razón de 80.000 células/pocillo en medio completo. Tras 48 horas de crecimiento, se cambió el medio completo por medio sin suplementos y se dejó durante toda la noche. Este procedimiento de lavado pretende evitar que algún componente del medio suplementado interfiera con el tratamiento inductor de la inflamación.

Tras ello, se trató la mitad de los pocillos con medio sin suplementos y la otra mitad con medio que contenía únicamente 25 ng/mL TNF α , durante 24 horas. Tras este tiempo, se recogió el sobrenadante para comprobar que los niveles de IL-6 eran más elevados en los pocillos tratados con TNF α , es decir, que el protocolo inflamatorio había funcionado.

4.11. Tratamientos antiinflamatorios control

El tiempo de contacto con los tratamientos fue, en todos los casos, de 1 hora. Tras este tiempo, las células se mantuvieron en medio completo sin suero.

Se seleccionaron 2 antiinflamatorios control: la DEX y el Medrivás[®].

La DEX, se solubilizó en agua, según las indicaciones de la casa comercial. La solución de trabajo se preparó a 0.05 mg/mL, de la cual, haciendo las diluciones pertinentes con medio sin suplementos, se obtuvieron soluciones 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} M de DEX. Como control se emplearon pocillos en contacto con medio sin suplementos ni DEX.

En el caso del Medrivás[®], se hizo la dilución necesaria con medio sin suplementos, para obtener la misma concentración de principio activo que la que contenía las formulaciones en estudio (5 μ g/mL). El Medrivás[®] tiene una composición de 20 mg/mL de acMDX. En el prospecto también se indica que contiene 0.5 mg/mL de clorhidrato de tetrizolina (un vasoconstrictor) y BAC, tetraborato sódico, NaCl, edetato disódico, ácido bórico, entre otros excipientes.

4.12. Evaluación del efecto antiinflamatorio: medida de la IL-6 mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para cuantificar el efecto antiinflamatorio de las formulaciones liposomales en estudio y los controles (Medrivás® y DEX), en términos de proteína secretada, se analizaron los sobrenadantes recogidos en distintas fases del experimento. En la evaluación del efecto antiinflamatorio de un antiinflamatorio control (DEX), se analizaron los sobrenadantes recogidos tras simular las condiciones de inflamación, después del tratamiento con las formulaciones, y una vez transcurridas 24 horas y 48 horas de este tratamiento. En la evaluación del efecto antiinflamatorio de las formulaciones en estudio, se analizaron los sobrenadantes tras simular condiciones de inflamación, y tras 24 horas del tratamiento con las formulaciones de estudio.

Para esta determinación se empleó el kit comercial de inmunodetección frente a la IL-6 humana (figura 9).

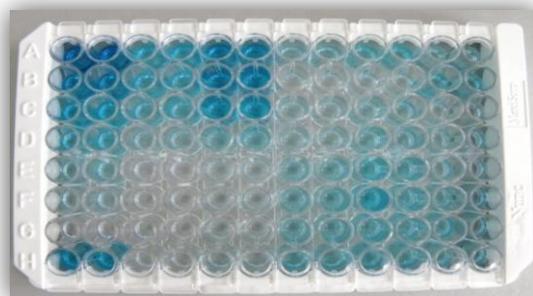


Figura 9: Placa de 96 pocillos propia del kit comercial para detectar niveles de IL-6 secretados. En las dos primeras columnas se puede observar la curva patrón, con tonalidades decrecientes según la concentración de IL-6 añadida.

El método de análisis cuantitativo fue una curva patrón utilizando diluciones seriadas de IL-6, de concentración conocida, incluido en el kit.

Los valores obtenidos se normalizaron con los valores del control (células que no habían sido “inflamadas” y tampoco se habían tratado con ninguna formulación). Los valores obtenidos en los últimos sobrenadantes recogidos se normalizaron con los

valores de proteína obtenida en cada placa correspondiente a cada experimento, tras extraer y determinar la concentración proteica de cada pocillo (apartado 4.7.).

4.13. Estudio estadístico

Se presentan los datos, para cada conjunto de muestras, como el valor promedio \pm el error estándar de la media (SEM).

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas se empleó la prueba t de Student, de dos colas, y de tipo 2 ó 3, según si había homogeneidad de las varianzas o no entre muestras comparadas (prueba F). El nivel de significación se estableció en $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

Los resultados se presentan agrupados en las tres fases en las que se ha estructurado el estudio.

FASE I: Puesta a punto de los métodos a emplear para evaluar el efecto antiinflamatorio de las formulaciones liposomales

5.1. Detección de receptores para el acetato de medroxiprogesterona

5.1.1. Electroforesis y Western blotting

El receptor de glucocorticoides tiene un peso molecular de 86 kDa y el de progesterona de 99 kDa. El receptor de glucocorticoides se detectó en una banda inmunoreactiva de doble peso molecular que el esperado (172 kDa aproximadamente). Este resultado pensamos que es debido a que estos receptores pueden dimerizar y sería su forma dimérica la que estaríamos detectando. El receptor de progesterona se detectó en una banda de 99 kDa de peso molecular (figura 10). El extracto de células HeLa, usado como control positivo de expresión de estos receptores, mostró bandas inmunoreactivas a estos mismos pesos moleculares.

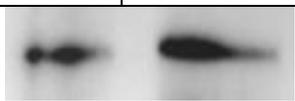
Muestra	HeLa	HCE
R. Glucocorticoides		
≈172 kDa		
Muestra	HeLa	HCE
R. Progesterona		
≈99 kDa		

Figura 10: Evaluación de la expresión de los receptores de glucocorticoides y de progesterona mediante electroforesis y Western blotting. n = 2.

5.1.2. Inmunodetección por fluorescencia

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos mediante inmunodetección por fluorescencia de los receptores para el acMDX.

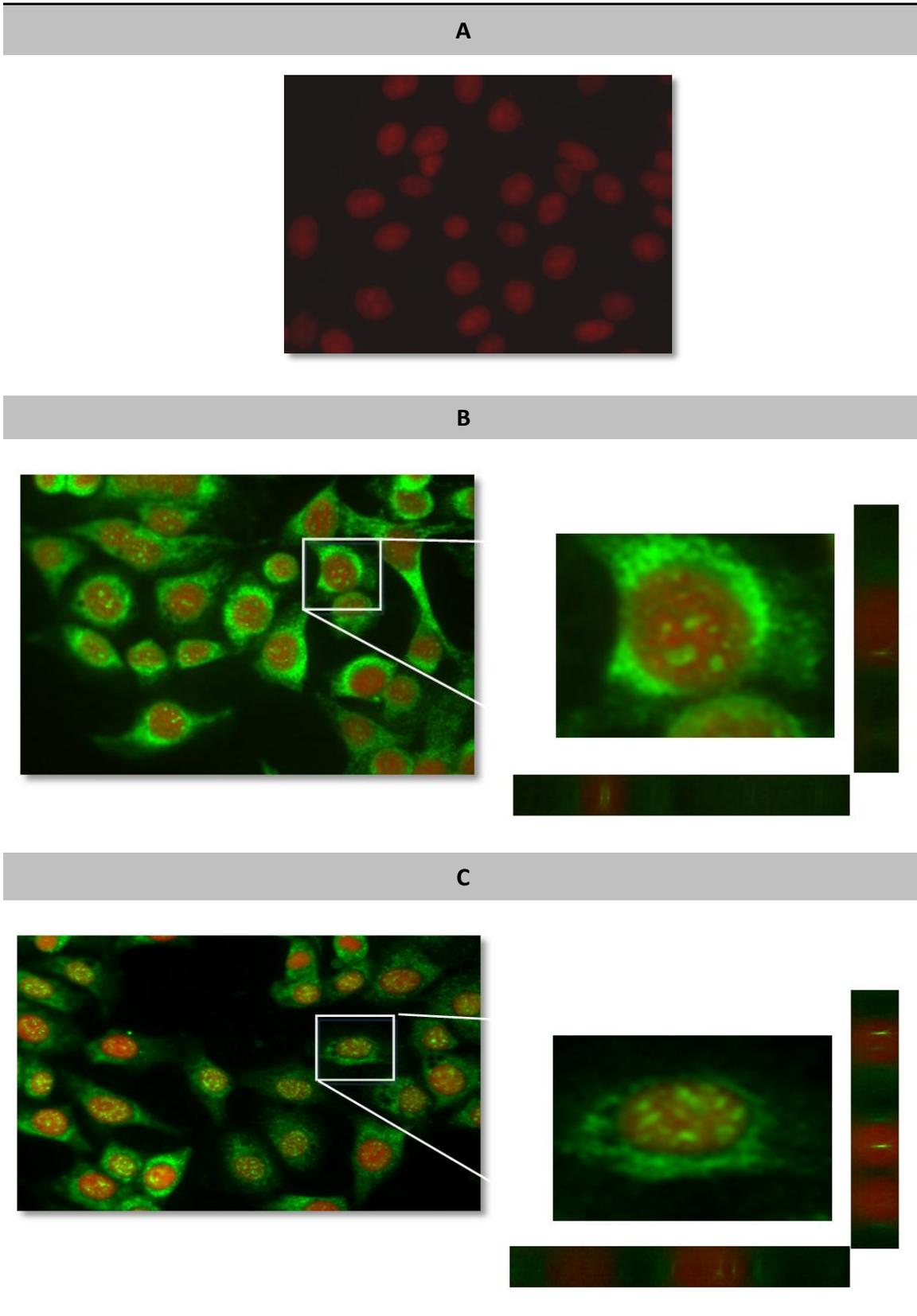


Figura 11: Fotografías representativas a 20 aumentos tomadas de la línea celular HCE creciendo en medio completo donde A) es el control negativo (sin emplear Ac primario), en B) se empleó el Ac primario anti-receptor de glucocorticoides (fluorescencia en verde) y C) se empleó el Ac primario anti-receptor progesterona (fluorescencia en verde). n = 2.

Los controles negativos, sin el Ac primario, no mostraron fluorescencia alguna, tal y como era de esperar. Sin embargo, se detectó la expresión de estos receptores, en las células HCE. Se observó una fluorescencia intensa para ambos receptores, tanto en el citoplasma como en el núcleo (figura 11).

Las imágenes ampliadas en la figura 11 B y C muestran expresión localizada en el núcleo celular, comprobándose, mediante análisis del eje Z, que su marcaje estaba realmente en el interior del mismo, que es la localización intracelular de estos receptores.

5.2. Estudio de viabilidad de las células al ser tratadas con las formulaciones de estudio

La viabilidad de las células HCE tras 1 hora de contacto con las condiciones empleadas para los estudios de la primera fase del trabajo se mantuvo siempre superior al 80 % (figura 12 A).

El control positivo de toxicidad (células expuestas a BAC) mostró un porcentaje de toxicidad inferior al 10 % en todos los análisis, como era de esperar.

La viabilidad celular tras el periodo de recuperación de 24 horas en medio de cultivo volvía a ser del 100 % en todos los casos (figura 12 B), excepto en el control positivo con BAC. Esto estaría indicando que esa pequeña reducción en la viabilidad celular, observada en la medida inmediata tras la exposición a las formulaciones, era transitoria y no ocasionaba ningún efecto negativo permanente en las células.

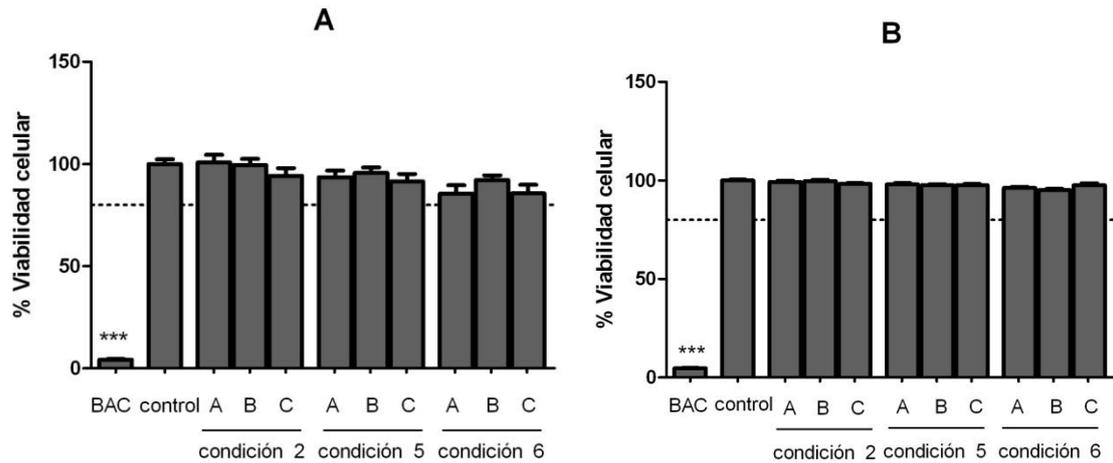


Figura 12: Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular de las HCE tras estar en contacto con las condiciones 2,5 y 6 que se muestran en la tabla 3, siendo A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) o C (liposomas cargados con acMDX, en este caso con 0,5 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL de acMDX respectivamente para cada condición) las distintas formulaciones empleadas. Se muestran los resultados en A) inmediatamente después de tratar los cultivos 1 hora de contacto con las formulaciones y en B) tras 24 horas de este tratamiento. n = 2, por quintuplicado. *** $p < 0.001$ entre el control y las condiciones indicadas.

Este dato también se comprobó mediante microscopia de contraste de fases. Tras 1 hora de tratamiento con las formulaciones, algunas células mostraban una morfología diferente de la que se observaba en el control (figura 13). Además, esta morfología característica estaba presente en las células en contacto con las formulaciones A, B y C, por lo que debía ser el tampón hipotónico, presente en las 3 formulaciones, el que causaba este fenotipo.

A las 24 horas creciendo en medio de cultivo completo, todas las células, independientemente del tratamiento seguido, presentaban una morfología normal, similar a las células control.

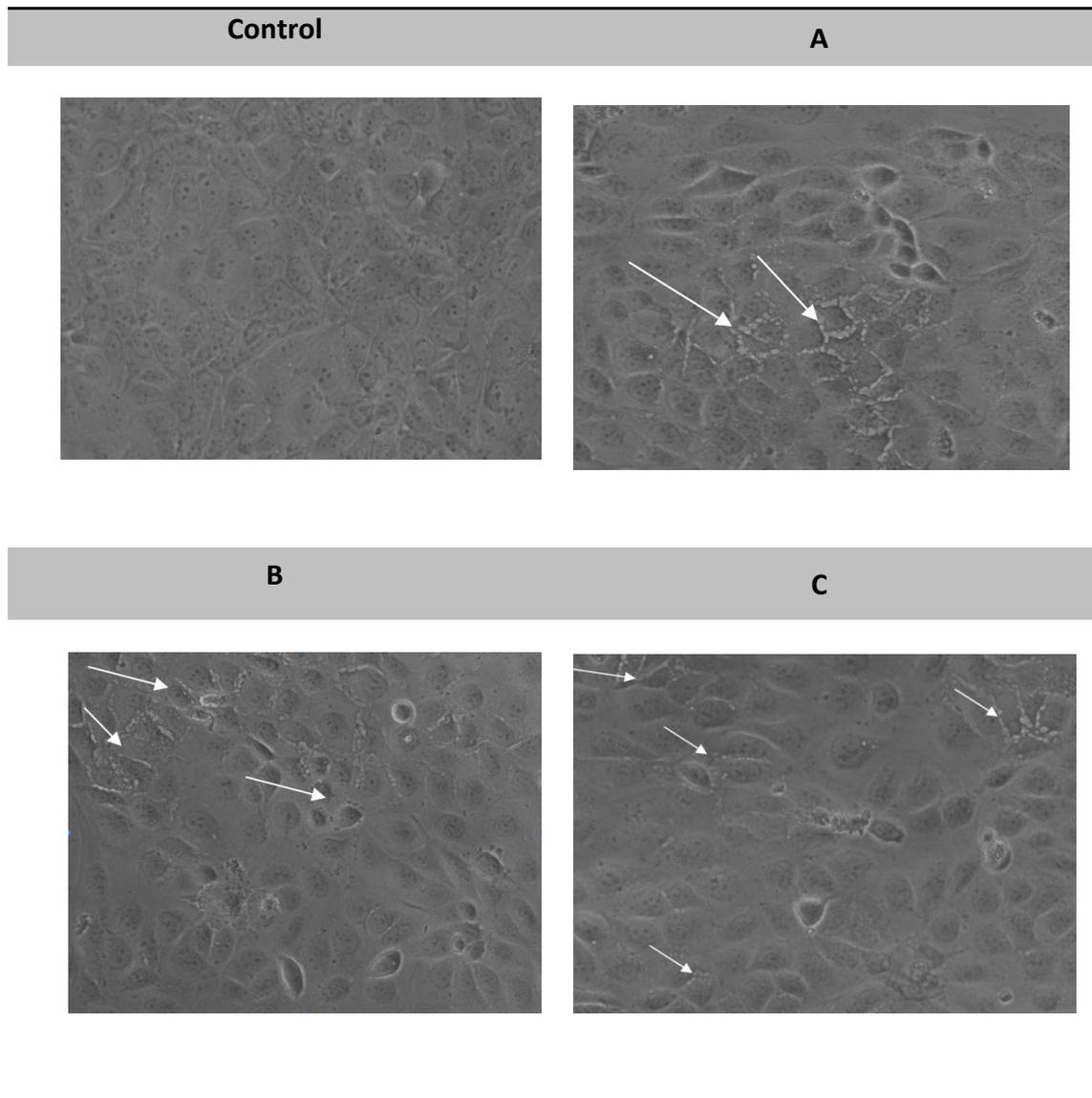


Figura 13: Fotografías representativas de microscopía de contraste de fases a 20 aumentos, tras 1 hora de contacto con las formulaciones A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) o C (liposomas cargados con acMDX) de la condición 5. Las flechas indican cambios en la morfología propia de la línea celular, respecto al control. Tras 24 horas creciendo en medio completo, vuelven a tener una morfología normal.

5.3. Ensayo de proliferación: selección de la concentración de acetato de medroxiprogesterona candidata para los estudios *in vitro*

En ningún caso se observó un aumento de la proliferación tras una hora de contacto con las formulaciones (figura 14), ya que las células control siempre tuvieron mayores tasas

de proliferación que el resto de condiciones. En la figura 14, se observa como las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acMDX de la formulación C parecen las más adecuadas, ya que se observa una diferencia con el resto de formulaciones sin molécula activa (A y B), y la proliferación es similar a la obtenida en el control, pero siempre menor.

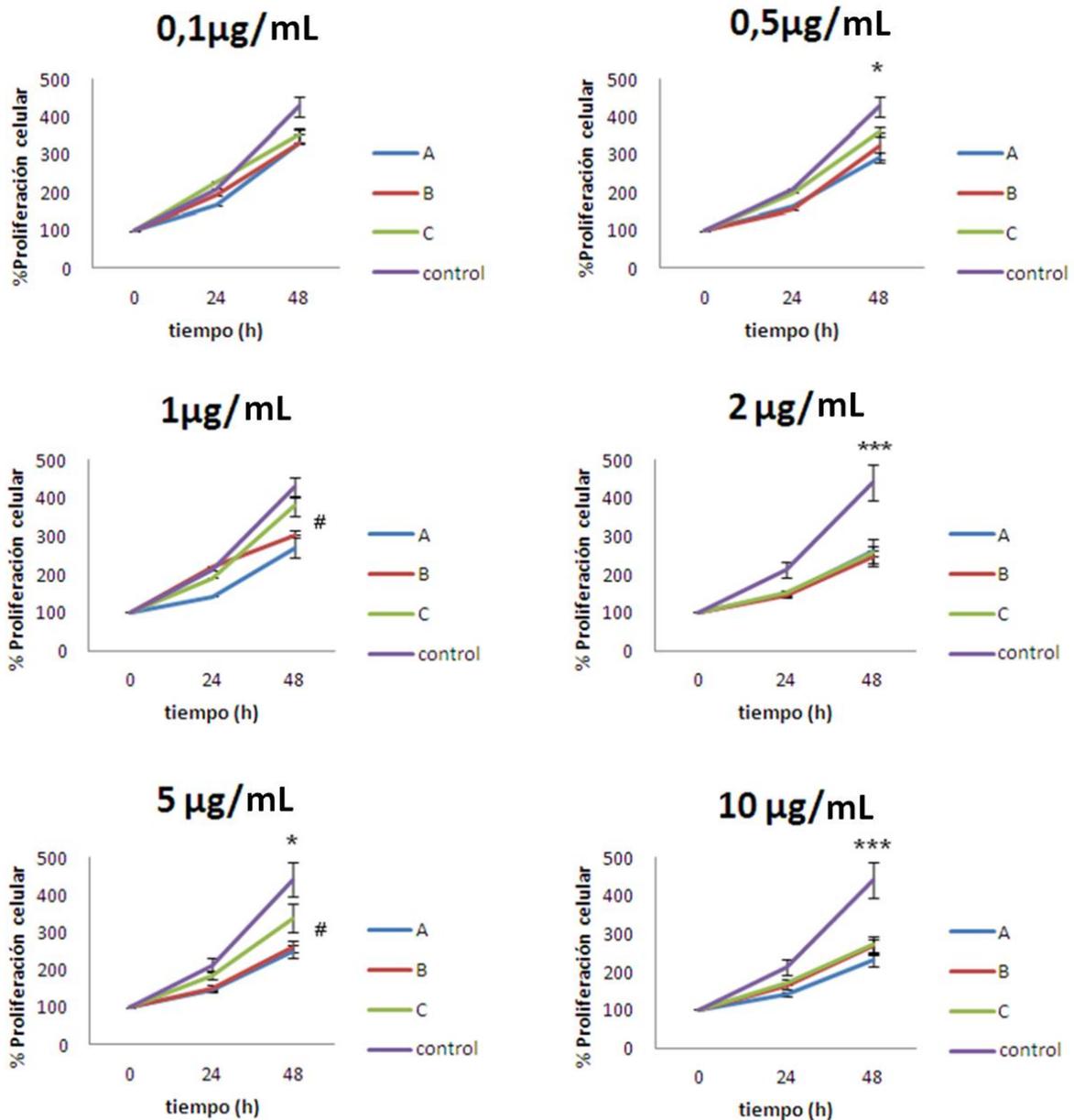


Figura 14: Gráficas de proliferación obtenidas según las distintas concentraciones de acMDX aplicadas, donde A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) o C (liposomas cargados con acMDX), son las distintas formulaciones empleadas. $n = 3$, por duplicado. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ entre formulación C y control; y # $p < 0.05$ entre C v B.

5.4. Adaptación del protocolo de inflamación *in vitro* para la línea celular HCE

5.4.1. Seguimiento mediante microscopía óptica y ensayo de proliferación

Se llevó a cabo un seguimiento de posibles cambios en la morfología celular por microscopía de fases (figura 15). Tras las primeras 48 horas en medio sin suplementos, ya se observaba un porcentaje de células que entraba en apoptosis, apareciendo en una forma redondeada y alterada en el medio de cultivo. La confluencia que se conseguía los primeros días se perdía, apareciendo calvas en la monocapa celular (figura 15 B). A medida que aumentaba este tiempo de crecimiento en ausencia de suero, estos efectos se agravaban (figura 15 C).

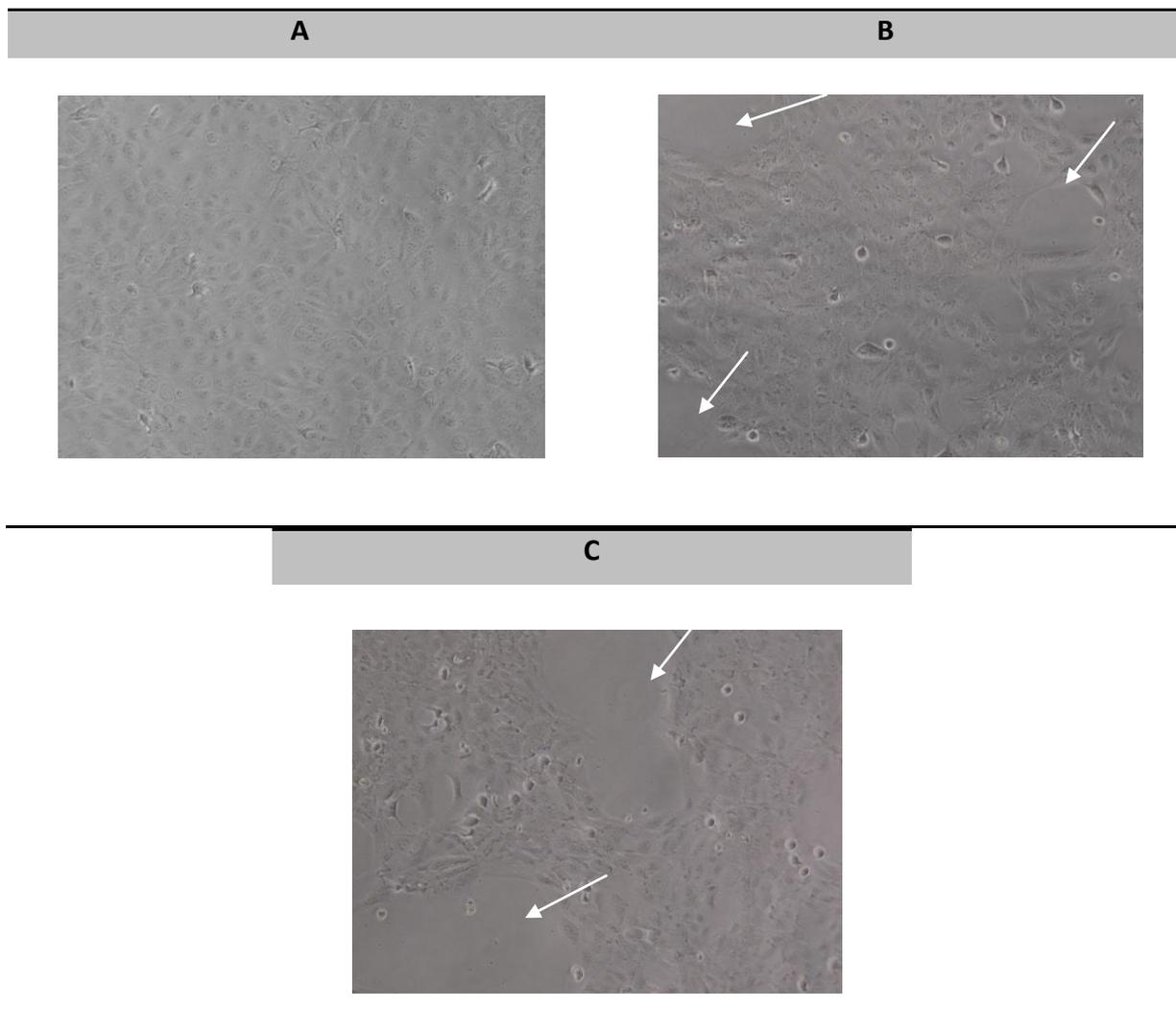


Figura 15: Fotografías representativas de microscopía de contraste de fases a 10 aumentos, de células HCE A) antes de comenzar el ensayo, y tras B) 48 horas y C) 72 horas creciendo en medio sin suplementos. Las flechas señalan las calvas observadas en la monocapa celular.

Se realizó un estudio de la proliferación celular durante 48 horas tras aplicar el modelo de inflamación con 3 medios de cultivo diferentes: i) medio sin suplementos, ii) medio completo sin suero o iii) medio completo. Los resultados se muestran en la figura 16.

El objetivo era observar las diferencias entre la tasa de proliferación de las células creciendo en medio completo (condiciones normales) y creciendo en ausencia de suero, condición necesaria a aplicar en el ensayo para asegurar que ningún componente del suero interfiera en posteriores análisis. Por otra parte se buscaba saber si la adición de suplementos en un medio sin suero mejoraba la tasa de proliferación.

La tasa de proliferación de las células creciendo en medio completo era hasta 4 veces mayor que con el resto de condiciones al finalizar el ensayo. Se observó que el número de células se mantenía, incluso aumentaba ligeramente (115 %), si las células crecían en medio completo sin suero, a diferencia de los cultivos que no tenían ningún suplemento, en los cuales disminuía el número inicial de células con el tiempo, por lo que seleccionó emplear este medio de cultivo para mantener las células tras aplicar el modelo de inflamación.

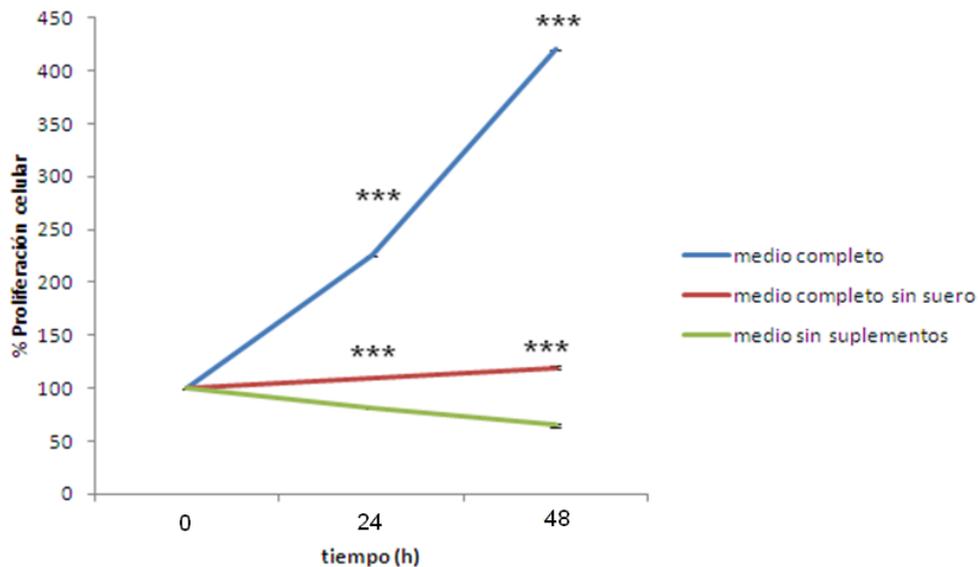


Figura 16: Gráfica de proliferación obtenida durante 48 horas en medios de cultivo diferentes, tras haber aplicado el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación (tiempo 0). n=3, por duplicado. *** $p < 0.001$ entre medio completo sin suero o medio completo y medio sin suplementos.

Una vez seleccionado el empleo del medio completo sin suero tras aplicar el modelo de inflamación, se procedió con el estudio de la proliferación celular durante 96 horas, desde el inicio del ensayo. El objetivo de este estudio era conocer qué concentración celular se debía sembrar en las placas de trabajo para asegurar un número de células adecuado durante el ensayo, así como tener en cuenta un posible efecto del TNF α , empleado para inflamar las células, en la proliferación celular.

Se observó que el número de células disminuía en un 20% aproximadamente tras las 48 horas en medio sin suplementos (figura 17). Los suplementos adicionados tras haber aplicado el modelo de inflamación, provocó que se recuperase el ritmo de proliferación, alcanzándose el porcentaje de proliferación celular inicial.

Al comparar las líneas de proliferación seguidas por las células en contacto con TNF α se observó que había diferencias con la de las células control sin TNF α . Estas pequeñas diferencias, significativas tras las primeras 48 y 72 horas de ensayo, se vieron disminuidas hasta igualarse a las 96 horas.

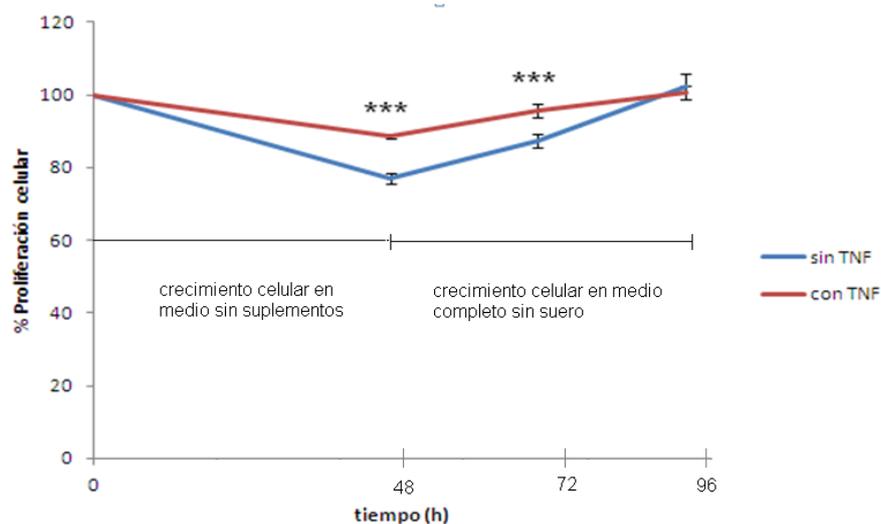


Figura 17: Gráfica de proliferación obtenida durante 96 horas, desde el inicio del ensayo, tras haber seleccionado el medio de cultivo más adecuado para emplear tras aplicar el modelo de inflamación. n=3, por duplicado. *** $p < 0.001$ entre condiciones con TNF α “inflamadas”, y sin TNF α

Teniendo en cuenta la tasa de proliferación de las células en condiciones normales (medio completo) en comparación con la tasa obtenida empleando medio completo sin suero, y la reducción de la proliferación tras aplicar el modelo de inflamación que obliga a someter a las células a un periodo en medio sin suplementos de 48 horas, se decidió sembrar una concentración celular de más del doble de lo que se sembraría en condiciones normales. Por otro lado, considerar que habrá un número de células ligeramente superior ($\approx 10\%$) en las condiciones que se hayan tratado con $\text{TNF}\alpha$.

5.4.2. Medida de los niveles de IL-6 tras aplicar el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación o modelo de inflamación

En todos los casos en los que se aplicó el protocolo del modelo de inflamación (tratamiento con controles y con las condiciones de estudio) se comprobó la efectividad del mismo, detectando que el nivel de IL-6 fue hasta 5 veces mayor en los pocillos que habían estado en contacto con $25\text{ ng/mL TNF}\alpha$ (figura 18). Es necesario tener en cuenta que este valor será, en realidad, aproximadamente un 10% menor, debido a que la tasa de proliferación de las células que habían estado en contacto con este factor fue mayor, como se ha demostrado en el apartado 5.4.1.

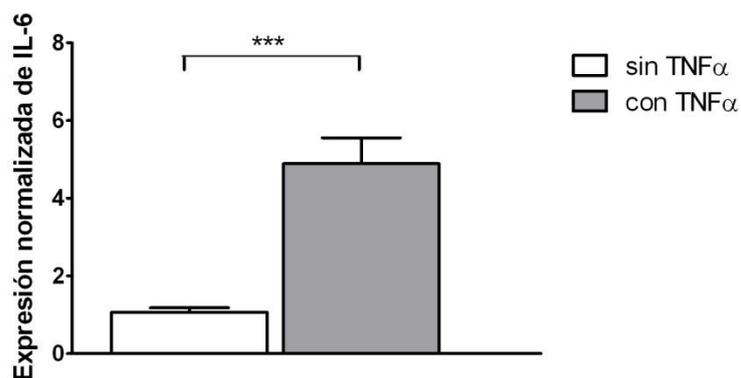


Figura 18: Gráfica que muestra los valores normalizados de IL-6 obtenidos en sobrenadantes de células HCE expuestas o no al $\text{TNF}\alpha$ mediante la técnica ELISA. El $\text{TNF}\alpha$ “inflama” las células produciendo un incremento significativo en la producción de IL-6. $n = 7$, por duplicado *** $p \leq 0.001$.

5.5. Selección de los antiinflamatorios control: estudio de la viabilidad de las células al ser tratadas con DEX y Medrivás®

Se determinó la viabilidad de las células tras ser tratadas con dos antiinflamatorios control: DEX y Medrivás®. La viabilidad de las células HCE tras 1 hora de contacto con estas soluciones se mantuvo siempre igual a la del control (figura 19). Tras las 24 horas de un periodo de recuperación en medio de cultivo, los resultados fueron similares (datos no mostrados).

El control positivo de toxicidad (células expuestas a BAC) mostró un porcentaje de toxicidad inferior al 5 % en todos los análisis, como era de esperar.

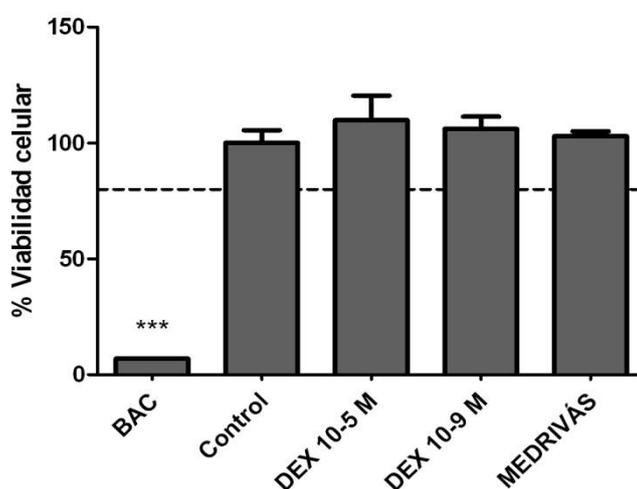


Figura 19: Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular de las HCE tras estar en contacto con distintas soluciones de antiinflamatorios control. Se muestran los resultados inmediatamente después de tratar los cultivos 1 hora de contacto con las soluciones. n = 1, por quintuplicado. *** $p < 0.001$ entre el control y la condición indicada.

Estos resultados se contrastaron con la morfología celular observada mediante microscopia de contraste de fases. Tras exponer a las células HCE a los distintos tratamientos con los antiinflamatorios control no se observó ningún cambio respecto a la morfología normal observada en las células control.

5.6. Detección de la IL-6 tras exponer a las células a DEX

5.6.1. ELISA

Se evaluó el efecto antiinflamatorio de las soluciones de DEX a 3 tiempos distintos: tiempos 0, 24 y 48 horas.

Tras 1 hora de contacto con las distintas soluciones de DEX, se recogió el sobrenadante que contenía la IL-6 secretada (tiempo 0). Este tiempo no resultó suficiente para observar diferencias entre los controles y los pocillos tratados con DEX (figura 20 A). Nótese que los pocillos de células “inflamadas” con TNF α tienen valores de IL-6 entre 20 y 60 veces mayores que el control. Esto es debido a que el sobrenadante recogido contenía la IL-6 secretada por las células durante solo 1 hora (la hora de tratamiento), por lo que los valores obtenidos eran mínimos (próximos a 0); de ahí los altos valores obtenidos al normalizar con dicho valor.

Tras 24 horas de haber tratado a los cultivos celulares con DEX, si que se pudo comprobar el efecto antiinflamatorio de la misma, puesto que reducía la secreción de IL-6 tanto en los pocillos donde se había aplicado el protocolo de simulación de condiciones de inflamación como los que no (niveles basales de producción) (figura 20 B). En todas las concentraciones testadas de DEX (10^{-5} M, 10^{-7} M y 10^{-9} M) se redujo significativamente la producción de IL-6. Además, esta reducción se correlacionaba con la concentración empleada, siendo más marcada a mayores concentraciones de DEX.

Tras 48 horas de haber tratado a los cultivos celulares con DEX, se observó la misma tendencia (figura 20 C), pero el efecto antiinflamatorio solo resultó significativo al emplear la solución más concentrada de DEX (10^{-5} M) en células en contacto con TNF α . En este caso los valores obtenidos de IL-6 se normalizaron con la proteína extraída de cada condición.

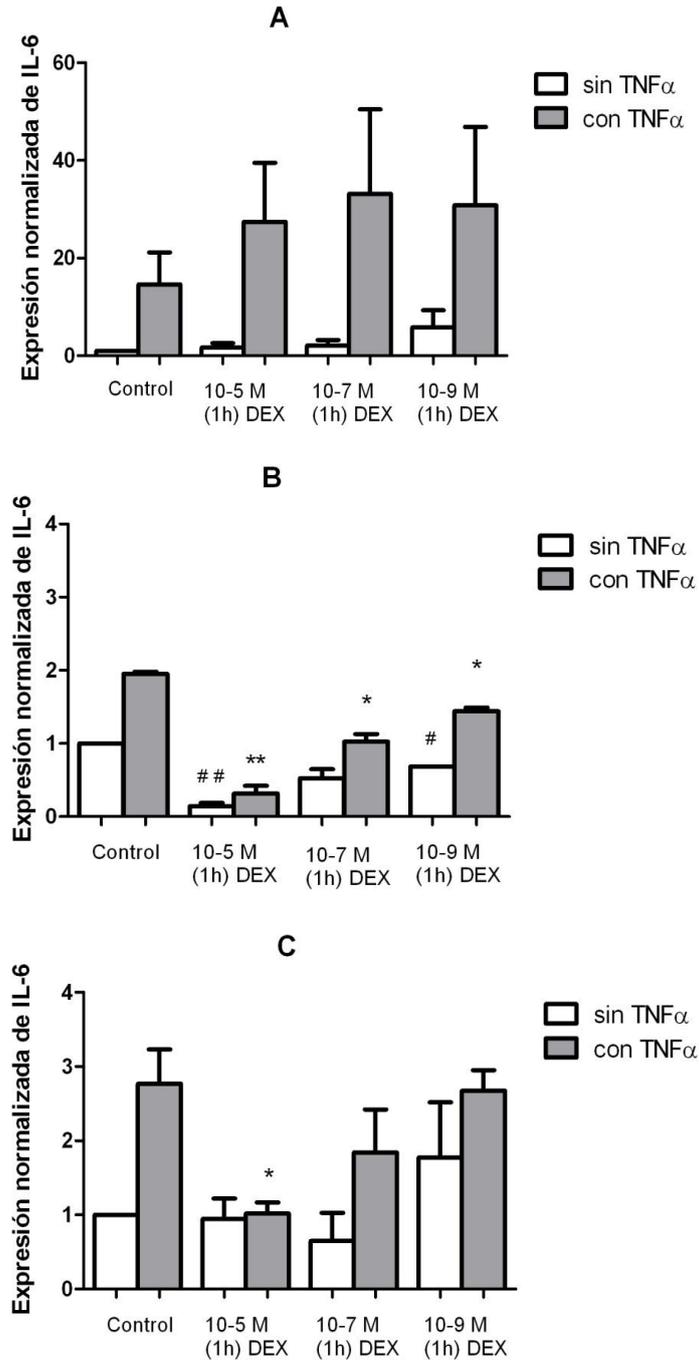


Figura 20: Gráficas que muestran los valores normalizados de IL-6 obtenidos por ELISA en sobrenadantes de células HCE expuestas o no al TNF α y tratadas con 3 concentraciones de DEX durante 1 hora. A) Valores tras la hora de tratamiento, B) valores tras 24 horas del tratamiento, y C) valores tras 48 horas del tratamiento. $n=2$, por duplicado. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ entre control con TNF α y la condición indicada. # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ entre control sin TNF α y la condición indicada.

5.6.2. Electroforesis y Western blotting

Se analizó la expresión de GAPDH como proteína de referencia porque tiene niveles de expresión constantes. Esta proteína es ampliamente empleada como un modo de “control” de la cantidad de proteína cargada en los distintos pocillos. La banda apareció en el peso molecular esperado (en torno a 37 kDa) (figura 21).

Se detectó una banda inmunoreactiva de peso molecular sobre 50 kDa en todos los casos, tanto en el control sin inflamar como en los extractos de células “inflamadas” tratadas o no con DEX, correspondiente a la IL-6 (figura 21). El peso molecular esperado para la IL-6 es entre 21-25 kDa. Este resultado pensamos que es debido a que esta glucoproteína puede formar dímeros y sería su forma dimérica la que estaríamos detectando.

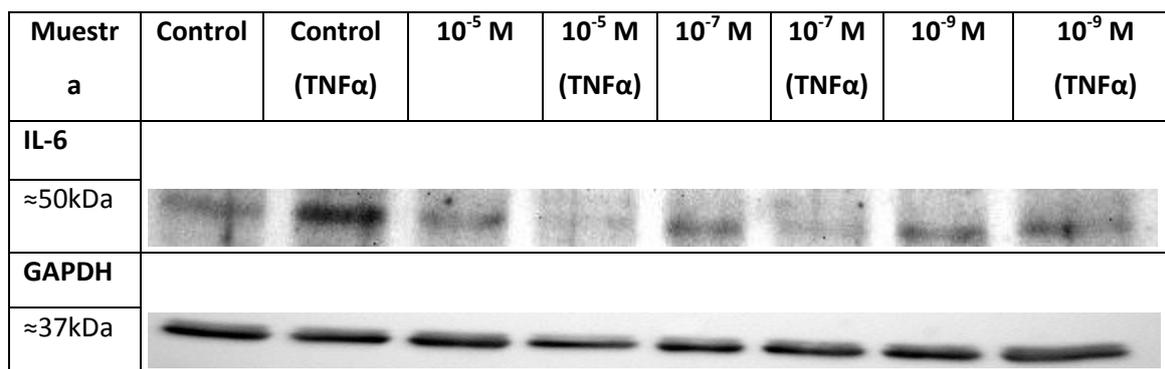


Figura 21: Evaluación de la expresión de IL-6 y GAPDH mediante electroforesis y Western blotting. (TNF α): pocillos donde previamente se ha “inflamado” las células con TNF α . Las concentraciones indicadas hacen referencia a la concentración de DEX en las soluciones de tratamiento. n = 2.

El resultado de realizar el análisis volumétrico de las bandas obtenidas se muestra en la figura 19. En general, comparando los niveles de IL-6 a las 48 horas de los tratamientos con DEX, bien secretados (figura 20 C) o bien internos (figura 22) no se detectaron diferencias. Los niveles obtenidos en los controles y en los tratamientos con 10⁻⁵ M de DEX, fueron muy similares. Sin ser lo esperado, en los pocillos donde no se había aplicado el modelo de inflamación (sin TNF α) pero sí el tratamiento con 10⁻⁷ M y 10⁻⁹

M de DEX se obtuvieron valores de producción de IL-6 mayores frente a los tratados con TNF α correspondientes.

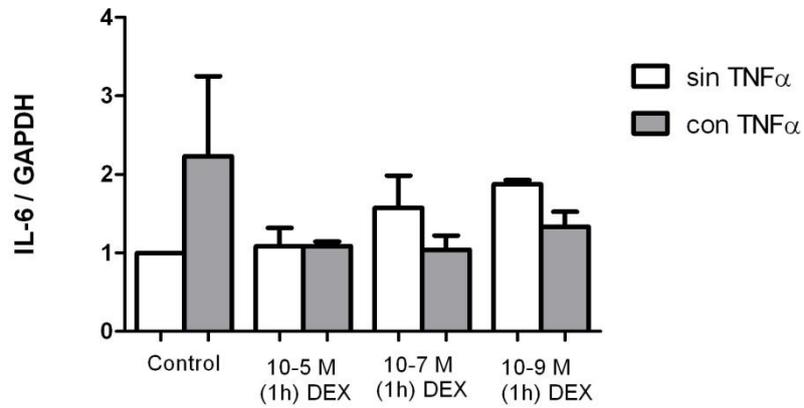


Figura 22: Gráfico que representa los niveles de expresión de IL-6 tras el análisis volumétrico de las bandas obtenidas mediante electroforesis y Western blotting, normalizados con la expresión de GAPDH. n = 2.

FASE III: Evaluación del efecto antiinflamatorio *in vitro* de las formulaciones liposomales en estudio

5.7. Estudio de viabilidad de las células HCE al ser tratadas con las formulaciones liposomales en estudio

La viabilidad de las células HCE tras 1 hora de contacto con las condiciones empleadas para los estudios de la última fase del trabajo, se mantuvo siempre superior al 80 % (figura 23 A). En cambio, el control positivo de toxicidad (células expuestas a BAC) mostró un porcentaje de toxicidad inferior al 5 % en todos los análisis, como era de esperar.

La viabilidad celular tras el periodo de recuperación de 24 horas en medio de cultivo volvía a ser del 100 % en todos los casos (figura 23 B), excepto en el control positivo con BAC. Esto estaría indicando, del mismo modo que con las formulaciones de la primera fase, que la pequeña reducción en la viabilidad celular observada en la medida inmediata tras la exposición a las formulaciones, era transitoria.

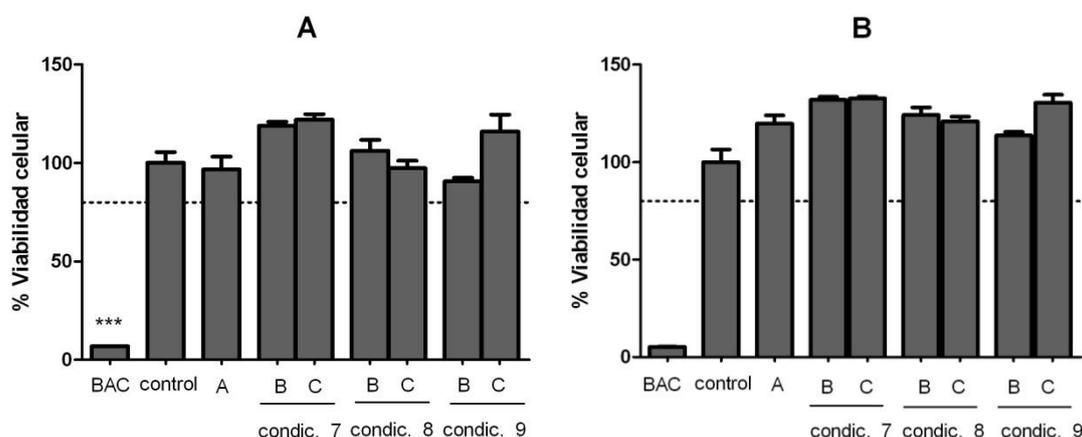


Figura 23: Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular de las HCE tras estar en contacto con las condiciones 7, 8 y 9, que se muestran en la tabla 4, siendo A (tampón hipotónico) común para las 3 condiciones, y B (vehículo blanco, cuya concentración de FC variaba de 10, 5 y 2,5 mg/mL respectivamente para cada condición) y C (liposomas cargados con 5 µg/mL de acMDX, en todas las condiciones) las distintas formulaciones empleadas. Se muestran los resultados en A) inmediatamente después de tratar los cultivos 1 hora de contacto con las formulaciones y en B) tras 24 horas de este tratamiento. n = 1, por quintuplicado. *** $p < 0.001$ entre el control y la condición indicada.

5.8. Evaluación de cambios en los receptores para el acMDX tras el tratamiento con las formulaciones en estudio

Los resultados obtenidos tras someter a las células a un periodo de 24 horas de crecimiento en medio sin suplementos y un posterior tratamiento o no, con la condición 8 (tabla 4, página 38), se muestran en las figuras 24 y 25. Los controles negativos, sin el Ac primario, no mostraron fluorescencia en verde, tal y como era de esperar (datos no mostrados). Sin embargo, sí se observó un cambio en la expresión de ambos receptores, que modificaron su patrón de localización dependiendo de las condiciones a las que se les había sometido.

La figura 24 muestra los resultados obtenidos empleando el Ac anti-receptor de glucocorticoides como Ac primario. De modo cualitativo, se observó marcaje nuclear perteneciente al receptor en todos los casos, comprobado mediante el análisis del eje Z. Se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia tanto citosólica como nuclear al estar en contacto con la formulación B, por lo que algún componente común (de la formulación B y C) ya parece activar este receptor. Por otra parte, tras aplicar la formulación C se observó marcaje casi exclusivamente nuclear, apenas observándose la contratinción nuclear debida a la intensa fluorescencia asociada al receptor.

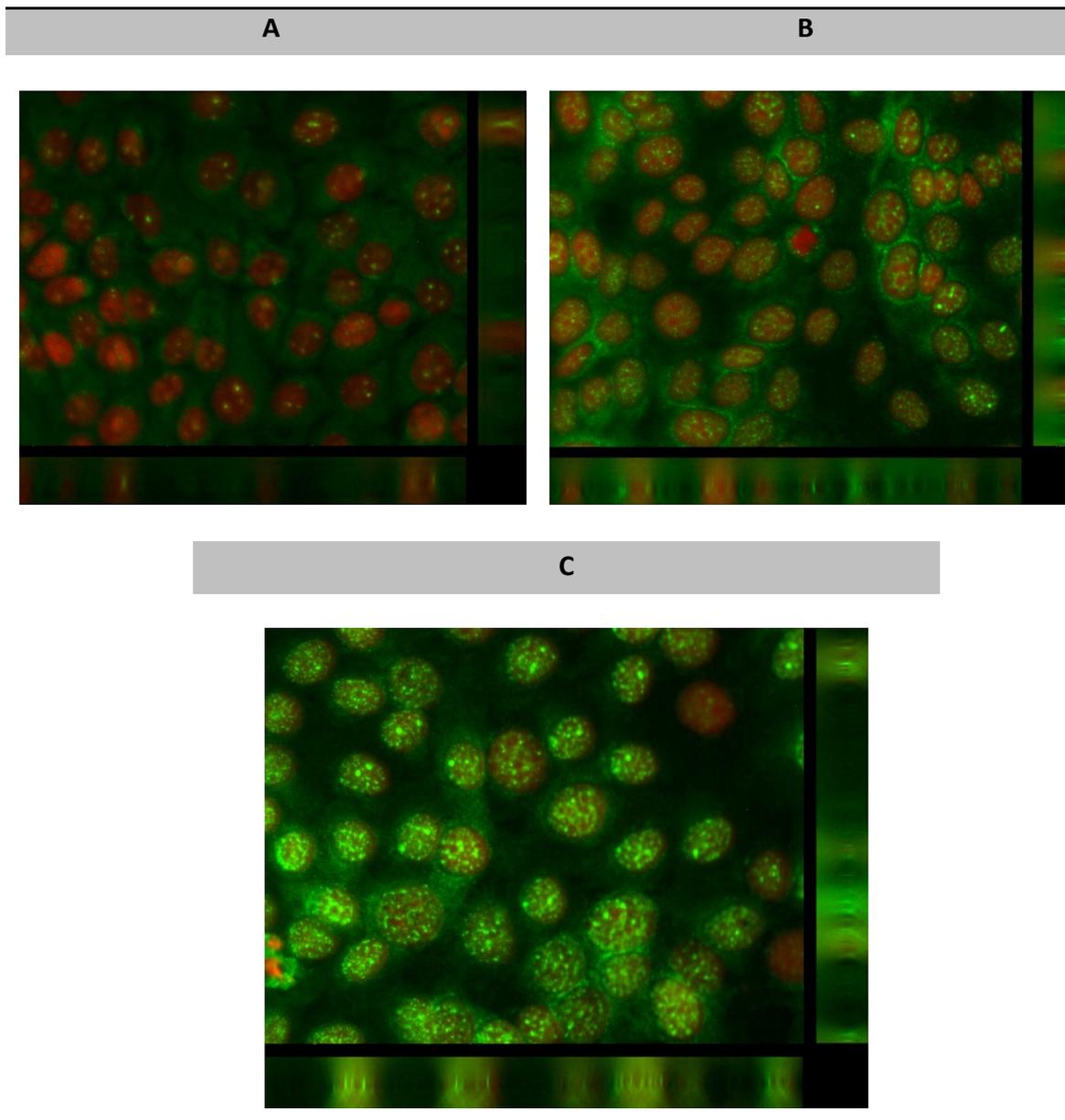


Figura 24: Fotografías representativas a 20 aumentos tomadas de la línea celular HCE, empleando como Ac primario el anti-receptor de glucocorticoides (fluorescencia en verde). Las células crecieron en medio sin suplementos y se les aplicó durante 1 hora: A) ningún tratamiento, B) la formulación B y C) la formulación C. Las imágenes en los ejes de la fotografía principal corresponden al análisis en eje Z. n = 2.

La figura 25 muestra los resultados obtenidos empleando el Ac anti-receptor de progesterona como Ac primario. En general, se observó un menor marcaje nuclear, siendo más intenso el citosólico, comparado con el receptor de glucocorticoides. También se detectó un aumento en la intensidad de fluorescencia tras haber estado en contacto con la formulación C, que contiene acMDX. Es interesante destacar que el

marcaje del receptor se localizaba en zonas perinucleares, especialmente en el caso de las células expuestas a la formulación con acMDX, pudiendo estar relacionado este hecho con algún orgánulo citoplasmático.

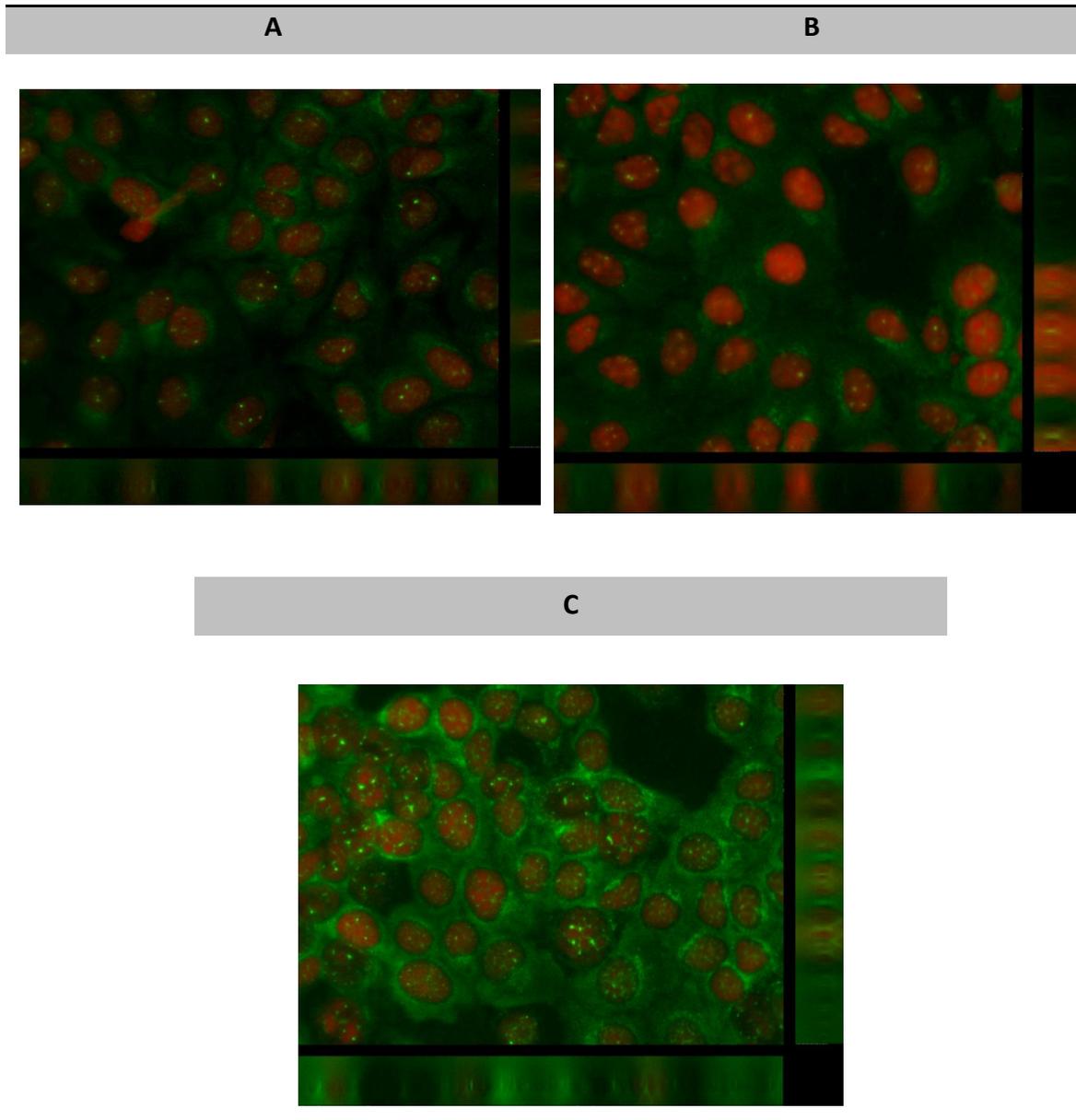


Figura 25: Fotografías representativas a 20 aumentos tomadas de la línea celular HCE, empleando como Ac primario el anti-receptor de progesterona (fluorescencia en verde).

Las células crecieron en medio sin suplementos y se les aplicó durante 1 hora: A) ningún tratamiento, B) la formulación B y C) la formulación C. Las imágenes en los ejes de la fotografía principal corresponden al análisis en eje Z n = 2.

Tras la cuantificación de la intensidad de fluorescencia localizada en el núcleo, se confirmó lo observado en las imágenes de fluorescencia. En cuanto al receptor de

glucocorticoides, los niveles observados de fluorescencia nuclear fueron más del doble de los que se observó en el control. En cuanto al receptor de progesterona, los niveles de fluorescencia nuclear para el control y para B (vehículo blanco) no presentaron diferencias. Sin embargo, se observó que los niveles de la fluorescencia fueron significativamente superiores tras aplicar la formulación C (figura 26).

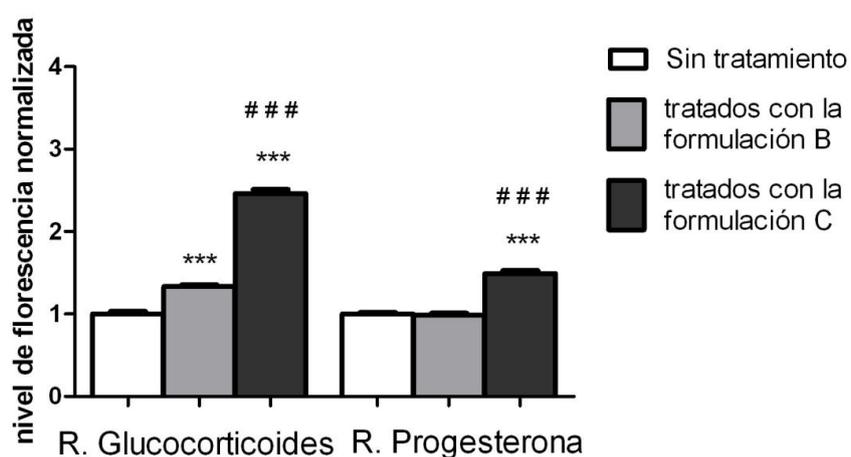


Figura 26: Gráfico que representa la intensidad de fluorescencia localizada en el núcleo perteneciente al receptor de glucocorticoides y de progesterona, tras haber mantenido las células en medio sin suplementos, y haber sido tratadas o no, con las formulaciones B y C. *** $p < 0.001$ entre la condición sin tratamiento y los tratados con B o C ### $p < 0.001$ entre los tratados con B y los tratados con C.

5.9. Detección de la IL-6 tras exponer a las células a tratamientos con las formulaciones liposomales

5.9.1. ELISA

Se evaluó el efecto antiinflamatorio de 3 las condiciones seleccionadas para esta fase del estudio (tabla 4, página 38), tras 24 horas del tratamiento. Al aplicar los antiinflamatorios control se comprobó que la DEX disminuía los niveles de producción de IL-6, como se había comprobado previamente. También se observaba esta tendencia, aunque menos acentuada, con el empleo del Medrivás® (figura 27 A).

Por otro lado, en todas las condiciones de estudio testadas empleando la formulación C, no se vio una reducción de los niveles de producción de IL-6 (figura 17 B-D). Se

observó una tendencia en la formulación B a aumentar los niveles de producción de IL-6 en las células previamente “inflamadas”. Esta tendencia no se observó para la formulación A, lo que podría indicar que sería la concentración de FC : Colesterol : vitamina E la que causara este efecto, componentes que diferencian ambas formulaciones. Estos componentes se encuentran también en la formulación C, por lo que se debería observar esta tendencia en esta formulación también. En cambio, la formulación C, con 5 $\mu\text{g/mL}$ de acMDX en todas las condiciones, no mostró dicha tendencia. Este resultado sugiere una posible influencia del acMDX, el cual estaría disminuyendo los niveles de producción de IL-6, aumentados, supuestamente, debido al empleo de FC : Colesterol : vitamina E.

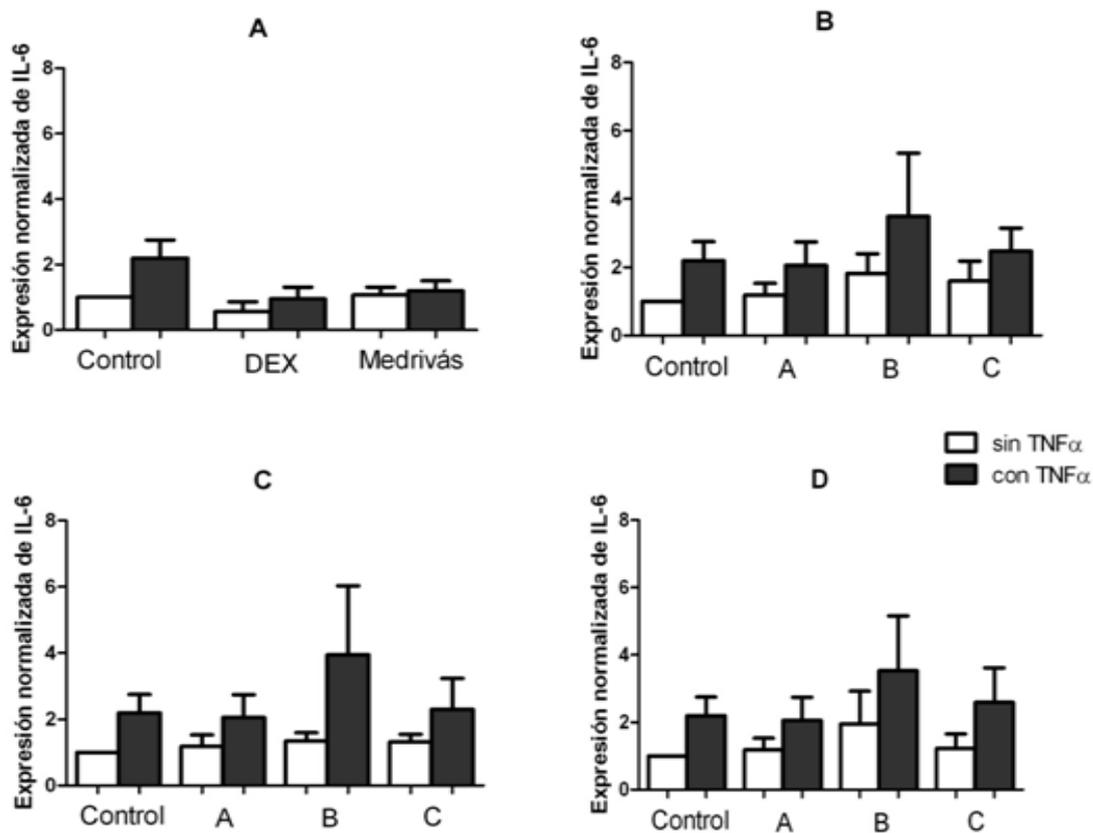


Figura 27 : Gráficas que muestran los valores normalizados de IL-6 obtenidos por ELISA en sobrenadantes de células HCE control o “inflamadas” con TNF α y tratadas durante 1 hora con antiinflamatorios control (A) o las condiciones 7 (B), 8 (C) y 9 (D). En los gráficos B-D, A es el tampón hipotónico, B el vehículo blanco y C liposomas cargados con acMDX. n=3.

6. DISCUSIÓN

Ya desde largo tiempo atrás se emplean liposomas como vehículos seguros en el campo de la oftalmología (Kaur IP *et al.*, 2004). Hay algún ejemplo del uso de estos sistemas de liberación controlada de fármacos para el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias (Diebold Y *et al.*, 2011). Sin embargo, por lo que hemos visto, no hay trabajos publicados empleando liposomas que vehiculicen el acMDX. En nuestro estudio, al emplear estos vehículos, pretendíamos comprobar si se facilita la internalización del acMDX en comparación con la formulación comercial Medrivás®. Debido al tamaño de las formulaciones (aproximadamente 200 nm), los liposomas preferiblemente serán internalizados por pinocitosis o endocitosis mediada por receptor (Rabinovich-Guilatt L *et al.*, 2004). Pero el estudio de las vías de internalización celular para nuestras formulaciones no se ha abordado aún.

En la primera fase del trabajo, se realizó una búsqueda de posibles receptores para la molécula activa (acMDX). De entre los receptores de corticoides, se seleccionó el receptor de glucocorticoides, y como receptores de hormonas sexuales concretas, el de progesterona, por su evidente similitud estructural con esta hormona. Se podía haber testado el receptor de andrógenos (Cops EJ *et al.*, 2008), pero había evidencias previas de la interacción con acMDX por parte de los receptores seleccionados (Ghatge R *et al.*, 2005; Buchanan G *et al.*, 2005), y se consideraron suficientes para este estudio preliminar. Se vio que ambos receptores se expresaban en la línea de epitelio de córnea HCE. Su patrón de marcaje fue citosólico y nuclear, como se esperaba por su modo de acción descrito. Ambos receptores pertenecen a una clase de receptores nucleares que, tras reconocer a su ligando e unirse a éste, sufren un cambio conformacional (dimerización) que los activa para reconocer una secuencia específica de nucleótidos (Denayer S *et al.*, 2010; Frijters R *et al.*, 2010). Estas secuencias específicas de ADN son conocidas como elementos de respuesta hormonal. Cuando los complejos de unión al ADN de los receptores interactúan con él, alteran el nivel de transcripción del gen asociado, dando lugar a una respuesta fisiológica dada. Observar marcaje en el núcleo de las células HCE cuando están en contacto con medio completo significa que estos receptores, debido a su mecanismo de acción, están activados (figura 11, página 54)

Una vez detectados los receptores para el acMDX, se evaluaron las formulaciones liposomales para asegurar la viabilidad celular durante todo el estudio. Siempre se deben realizar pruebas de viabilidad celular previas a otro tipo de estudios, ya que no se tiene una constancia de la tolerancia de las células a formulaciones novedosas, como es nuestro caso. Se decidió empezar con un tiempo de contacto con las formulaciones de 1 hora, ya que en trabajos previos de nuestro grupo de investigación se observó marcaje intracelular a tiempos incluso menores usando otros vehículos liposomales en ensayos *in vitro* (Diebold Y *et al.*, 2007). Tras observar una buena viabilidad celular de las células HCE expuestas a las formulaciones en estudio mediante microscopía de fases y ensayo XTT®, se continuó con los distintos ensayos programados.

Tras decidir emplear 1 hora de contacto, otra variable de estudio fue la concentración de acMDX a partir de la cual podemos valorar mejor el efecto antiinflamatorio en los ensayos *in vitro*. Para determinar qué concentración de acMDX era la más adecuada, se llevó a cabo un estudio de proliferación. Partíamos de la hipótesis de observar un cambio en la proliferación en la línea celular HCE en presencia de acMDX. La proliferación celular es uno de los procesos biológicos que se ve afectado por las hormonas esteroideas (Cops EJ *et al.*, 2008). En ningún caso se observó este posible efecto tras 1 hora de contacto con las formulaciones (figura 14, página 58). Hay que considerar que durante las 48 horas de la primera determinación, las células crecen en medio completo y puede que otros componentes del medio afecten a la proliferación celular en mayor medida que el acMDX, como puede ser el suero (FBS), cuyos componentes y sus concentraciones no son bien conocidos. En cambio, si esto fuera realmente así, todas las células, independientemente de si han estado en contacto con las formulaciones A, B o C, deberían mostrar una curva de proliferación similar a la del control. Como esto no ocurrió, consideramos que este estudio fue útil para observar diferencias entre las condiciones testadas de la tabla 3 (página 37). Puede ocurrir que algún componente de las formulaciones reduzca la proliferación celular, de modo que en las condiciones donde observamos un aumento en la proliferación al emplear la formulación C frente al resto de formulaciones sin acMDX (A o B), podemos estar detectando un aumento en la proliferación debida al acMDX. En la figura 12,

observamos como las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acMDX parecen las más adecuadas, ya que vimos una diferencia con el resto de formulaciones A y B. De entre ambas concentraciones, se seleccionó la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los siguientes ensayos, ya que es similar a la concentración del antiinflamatorio control (DEX) empleada en la segunda fase del trabajo, para la evaluación de su efecto antiinflamatorio *in vitro* (10^{-5} M de DEX corresponde a una concentración de 3.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tras determinar qué concentraciones de acMDX parecían las más adecuadas para ser estudiadas en la siguiente fase, se puso a punto el protocolo para adaptar el modelo *in vitro* de inflamación conjuntival (Enríquez de Salamanca A *et al.*, 2008) a la línea de epitelio corneal humano HCE.

En primer lugar, se realizaron estudios de proliferación con distintos medios de cultivo, con el fin de conocer el medio de cultivo más adecuado en el que mantener las células tras inflamarlas con $\text{TNF}\alpha$. Se añadió el medio completo como un control para observar las diferencias entre la tasa de proliferación de las células creciendo en medio completo y creciendo en ausencia de suero. La ausencia de suero es necesaria para obtener sobrenadantes cuyos componentes no vayan a interferir en posteriores análisis. Tras estos ensayos se determinó emplear el medio completo sin suero para el mantenimiento celular tras aplicar el modelo de inflamación, ya que se obtuvieron mejores resultados en comparación con la tasa de proliferación obtenida si no se adicionaba ningún suplemento al medio de cultivo (figura 16, página 60).

Una vez seleccionado este medio, se realizó un seguimiento de la tasa de proliferación durante las 96 horas que duraba el ensayo. Con estos ensayos iniciales se buscaba conocer la concentración celular a sembrar en las placas de trabajo (24 pocillos), con el fin de asegurar un número de células adecuado para obtener una cantidad de proteína suficiente para ser analizada mediante electroforesis y Western blotting. La curva de proliferación obtenida mostró que, tras las 96 horas, el porcentaje de proliferación celular, tras los cambios observados debidos al empleo del los distintos medios de cultivo, se mantenía similar al inicial (figura 17, página 61). Por otra parte, se observó una mayor tasa de proliferación de las células que habían estado en contacto con el

TNF α . No obstante, las diferencias fueron mínimas, y se reducían a medida que el ensayo avanzaba, por lo que, este hecho no modificó los resultados posteriores.

Se observaron cambios en los niveles de IL-6, nuestra citoquina marcadora de inflamación, de un modo similar a lo observado con la línea derivada de conjuntiva humana (Enríquez de Salamanca A *et al.*, 2008). Tras 24 horas en contacto con 25 ng/mL de TNF α , las células HCE aumentaban la producción de IL-6, en nuestro caso unas 5 veces (figura 18, página 62). Tras haber observado un aumento en la proliferación celular en los pocillos inflamados con TNF α , comprobamos que este hecho no modificaba los resultados obtenidos, ya que la tasa de proliferación era solo, un 10 % mayor, y este hecho no significaba que la mayor producción de IL-6 observada, fuese debida a un mayor número de células.

Se usó la formulación comercial Medrivás® como antiinflamatorio control del estudio, ya que contenía el mismo principio activo, acMDX. Hay que tener en cuenta que el acMDX es considerado un corticosteroide “suave” por lo que su efecto antiinflamatorio, medido como disminución de la producción de IL-6, podría ser menor *in vitro* de lo esperado, no permitiéndonos reconocer su efecto mediante este tipo de pruebas. Por otra parte, su composición difiere mucho de las formulaciones en estudio. El fármaco comercial contiene, entre otros componentes, el conservante BAC. A pesar de esto, se comprobó una buena viabilidad celular tras el tratamiento con la solución preparada con 5 μ g/mL de acMDX empleando el fármaco comercial. Esto puede ser debido a que el Medrivás® se comercializa en una solución concentrada 10.000 veces mayor que nuestra concentración de estudio, por lo que, al diluirlo con el medio sin suplementos, el resto de componentes quedan en una concentración mínima.

Se seleccionó la DEX como otro antiinflamatorio control de nuestras formulaciones para evaluar el efecto antiinflamatorio *in vitro*. La DEX es un corticoide fuerte, y ampliamente estudiado *in vitro* e *in vivo*. Se usaron las concentraciones de 10^{-5} M y 10^{-9} M, que serían empleadas en posteriores análisis, para estudios sobre la viabilidad celular tras exponer a las células a estas soluciones, sin observar ningún cambio.

Se demostró que 1 hora de contacto con la DEX, a cualquiera de las concentraciones testadas (10^{-5} M, 10^{-7} M y 10^{-9} M) era suficiente para observar un efecto antiinflamatorio en las células HCE al cabo de 24 horas. En la literatura se había determinado la disminución de ciertas citoquinas, entre ellas la IL-6, pero siempre con tiempos de contacto mayores de 1 hora (Djalilian AR *et al.*, 2006; Jones LA *et al.*, 20010; Ebihara N *et al.*, 2011). Se seleccionó entonces la concentración de DEX 10^{-5} M por ser la concentración a la que se había observado mayor nivel de reducción de la producción de IL-6. Además, el protocolo para observar un efecto antiinflamatorio y poder analizar los niveles de IL-6, tanto los secretados al medio de cultivo como los intracelulares, finalizaría transcurridas 24 horas del tratamiento, tiempo suficiente para observar el efecto antiinflamatorio y recoger suficiente cantidad de proteína para el análisis. Así, los resultados obtenidos tras 24 horas se pudieron normalizar con los datos obtenidos de cantidad de proteína en las placas, siendo así resultados más precisos, ya que se eliminaría la posible fluctuación en el crecimiento celular por la falta continua de suero y la posible influencia del TNF α .

Una vez determinados los parámetros para la correcta identificación y análisis del posible efecto antiinflamatorio de las formulaciones, se abordó la última fase del trabajo. En ella, tras haber seleccionado la concentración de trabajo del acMDX (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se introdujo una nueva variable de análisis: la concentración de FC. Esto se hizo porque se conoce que la saturación de FC mejora la biodisponibilidad del fármaco, ya que lo protege de las lisozimas propias de la película lagrimal (al-Muhamed J *et al.*, 1996). Aunque nuestro procedimiento *in vitro* no cuenta con la simulación de esta película, nos pareció interesante tener datos sobre cómo afectaba esta variable. Se realizó un estudio de viabilidad celular de las células HCE tras aplicar estas nuevas formulaciones, condiciones de la tabla 4 (página 38), que no se vio alterada.

En primer lugar se determinó si había cierta activación por parte de los receptores tras estar en contacto con la formulación C. Se usaron las células crecidas en medio sin suplementos, para intentar evitar, de algún modo, la activación observada cuando las células crecían en medio completo. Así se pretendía observar si, tras estar en contacto con las formulaciones C, aparecía cierta activación debida a la interacción del acMDX con sus receptores. Los resultados mostraron que el acMDX que contiene la

formulación C interaccionaba con ambos receptores debido a que los dos presentan un nivel de fluorescencia nuclear mayor, más intenso en el caso del receptor de glucocorticoides. La fluorescencia en el receptor de progesterona aumentaba, no solo a nivel nuclear, sino también citosólico, por lo que es necesario un análisis de proteína más profundo para obtener información más precisa sobre la activación de este receptor.

Los últimos experimentos consistieron en aplicar el modelo de inflamación y tratar a estos cultivos “inflamados” con las nuevas formulaciones en estudio y los controles. En todos los casos, el tratamiento con la formulación C no disminuía tanto los niveles de IL-6 como la suspensión comercial de acMDX (Medrivás®), que sí disminuía los valores medios de producción de IL-6 en un nivel inferior a lo observado con la DEX. Se observó también una tendencia a aumentar la producción de IL-6 al aplicar la formulación B en los pocillos “inflamados”. Esto podría indicar que la FC, el colesterol o la vitamina E causara este efecto, ya que no se observó esta tendencia tras aplicar el tratamiento con la formulación A. La formulación con 5 mg/mL de FC (formulación B de la condición 8) mostraba los valores más altos de producción de IL-6. En cambio cabría esperar que los niveles de IL-6 también fueran mayores en promedio aplicando la formulación C, que contiene esos mismos componentes. Pero esto no sucedió así, por lo que el efecto antiinflamatorio del acMDX podría estar enmascarado por un efecto irritativo de la FC, del colesterol o de la vitamina E en estas formulaciones. Es necesario plantear nuevos estudios para confirmar esto.

De forma muy preliminar, se ha visto una tendencia de las formulaciones liposomales que incorporan acMDX a mostrar cierto carácter antiinflamatorio, además de demostrar una activación de los receptores de glucocorticoides y progesterona tras tratar a los cultivos con ellas. Hay que considerar que estos experimentos se realizaron *in vitro*, y que emplearon condiciones muy distintas a las empleadas *in vivo*, por lo que no se puede rechazar completamente que sean eficaces. Un ejemplo de ello es un trabajo publicado en el que se usaron liposomas cargados con aciclovir (Law SL *et al.*, 2000). En él, en los resultados *in vitro* los liposomas cargados positivamente no aumentaban la concentración del fármaco en el humor acuoso de los conejos del estudio, de modo contrario a lo que se observaba en ensayos *in vivo*.

**7. CONCLUSIONES
PRELIMINARES Y
TRABAJO FUTURO**

Conclusiones preliminares

Tras la realización de este trabajo, se presentan las siguientes conclusiones preliminares:

1. Se ha conseguido determinar que la línea celular de epitelio corneal humano HCE expresa los receptores de glucocorticoides y de progesterona, y que estos receptores se activan en esta línea celular, tras 1 hora de contacto con una formulación liposomal que contiene acMDX.
2. Las formulaciones liposomales de acMDX en estudio no alteran ni la viabilidad celular ni la tasa de proliferación de las células HCE.
3. Se ha puesto a punto un modelo *in vitro* de inflamación del epitelio corneal, en el que se consigue un incremento de la producción basal de IL-6 en respuesta al TNF α sobre el que poder testar el efecto antiinflamatorio de diferentes moléculas.
4. Si bien antiinflamatorios como la DEX o el Medrivás® reducen los niveles de IL-6 en el modelo de inflamación *in vitro* de forma efectiva, no se ha conseguido determinar un efecto antiinflamatorio tan claro para las formulaciones liposomales de acMDX que pensamos se puede deber a uno o varios componentes de la formulación (FC, colesterol y/o vitamina E).

Trabajo futuro

- Aumentaremos el tamaño muestral, repitiendo los experimentos más determinantes, para obtener resultados más sólidos desde el punto de vista estadístico.
- Queremos abordar el estudio de los niveles intracelulares de IL-6 tras exponer a las células a las distintas formulaciones seleccionadas para la última fase del trabajo, mediante electroforesis y Western blotting. Si estos resultados confirmasen el aumento de la producción de IL-6 en los cultivos celulares expuestos a la formulación B, se llevaría a cabo un análisis más refinado sobre la posible interferencia de cada componente de esta formulación en los niveles de IL-6. Así estudiaríamos cada componente por separado (FC, colesterol y

vitamina E), para conocer si el efecto de estos componentes enmascara una acción antiinflamatoria real del acMDX añadido en la formulación C.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed I, Gokhale RD, Shah MV, Patton TF. Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera, and cornea. *J Pharm Sci* 1987;76(8):583-6.

Ahmed I, Patton TF. Disposition of timolol and inulin in the rabbit eye following corneal versus noncorneal absorption. *Int J Pharm* 1987;38:9–21.

Ahuja M, Dhake AS, Sharma SK, Majumdar DK. Topical ocular delivery of NSAIDs. *AAPS J* 2008;10(2):229-41.

Albertsmeyer AC, Kakkassery V, Spurr-Michaud S, Beeks O, Gipson IK. Effect of pro-inflammatory mediators on membrane-associated mucins expressed by human ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res* 2010;90(3):444-51.

al-Muhammad J, Ozer AY, Hincal AA. Studies on the formulation and *in vitro* release of ophthalmic liposomes containing dexamethasone sodium phosphate. *J Microencapsul* 1996;13(2):123-30.

al-Muhammed J, Ozer AY, Ercan MT, Hincal AA. In-vivo studies on dexamethasone sodium phosphate liposomes. *J Microencapsul* 1996;13: 293-306.

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(3):614-21.

Araújo J, Gonzalez E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine* 2009;5(4):394-401.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13(1):238-52.

Barcia E, Herrero-Vanrell R, Díez A, Alvarez-Santiago C, López I, Calonge M. Downregulation of endotoxin-induced uveitis by intravitreal injection of polylactic-glycolic acid (PLGA) microspheres loaded with dexamethasone. *Exp Eye Res* 2009;89(2):238-45.

Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 2006;148(3):245-54.

Bochot A, Fattal E, Gulik A, Couarraze G, Couvreur P. Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides. *Pharm Res* 1998;15(9):1364-9.

Bodor N, Buchwald P. Ophthalmic drug design based on the metabolic activity of the eye: soft drugs and chemical delivery systems. *AAPS J* 2005;7(4):E820-33.

Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 2004;78(3):347-60.

Buchanan G, Birrell SN, Peters AA, Bianco-Miotto T, Ramsay K, Cops EJ, Yang M, Harris JM, Simila HA, Moore NL, Bentel JM, Ricciardelli C, Horsfall DJ, Butler LM, Tilley WD. Decreased androgen receptor levels and receptor function in breast cancer contribute to the failure of response to medroxyprogesterone acetate. *Cancer Res* 2005;65(18):8487-96.

Contreras-Ruiz L, de la Fuente M, García-Vázquez C, Sáez V, Seijo B, Alonso MJ, Calonge M, Diebold Y. Ocular tolerance to a topical formulation of hyaluronic acid and chitosan-based nanoparticles. *Cornea* 2010;29(5):550-8.

Contreras-Ruiz L, Schulze U, García-Posadas L, Arranz-Valero I, López-García A, Paulsen F, Diebold Y. Structural and Functional Alteration of Corneal Barrier under Inflammatory Conditions. *Annals in Anatomy* 2012 (submitted).

Cops EJ, Bianco-Miotto T, Moore NL, Clarke CL, Birrell SN, Butler LM, Tilley WD. Antiproliferative actions of the synthetic androgen, mibolerone, in breast cancer cells are mediated by both androgen and progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;110(3-5):236-43.

Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27(7):558-62.

De Laval W, Woyczkowski B, Szulc J, Janicki S. Absorption of chloramphenicol encapsulated in liposomes through cornea of rabbits. *Farmacja Polska* 1992;48:359–361.

Denayer S, Helsen C, Thorrez L, Haelens A, Claessens F. The rules of DNA recognition by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 2010;24(5):898-913.

Diebold Y, Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res* 2010;29(6):596-609.

Diebold Y, Contreras-Ruiz L, Arranz-Valsero I, García-Posadas L. Drug Delivery Systems for Ophthalmic Administration of Antiinflammatory Agents. *Curr Med Chem Anti Inflamm Anti Allergy Agents* 2011;10(3):203-214.

Diebold Y, Jarrin M, Saez V, Carvalho EL, Orea M, Calonge M, Seijo B, Alonso MJ. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes(LCS-NP). *Biomaterials* 2007;28:1553-64.

Djalilian AR, Nagineni CN, Mahesh SP, Smith JA, Nussenblatt RB, Hooks JJ. Inhibition of inflammatory cytokine production in human corneal cells by dexamethasone, but not cyclosporin. *Cornea* 2006;25(6):709-14.

Ebihara N, Ohtomo K, Tokura T, Ushio H, Murakami A. Effect of tacrolimus on chemokine production by corneal myofibroblasts via toll-like receptors, compared with cyclosporine and dexamethasone. *Cornea* 2011;30(6):702-8.

El-Gazayerly ON, Hikal AH. Preparation and evaluation of acetazolamide liposomes as ocular delivery systems. *Int J Pharm* 1997;158:121–127.

Enríquez de Salamanca A, Diebold Y, Calonge M, García-Vazquez C, Callejo S, Vila A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and *in vivo* tolerance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(4):1416-25.

Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, Galatowicz G, García-Vázquez C, Fernández I, Stern ME, Diebold Y, Calonge M. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an *in vitro* model of ocular inflammation. *Cytokine* 2008;44(1):160-7.

Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010;16:862-73.

Frijters R, Fleuren W, Toonen EJ, Tuckermann JP, Reichardt HM, van der Maaden H, van Elsas A, van Lierop MJ, Dokter W, de Vlieg J, Alkema W. Prednisolone-induced differential gene expression in mouse liver carrying wild type or a dimerization-defective glucocorticoid receptor. *BMC Genomics* 2010;5(11):359-373.

Fuentes-Páez G, Herreras JM, Cordero Y, Almaraz A, González MJ y Calonge M. Falta de concordancia entre los cuestionarios y las pruebas diagnósticas en el síndrome de ojo seco. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011;86(1):3-7.

Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res* 2009;26(5):1197-216.

Ghatge RP, Jacobsen BM, Schittone SA, Horwitz KB. The progestational and androgenic properties of medroxyprogesterone acetate: gene regulatory overlap with dihydrotestosterone in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7(6):R1036-50.

Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res* 2004;78(3):379-88.

Hämäläinen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtti A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(3):627-34.

Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez I. Autologous serum in the treatment of dry eye syndrome. Technological aspects. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2008;83(9):521-3.

Herrero-Vanrell R, Rincón AC, Alonso M, Reboto V, Molina-Martinez IT, Rodríguez-Cabello JC. Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release. *J Control Release* 2005;102(1):113-22.

Ionov R, El-Abed A, Goldmann M, Peretti P. Interactions of lipid monolayers with the natural biopolymer hyaluronic acid. *Biochim Biophys Acta* 2004;1667(2):200-7.

Jap A, Chee SP. Immunosuppressive therapy for ocular diseases. *Curr Opin Ophthalmol* 2009;19(6):535-40.

Jones LA, Kreem S, Shweash M, Paul A, Alexander J, Roberts CW. Differential modulation of TLR3- and TLR4-mediated dendritic cell maturation and function by progesterone. *J Immunol* 2010;185(8):4525-34.

Juberías JR, Calonge M, Gómez S, López MI, Calvo P, Herreras JM, Alonso MJ. Efficacy of topical cyclosporine-loaded nanocapsules on keratoplasty rejection in the rat. *Curr Eye Res* 1998;17(1):39-46.

Kaur IP, Garg A, Singla AK, Aggarwal D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *Int J Pharm* 2004;269(1):1-14.

Khalil RM, El-Nahhas SA, Omar SM, El-Ridy MS. Pilocarpine hydrochloride liposomal ophthalmic drug delivery system. *Egypt J Pharma Sci* 1992;33:667-678.

Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol* 2009;147:198-205.

Lange C, Fernandez J, Shim D, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Gipson IK. Mucin gene expression is not regulated by estrogen and/or progesterone in the ocular surface epithelia of mice. *Exp Eye Res* 2003;77(1):59-68.

Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. *J Control Release* 2000;63(1-2):135-40.

Li N, Zhuang C, Wang M, Sun X, Nie S, Pan W. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *Int J Pharm* 2009;379(1):131-8.

McDermott AM, Perez V, Huang AJW, Pflugfelder SC, Stern ME, Baudouin C, Beuerman RW, Burns AR, Calder VL, Calonge M, Chodosh J, Coster DJ, Dana R, Hazlett LD, Jones DB, Kim SK, Knop E, Li D-Q, Mitchell BM, Niederkorn JY, Pearlman E, Wilhelmus KR. Pathways of Corneal and Ocular Surface Inflammation: A Perspective from the Cullen Symposium. *Ocular surf* 2005;3(4):S131-S138.

Mishra GP, Bagui M, Tamboli V, Mitra AK. Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J Drug Deliv* 2011;2011:863734.

Mosallaei N, Banaee T, Farzadnia M, Abedini E, Ashraf H, Malaekheh-Nikouei B. Safety evaluation of nanoliposomes containing cyclosporine a after ocular administration. *Curr Eye Res* 2012;37(6):453-6.

Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999;19:201-11.

Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five-year review. *Cornea* 2000;19(5):644-9.

Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol* 2004;137(2):337-42.

Rabinovich-Guilatt L, Couvreur P, Lambert G, Dubernet C. Cationic vectors in ocular drug delivery. *J Drug Target* 2004;12(9-10):623-33.

Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, Barabino S, Schaumberg DA, Dana MR. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Arch Ophthalmol* 2008;126(2):219-25.

Roncone M, Bartlett H, Eperjesi F. Essential fatty acids for dry eye: A review. *Cont Lens Anterior Eye* 2010;33(2):49-54.

Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today* 2008;13(3-4):144-51.

Sandri G, Bonferoni MC, Chetoni P, Rossi S, Ferrari F, Ronchi C, Caramella C. Ophthalmic delivery systems based on drug-polymer-polymer ionic ternary interaction: *in vitro* and *in vivo* characterization. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;62(1):59-69.

Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome *JAMA* 2001;286(17):2114-9.

Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol* 2003;136(2):318-26.

Smolin G, Okumoto M, Feiler S, Condon D. Idoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis. *Am J Ophthalmol* 1981;91(2):220-5.

Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2283-92.

Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and the lacrimal gland. *Cornea* 1998;17(6):584-9.

Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beurman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409-416.

Stern ME, Schaumburg CS, Dana R, Calonge M, Niederkorn JY, Pflugfelder SC. Autoimmunity at the ocular surface: pathogenesis and regulation. *Mucosal Immunol* 2010;3(5):425-42.

Tishler M, Yaron I, Geyer O, Shirazi I, Naftaliev E, Yaron M. Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjögren syndrome. *Ophthalmology* 1998;105(12):2327-9.

Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58(11):1131-5.

Vallelado AI, López MI, Calonge M, Sánchez A, Alonso MJ. Efficacy and safety of microspheres of cyclosporin A, a new systemic formulation, to prevent corneal graft rejection in rats. *Curr Eye Res* 2002;24(1):39-45.

Yanagawa A, Mizushima Y, Komatsu A, Horiuchi M, Shirasawa E, Igarashi R. Application of a drug delivery system to a steroidal ophthalmic preparation with lipid microspheres. *J Microencapsul* 1987;4(4):329-31.

Yoon KC, Jeong IY, Park YG, Yang SY. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea* 2007;26:431-7.

9. ANEXOS

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1: Representación de la unidad funcional lagrimal. Adaptación de Stern ME <i>et al.</i> , 1998.....	13
Figura 2: Estructura molecular del acetato de medroxiprogesterona, donde se observa el anillo de esterano como base de su estructura. Fórmula molecular $C_{24}H_{34}O_4$ y peso molecular 386,52 g/mol (M1629, Sigma-Aldrich).....	16
Figura 3: Representación de la estructura de la película lagrimal. Adaptación de Gipson IK <i>et al.</i> , 2004.....	18
Figura 4: Representación de las posibles estructuras de los liposomas. Adaptación de Mishra GP <i>et al.</i> , 2010.....	20
Figura 5: A) Multilector de placas empleado en modo absorbancia para la determinación de la viabilidad celular. B) Placa de 24 pocillos propia de un ensayo de viabilidad celular empleando el reactivo XTT [®] . Los tonos más intensos indican una mayor viabilidad celular.....	39
Figura 6: Esquema que representa el protocolo del estudio de proliferación tras tratar a los cultivos celulares con las condiciones indicadas.....	41
Figura 7: Esquema que representa los protocolos del estudio de la proliferación celular. En A) para conocer el crecimiento durante 48 horas en medios de cultivo diferentes, tras haber aplicado el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación, y en B) para conocer el crecimiento durante 96 horas, desde el inicio del ensayo, tras haber seleccionado el medio de cultivo más adecuado.....	42
Figura 8: Fotografías de los materiales empleados durante A) la electroforesis y B) la transferencia, en la identificación de proteínas mediante electroforesis y Western blotting.....	46

Figura 9: Placa de 96 pocillos propia del kit comercial para detectar niveles de IL-6 secretados. En las dos primeras columnas se puede observar la curva patrón, con tonalidades decrecientes según la concentración de IL-6 añadida.....49

Figura 10: Evaluación de la expresión de los receptores de glucocorticoides y de progesterona mediante electroforesis y Western blotting. n = 2.....53

Figura 11: Fotografías representativas a 20 aumentos tomadas de la línea celular HCE creciendo en medio completo donde A) es el control negativo (sin emplear Ac primario), en B) se empleó el Ac primario anti-receptor de glucocorticoides (fluorescencia en verde) y C) se empleó el Ac primario anti-receptor progesterona (fluorescencia en verde). n = 2.....54

Figura 12: Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular de las HCE tras estar en contacto con las condiciones 2, 5 y 6 que se muestran en la tabla 3, siendo A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) o C (liposomas cargados con acMDX, en este caso con 0,5 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL de acMDX respectivamente para cada condición) las distintas formulaciones empleadas. Se muestran los resultados en A) inmediatamente después de tratar los cultivos 1 hora de contacto con las formulaciones y en B) tras 24 horas de este tratamiento. n = 2, por quintuplicado. *** $p < 0,001$56

Figura 13: Fotografías representativas de microscopía de contraste de fases a 20 aumentos, tras 1 hora de contacto con las formulaciones A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) o C (liposomas cargados con acMDX) de la condición 5. Las flechas indican cambios en la morfología propia de la línea celular, respecto al control. Tras 24 horas creciendo en medio completo, vuelven a tener una morfología normal.....57

Figura 14: Gráficas de proliferación obtenidas según las distintas concentraciones de acMDX aplicadas, donde A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) o C (liposomas cargados con acMDX), son las distintas formulaciones empleadas. n = 3, por duplicado. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ entre formulación C y control; y # $p < 0,05$ entre C y B.....58

Figura 15: Fotografías representativas de microscopía de contraste de fases a 10 aumentos, de células HCE A) antes de comenzar el ensayo, y tras B) 48 horas y C) 72 horas creciendo en medio sin suplementos. Las flechas señalan las calvas observadas en la monocapa celular.....59

Figura 16: Gráfica de proliferación obtenida durante 48 horas en medios de cultivo diferentes, tras haber aplicado el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación (tiempo 0). n=3, por duplicado. *** $p < 0,001$ entre medio completo sin suero o medio completo y medio sin suplementos.....60

Figura 17: Gráfica de proliferación obtenida durante 96 horas, desde el inicio del ensayo, tras haber seleccionado el medio de cultivo más adecuado para emplear tras aplicar el modelo de inflamación. n=3, por duplicado. *** $p < 0,001$ entre condiciones con TNF α “inflamadas”, y sin TNF α61

Figura 18: Gráfica que muestra los valores normalizados de IL-6 obtenidos en sobrenadantes de células HCE expuestas o no al TNF α mediante la técnica ELISA. El TNF α “inflama” las células produciendo un incremento significativo en la producción de IL-6. n =7, por duplicado *** $p \leq 0,001$62

Figura 19: Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular de las HCE tras estar en contacto con distintas soluciones de antiinflamatorios control. Se muestran los resultados inmediatamente después de tratar los cultivos 1 hora de contacto con las soluciones. n = 1, por quintuplicado. *** $p < 0,001$ entre el control y la condición indicada.....63

Figura 20: Gráficas que muestran los valores normalizados de IL-6 obtenidos por ELISA en sobrenadantes de células HCE expuestas o no al TNF α y tratadas con 3 concentraciones de DEX durante 1 hora. A) Valores tras la hora de tratamiento, B) valores tras 24 horas del tratamiento, y C) valores tras 48 horas del tratamiento. n=2, por duplicado. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ entre el control con TNF α y la condición indicada. # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ entre control sin TNF α y la condición indicada.....65

Figura 21: Evaluación de la expresión de IL-6 y GAPDH mediante electroforesis y Western blotting. (TNF α): pocillos donde previamente se ha “inflamado” las células con TNF α . Las concentraciones indicadas hacen referencia a la concentración de DEX en las soluciones de tratamiento. n = 2.....66

Figura 22: Gráfico que representa los niveles de expresión de IL-6 tras el análisis volumétrico de las bandas obtenidas mediante electroforesis y Western blotting, normalizados con la expresión de GAPDH. n = 2.....67

Figura 23: Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular de las HCE tras estar en contacto con las condiciones 7, 8 y 9, que se muestran en la tabla 4, siendo A (tampón hipotónico) común para las 3 condiciones, y B (vehículo blanco, cuya concentración de FC variaba siendo 10, 5 y 2,5 mg/mL respectivamente para cada condición) y C (liposomas cargados con 5 μ g/mL de acMDX, en todas las condiciones) las distintas formulaciones empleadas. Se muestran los resultados en A) inmediatamente después de tratar los cultivos 1 hora de contacto con las formulaciones y en B) tras 24 horas de este tratamiento. n = 1, por quintuplicado. *** $p < 0,001$ entre el control y la condición indicada.....68

Figura 24: Fotografías representativas a 20 aumentos tomadas de la línea celular HCE, empleando como Ac primario el anti-receptor de glucocorticoides fluorescencia en verde). Las células crecieron en medio sin suplementos y se les aplicó durante 1 hora: A) ningún tratamiento, B) la formulación B y C) la formulación C. Las imágenes en los ejes de la fotografía principal corresponden al análisis en eje Z. n = 2.....70

Figura 25: Fotografías representativas a 20 aumentos tomadas de la línea celular HCE, empleando como Ac primario el anti-receptor de progesterona (fluorescencia en verde). Las células crecieron en medio sin suplementos y se les aplicó durante 1 hora: A) ningún tratamiento, B) la formulación B y C) la formulación C. Las imágenes en los ejes de la fotografía principal corresponden al análisis en eje Z. n = 2.....71

Figura 26: Gráfico que representa la intensidad de fluorescencia localizada en el núcleo perteneciente al receptor de glucocorticoides y de progesterona, tras haber mantenido las células en medio sin suplementos, y haber sido tratadas o no, con las

formulaciones B y C. *** $p < 0.001$ entre la condición sin tratamiento y los tratados con B o C ### $p < 0.001$ entre los tratados con B y los tratados con C.....72

Figura 27 : Gráficas que muestran los valores normalizados de IL-6 obtenidos por ELISA en sobrenadantes de células HCE control o “inflamadas” con TNF α y tratadas durante 1 hora con antiinflamatorios control (A) o las condiciones 7 (B), 8 (C) y 9 (D). En los gráficos B-D, A es el tampón hipotónico, B el vehículo blanco y C liposomas cargados con acMDXl. n=3.....73

Índice de tablas

Pág.

Tabla 1: Algunos de los avances obtenidos mediante la investigación sobre liposomas como vehículos de fármacos en el campo de la oftalmología. Adaptación de Kaur IP <i>et al.</i> , 2004.....	21
Tabla 2: Composición de las formulaciones en estudio facilitadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la UCM.....	36
Tabla 3: Condiciones empleadas en los ensayos de viabilidad celular (condiciones 2, 5 y 6) y proliferación (todas las condiciones). Formulaciones A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) y C (formulación activa) facilitadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la UCM.....	37
Tabla 4: Condiciones empleadas en los ensayos para detectar el nivel de producción de IL-6 tras aplicar el protocolo de simulación de las condiciones de inflamación en las HCE. Formulaciones A (tampón hipotónico), B (vehículo blanco) y C (formulación activa) facilitadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, de la UCM.....	38
Tabla 5: Condiciones y Acs empleados en la inmunodetección por fluorescencia de receptores para el acMDX. *Acs diluidos en tampón de bloqueo, **Acs diluidos en PBS.....	43
Tabla 6: Condiciones y Acs empleados para la detección de proteínas mediante electroforesis y Western blotting. *Acs diluidos en TBS-T con 4 % leche, **Acs diluidos en TBS-T.....	47

Abreviaturas**Ac:** anticuerpo**acMDX:** acetato de
medroxiprogesterona**BAC:** cloruro de benzalconio**BCA:** ácido bicincónico**CHCl₃:** triclorometano**CO₂:** dióxido de carbono**DEX:** dexametasona**DTT:** ditioneitol**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético**EGF:** factor de crecimiento epidérmico**ELISA:** ensayo de inmunoabsorción
ligado a enzimas**FBS:** suero fetal bovino**FC:** fosfatidilcolina**HCE:** epitelio corneal humano**HCl:** ácido clorhídrico**HRP:** peroxidasa de rábano**IL:** interleuquina**Na₃VO₄:** ortovanadato de sodio**NaCl:** cloruro sódico**PBS:** tampón fosfato salino**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo**RIPA:** ensayo de inmunoprecipitación**SDS:** dodecil sulfato sódico**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de
poliacrilamida con dodecil sulfato
sódico**SEM:** error estándar de la media**SO:** superficie ocular**TBS-T:** tampón Tris salino con Tween 20**TNF α :** factor de necrosis tumoral**Tris:** 2-Amino-2-hidroximetil-propano-
1,3-diol**UFL:** unidad funcional lagrimal**XTT:** 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-
sulfonil)-2H-tetrazolio-5-
carboxianilida

