



Universidad de Valladolid

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE OFTALMOBIOLOGÍA
APLICADA**

TESIS DOCTORAL:

**PARTICIPACIÓN DE LA IL-6 Y MOLÉCULAS
RELACIONADAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA
SUPERFICIE OCULAR. CONSECUENCIAS DE SU
SILENCIAMIENTO GÉNICO**

***IL-6 AND RELATED MOLECULES: PHYSIOPATHOLOGY OF THE
OCULAR SURFACE AND CONSEQUENCES OF GENE SILENCING***

Presentada por **Isabel Arranz Valsero** para optar al
grado de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. Yolanda Diebold Luque



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D^a. Yolanda Diebold Luque, con D.N.I. nº 05395644M, investigadora principal del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) y profesora del departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia, de la Facultad de Medicina, como Directora de la Tesis Doctoral titulada "Participación de la IL-6 y moléculas relacionadas en la fisiopatología de la superficie ocular. Consecuencias de su silenciamiento génico", presentada por D^a. Isabel Arranz Valsero, alumna del programa de Doctorado en Ciencias de la Visión, impartido por el IOBA, autoriza la presentación de la misma, considerando que es APTA para su defensa.

Valladolid, 28 de Junio de 2013

El Director de la Tesis,

Fdo.: Yolanda Diebold Luque

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

Institut für Anatomie II, Universitätsstraße 19, 91054 Erlangen

Institut für Anatomie II
Vorstand: Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen

Ansprechpartner:

Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen

Telefon: +49 9131 85-22865

Telefax: +49 9131 85-22862

E-Mail: friedrich.paulsen@anatomie2.med.uni-erlangen.de

CERTIFICATE OF STAY

APPLICANT:

Name: Isabel Arranz
National Identity Card: 71149692-C
Home Institution: University of Valladolid

HOST INSTITUTION:

Name: Friedrich-Alexander University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy
Address: Universitätstrasse 19, 91054 Erlangen (Germany)
Responsible person in the host institution: Prof. Dr. Friedrich Paulsen
Position: Head of Department

This is to certify that Isabel Arranz has stayed in the institution in the following periods:

- from 14.06.2010 to 15.08.2010, in the Martin Luther University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy and Cell Biology; Halle (Saale), Germany.
- from 04.10.2011 to 15.08.2011 and from 25.11.2012 to 08.12.2012, in the above mentioned institution.

Within the framework of a collaboration with the Institute of Applied Ophthalmobiology (IOBA), University of Valladolid (responsible supervisor Dr. Yolanda Diebold), Ms. Isabel Arranz visited our group in the Department of Anatomy in Halle and later in Erlangen, during the above mentioned periods of time. During that time she worked in a joint project (Halle-Valladolid) on the effects of bacterial supernatants stimulation on IL-6 related molecules expression in corneal epithelial cells.

She was a hard working person, full of enthusiasm and highly dedicated to the project. She obtained interesting results which will be the basis of a joint paper from both research groups.

With all best wishes,



Prof. Dr. F. Paulsen

A mi familia.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	V
ACRÓNIMOS/ACRONYMS	IX
FINANCIACIÓN	XIII
RESUMEN Y ORGANIZACIÓN	XV
ENGLISH SUMMARY	1
<i>INTRODUCTION</i>	3
<i>MOTIVATION & ORGANIZATION</i>	14
<i>HYPOTHESES</i>	18
<i>OBJECTIVES</i>	19
<i>METHODOLOGY</i>	20
<i>RESULTS SUMMARY</i>	23
<i>DISCUSSION</i>	29
<i>CONCLUSIONS</i>	45
INTRODUCCIÓN	47
SUPERFICIE OCULAR	49
INFLAMACIÓN	52
IL-6	53
IL-10	56
IL-17	58
SILENCIAMIENTO GÉNICO	60
NUEVAS HERRAMIENTAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN OCULAR	60
TERAPIAS BASADAS EN SIRNA	62
VEHÍCULOS PARA EL MATERIAL GENÉTICO	64
ADMINISTRACIÓN OCULAR DE FÁRMACOS	64
NANOPARTÍCULAS DE ADMINISTRACIÓN OCULAR	65

JUSTIFICACIÓN	69
HIPÓTESIS	75
OBJETIVOS	79
METODOLOGÍA	83
MATERIALES	85
CULTIVOS CELULAR Y BACTERIANO	85
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y ARN	85
SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y TRANSFECCIÓN CON NPs	86
EQUIPAMIENTO	87
MODELOS DE ESTUDIO Y ENSAYOS EN CÉLULAS EPITELIALES DE LA CÓRNEA	88
MANTENIMIENTO	88
MODELO DE INFLAMACIÓN CORNEAL INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A CITOQUINAS	90
MODELO DE HERIDA CORNEAL	90
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN	91
Inhibición de la proliferación con mitomicina C	91
Detección de células proliferativas con EdU	91
Marcaje del citoesqueleto	92
MODELO DE INFLAMACIÓN CORNEAL INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A SOBRENADANTES	
BACTERIANOS	93
Obtención de sobrenadantes bacterianos	93
Estimulación de las células HCE	93
ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LA IL-6 USANDO NPs DE CG	94
Preparación de las NPs	94
Caracterización de las NPs	95
Transfección con las NPs	95
ENSAYO DE VIABILIDAD E INTERNALIZACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	96
TÉCNICAS DE ANÁLISIS	97
DETECCIÓN DE PROTEÍNAS SECRETADAS MEDIANTE ELISA	97
EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN LISADOS CELULARES	98
DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS Y <i>WESTERN BLOT</i>	98
INMUNDETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS Y TEJIDOS FIJADOS	100
Detección de IL-17RA en células estimuladas por sobrenadantes bacterianos mediante inmunofluorescencia	100
Localización ultraestructural del IL-17RA en células expuestas a IL-17A mediante marcaje con inmuno-oro	100

Identificación del IL-17RA en tejidos humanos de la superficie ocular	101
EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN DE ARNm Y SÍNTESIS DE ADN COPIA	101
qPCR	102
TRATAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	102
RESULTADOS	105
MODELO DE INFLAMACIÓN CORNEAL INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A CITOQUINAS	107
EXPRESIÓN DE PROTEÍNA SECRETADA	107
EXPRESIÓN CITOPASMÁTICA DE PROTEÍNA	109
EXPRESIÓN DE ARNm	114
RESUMEN DE RESULTADOS	116
MODELO DE HERIDA CORNEAL	118
VELOCIDAD DE CICATRIZACIÓN EN UN MEDIO PRO Y/O ANTIINFLAMATORIO	118
EXPRESIÓN DE MEDIADORES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA IL-6	121
VELOCIDAD DE CICATRIZACIÓN EN CONDICIONES DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN	122
IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROLIFERATIVAS EN LOS BORDES Y EN ZONAS DISTANTES DE LA HERIDA	125
VALORACIÓN DEL COMPONENTE DE MIGRACIÓN CELULAR EN EL CIERRE DE LA HERIDA CORNEAL <i>IN VITRO</i>	128
MODELO DE INFLAMACIÓN CORNEAL INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A SOBRENADANTES BACTERIANOS	131
<i>IN VITRO BACTERIAL INFLAMMATION MODEL</i>	131
<i>IL-6, sIL-6R AND SGP130 EXPRESSION</i>	131
<i>IL-17A AND IL-17RA EXPRESSION</i>	135
<i>RESULTS SUMMARY</i>	138
<i>IL-17RA IMMUNOLOCALIZATION</i>	139
<i>IL-17RA EXPRESSION IN CELLS EXPOSED TO IL-17A</i>	140
<i>IL-17RA FUNCTIONALITY ASSAY</i>	141
<i>INTERLEUKIN-17RA EXPRESSION IN HUMAN OCULAR TISSUES</i>	141
ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LA IL-6 USANDO NPs DE CG	143
PUESTA A PUNTO DEL SILENCIAMIENTO EN LAS CÉLULAS HCE	143
CARACTERIZACIÓN DE LAS NPs	145
SILENCIAMIENTO DE LA IL-6	145
INTERNALIZACIÓN	146

DISCUSIÓN	149
MODELO DE INFLAMACIÓN CORNEAL INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A CITOQUINAS	151
MODELO DE HERIDA CORNEAL	156
MODELO DE INFLAMACIÓN CORNEAL INDUCIDA POR EXPOSICIÓN A SOBRENADANTES BACTERIANOS	161
ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LA IL-6 USANDO NPs DE CG	166
CONCLUSIONES	171
LIMITACIONES	175
DIVULGACIÓN CIENTÍFICA	177
BIBLIOGRAFÍA	179
ANEXO I/ANNEX I	191

AGRADECIMIENTOS

Una vez leí un proverbio hebreo que dice: *“El que da no debe volver a acordarse, pero el que recibe nunca debe olvidar”*. Aplicándome este proverbio, quiero, desde estas líneas, dar las gracias a quienes me habéis prestado vuestra ayuda en el desarrollo de mi tesis doctoral. Sin embargo, son tantas las personas que, de alguna manera, han contribuido y me han ayudado en esta etapa de mi vida denominada doctorado, que temo olvidarme de alguna.

En primer lugar agradezco a mi directora de tesis, la doctora Yolanda Diebold, la oportunidad ofrecida. Han pasado casi cinco años desde aquel 1 de octubre de 2008 cuando, recién terminada la carrera, empezaba a trabajar en el IOBA, “el sitio ese de los ojos”. Poco a poco, al ritmo de tu batuta, ha ido naciendo esta obra en la que hoy marcamos la doble barra. Gracias Yolanda por tus consejos y tu ayuda y todas las oportunidades que me has ofrecido de asistencia a congresos y a cursos, de estancias, de publicaciones, etc.

No puedo olvidar la importancia que ha tenido David, próximamente doctor Encinas, en el transcurso de esta tesis, ya que fue él quien me comunicó la vacante para el puesto que más tarde ocupé. Amigo y compañero incansable, anfitrión de mis fines de semana en Santander, debo darte las gracias por compartir conmigo estos duros años, por dejarme tu hombro en los momentos de flaqueza y por intentar animarme contándome tus “fracasos” científicos (y por aprender conmigo a llamarlos “resultados negativos”...).

Remontándome algo más en el tiempo, doy las gracias a mi querida Vero, mi amiga bioquímica, por todo su apoyo. Sin ti no habría podido con el ciclo de Krebs, las enzimas, los canales iónicos... Tú me has enseñado que la ciencia y la investigación son una vocación que, desgraciadamente, parecen no estar al alcance de todos, a pesar de que la entrega sea máxima.

Dicen que los comienzos nunca son fáciles, pero empezar a trabajar en el grupo de superficie ocular, especialmente con el *Capital no humano*, fue como estar entre viejos amigos desde el primer día. Todos y cada uno de vosotros habéis contribuido a que me levantara cada mañana y continuara adelante con la tesis. Solo con vuestra compañía habéis evitado que, en un momento de

duda, renunciara. Porque en ese momento pensaba: “¿dónde voy a encontrar unos mejores compañeros de trabajo que aquí?”.

De todos vosotros, quiero hacer especial mención a alguien que, por su puesto de trabajo así como por su valía como persona, ha influenciado de forma más directa en mi carrera científica. Hablo de la piedra angular de este grupo: Antonio, doctor López para mí, ya que por tu trabajo y entrega esta tesis podría ser tan tuya como mía. Amigo de cotilleos y de reuniones clandestinas (¡y de reuniones sobre ciencia!), apoyo para los pequeños momentos de desesperación y grata compañía en momentos más distendidos. Gracias por todo el tiempo que has invertido en este trabajo, en mí y conmigo. Esta tesis no sería lo que es si no hubiera sido por tu inestimable ayuda. Gracias también a mi pequeño *Nanoteam*: Laura G, Laura S, Mario C; a las supernenas: Sara, Ana, Marina; a los ópticos locos: Toni, Jose, Vicente, Alberto; a mis otros técnicos favoritos: Carmen, Mario M, Esther; a las secres: la inigualable M^a Paz, Lurdes (por esto y por más); a las que se fueron: Laura C, M^a Jesús, Marisa... Por el día a día, amigos, gracias.

A todos los demás miembros del IOBA, que en algún momento habéis interactuado conmigo, quiero agradeceros todas vuestras aportaciones, por pequeñas que fueran. Especialmente al profesor Pastor, sin el cual ninguno de nosotros estaría hoy aquí.

También quiero dar las gracias a la doctora Begoña Seijo y al doctor Alejandro Sánchez por acogerme aquel verano de 2009 en su laboratorio de la universidad de Santiago de Compostela. Gracias a los dos, y también a Jenny, por vuestra paciencia escuchando una y otra vez que “los experimentos no han salido...”, por animarme a seguir intentándolo y por compartir conmigo las alegrías de los pequeños logros dentro de un conjunto para mí, personalmente, bastante frustrante.

(*) Del mismo modo, quiero dar las gracias al doctor Friedrich Paulsen por guiarme en mis tres estancias de investigación en Alemania. Gracias por tu ayuda y tu diligencia y por tu paciencia intentando comprender mi inglés. Y por darme la oportunidad de escribir una tesis con Mención Internacional con una colaboración en dos centros de investigación en ciudades diferentes (¡estupendo para visitar Alemania!). Ni Halle ni Erlangen parecían destinos muy exóticos en un principio, pero la experiencia fue finalmente inolvidable en ambos casos. Gracias sobre todo a mi buena Ute y al pequeño Timur; gracias

por cuidar de mí en un país en el que al llegar no sabía ni pedir el pan y por ser los amigos y la familia que se echan en falta cuando se está lejos del hogar.

() Dear Friedrich, this is specially translated for you. Thank you for your help, your diligence, and your patience doing your best to understand my English. Thank you also for the chance to do an international PhD and a collaboration in two different research groups, in two different towns (wonderful for doing some tourism!). Even if Halle or Erlangen did not seem very exciting destinations at first, the experience was finally unforgettable in both. Danke schön!*

Gracias también a aquellas personas que, desde fuera de este campo, me han mostrado su apoyo: Celia, Daniela, Diego, Elisa, Elvira, Felipe, Irene, Jean, María, Sergio, Sonia,... Aunque no es fácil entender lo que se hace en el laboratorio, siempre habéis preguntado por mi trabajo y mis avances y os habéis preocupado conmigo cuando las cosas no iban tan bien. Gracias chicos, por seguir aguantándome después de tantos años; por ayudarme a desconectar cuando pasaba una mala racha y a mantener los pies en la tierra cuando los experimentos me absorbían; por recordarme que la dedicación al trabajo está muy bien, pero que también está muy bien ir un miércoles cualquiera a las 6 de la tarde a sentarse a una terraza o a escuchar un concierto. *Pour tous ces bons moments: merci beaucoup!*

Ahora, al final de esta etapa, como en cada punto y seguido, aquí está mi familia, apoyándome, animándome, brindándome su incondicional ayuda, corrigiendo mis errores y celebrando mis triunfos. Pero sobre todo, aceptando cada decisión que he tomado. Gracias mami, gracias papi. Haber llegado hasta aquí es un éxito vuestro, no mío. Y además, Inés, mi hermana del alma, quiero dedicarte un agradecimiento muy especial. Por estar siempre ahí, para mí, pasara lo que pasara. Sin vosotros, no lo habría conseguido.

A todos vosotros, GRACIAS.



ACRÓNIMOS/ACRONYMS

Ac/Ab	Anticuerpo	<i>Antibody</i>
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Akt (PKB)	Proteína quinasa B	<i>Protein kinase B</i>
ARN/RNA	Ácido ribonucleico	<i>Ribonucleic acid</i>
ARNi/RNAi	ARN de interferencia	<i>RNA interference</i>
ARNm/mRNA	ARN mensajero	<i>Messenger RNA</i>
BCA	Ácido bicinconínico	<i>Bicinchoninic acid</i>
CD	Cúmulo de diferenciación	<i>Cluster of differentiation</i>
Cfu	Unidades formadoras de colonia	<i>Colony forming units</i>
CG	Gelatina cationizada	<i>Cationized gelatin</i>
CS	Condroitín sulfato	<i>Chondroitin sulfate</i>
Ct	Ciclo umbral	<i>Cycle threshold</i>
EdU	5-etil-2'-desoxiuridina	<i>5-ethyl-2'-deoxyuridine</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFP	Proteína verde fluorescente	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Et	Etilendiamina	<i>Ethylenediamine</i>
FBS	Suero fetal bovino	<i>Fetal bovine serum</i>
FC	Citometría de flujo	<i>Flow cytometry</i>
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

ACRÓNIMOS/ACRONYMS

GP130	Glicoproteína 130	<i>Glycoprotein 130</i>
HA	Ácido hialurónico	<i>Hyaluronic acid</i>
HBSS	Solución salina balanceada de Hank	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCE	Epitelio corneal humano	<i>Human corneal epithelial</i>
IF	Inmunofluorescencia	<i>Immunofluorescence</i>
IG	Inmuno-oro	<i>Immuno-gold</i>
IHC	Inmunohistoquímica	<i>Immunohistochemistry</i>
IL	Interleuquina	<i>Interleukin</i>
JAK	Quinasa Janus	<i>Janus kinase</i>
MIP3α	Proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa	<i>Macrophage inflammatory protein-3-alpha</i>
MMC	Mitomomicina C	<i>Mitomycin C</i>
NP	Nanopartícula	<i>Nanoparticle</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Tampón fosfato salino	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase chain reaction</i>
PdI	Índice de polidispersión	<i>Polydispersity index</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
qPCR	PCR a tiempo real semi cuantitativa	<i>Real-time semi-quantitative PCR</i>
R	Receptor (como en IL-6R)	<i>Receptor (as in IL-6R)</i>
RPM	Revoluciones por minuto	<i>Revolutions per minute</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sGP130	Fracción soluble de la GP130	<i>GP130 soluble fraction</i>
sIL-6R	Forma soluble del IL- 6R	<i>IL-6R soluble fraction</i>

siRNA	ARN pequeño de interferencia	<i>Small interfering RNA</i>
SO/OS	Superficie ocular	<i>Ocular surface</i>
SOCS3	Supresor de la señalización de citoquinas-3	<i>Suppressor of cytokine signaling-3</i>
Sp	Espermina	<i>Spermine</i>
Spd	Espermidina	<i>Spermidine</i>
STAT3	Transductor de señal y activador de transcripción3	<i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>
TA/RT	Temperatura ambiente	<i>Room temperature</i>
TBS	Tampón tris salino	<i>Tris-buffered saline</i>
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	Linfocito T colaborador	<i>T helper lymphocyte</i>
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i>	<i>Toll-like receptor</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WB	<i>Western blotting</i>	<i>Western blotting</i>



FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias al apoyo económico recibido de diferentes organismos públicos que han financiado los siguientes proyectos de investigación, en los que he participado como miembro del equipo investigador:

- **Nanopartículas de administración ocular para el silenciamiento de genes implicados en enfermedades inflamatorias oculares mediante ARN de interferencia.** Ministerio de Educación y Ciencia (CICYT MAT2007-64626-C02-01), proyecto coordinado IOBA de la Universidad de Valladolid y Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela.
- **Terapia antiinflamatoria para la superficie ocular mediante silenciamiento genético.** Junta de Castilla y León (SAN673/VA/17/08), proyecto coordinado IOBA de la Universidad de Valladolid y Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela.
- **Acción integrada: Barrera corneal, inflamación y terapia potencial.** Ministerio de Ciencia e Innovación, subprograma Acciones Integradas 2009 (DE2009-0085), proyecto coordinado IOBA de la Universidad de Valladolid y Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Universidad de Halle-Wittenberg (Alemania).
- **Combinación de hidrogeles biomiméticos y nanopartículas como plataformas terapéuticas avanzadas para enfermedades oculares.** Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2010-20452-C03-01), proyecto coordinado IOBA de la Universidad de Valladolid, Banco de tejidos, Fundación Clínica San Francisco (León) y Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela.

- **Identificación de dianas terapéuticas para la reparación de la barrera corneal: diseño de una nueva terapia antiinflamatoria.** Junta de Castilla y León, convocatoria de la Consejería de Educación de Subvenciones del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación (VA132A11-2), proyecto coordinado IOBA de la Universidad de Valladolid e Instituto de Anatomía II de la Universidad de Erlangen-Nuremberg (Alemania).

Por otra parte, he recibido la siguiente financiación personal para el desarrollo de esta tesis doctoral y para la asistencia a varios cursos y congresos:

- Ayuda para la contratación de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (PIRTU), de la Junta de Castilla y León (2009-2013), cofinanciado por el Fondo Social Europeo.
- Ayuda para la asistencia a cursos, congresos y jornadas relevantes para el desarrollo de tesis doctorales, de la Universidad de Valladolid (2009), para la asistencia a la “2nd ESF/UB european summer school in nanomedicine”, en Lisboa (Portugal).
- Premio día del IOBA (2009) para la asistencia al “3rd Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules (CDTM) symposium” en 2010, en Cardiff (Reino Unido).
- Ayuda para la asistencia a cursos, congresos y jornadas relevantes para el desarrollo de tesis doctorales, de la Universidad de Valladolid (2010), para la asistencia al curso de capacitación para experimentadores en Ciencias del Animal de Laboratorio, en Salamanca.
- Ayuda para la asistencia a cursos, congresos y jornadas relevantes para el desarrollo de tesis doctorales, de la Universidad de Valladolid (2011), para la asistencia al “Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2011”, en Fort Lauderdale (Florida, EE.UU.).
- Ayuda para la asistencia a cursos, congresos y jornadas relevantes para el desarrollo de tesis doctorales, de la Universidad de Valladolid (2012), para la asistencia al “Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2012”, en Fort Lauderdale (Florida, EE.UU.).

RESUMEN Y ORGANIZACIÓN

Resumen

En este trabajo se ha abordado el estudio de la participación de la IL-6 en diferentes procesos inflamatorios de la superficie ocular. Para ello se han empleado tres modelos de inflamación *in vitro* en células epiteliales de córnea humanas, basados en la estimulación con citoquinas, en la cicatrización y en la estimulación con sobrenadantes bacterianos, respectivamente. Además, se ha propuesto una aproximación terapéutica, basada en el silenciamiento génico, para la reducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias, empleando nanopartículas como vehículo para la administración controlada del siRNA.

Los experimentos llevados a cabo pusieron de manifiesto que las células epiteliales de la córnea humana son capaces de iniciar una respuesta inflamatoria en respuesta a estímulos como IL-6, IL-17 o sobrenadantes bacterianos. Además, se observó que estas estimulaciones actuaban sobre los mediadores de la vía de señalización de la IL-6, produciendo una autorregulación positiva.

En el modelo de herida, las células epiteliales de la córnea experimentaron una cicatrización acelerada en presencia de IL-6, debida tanto al proceso de proliferación como al de migración, que se vio atenuada al coestimular con IL-10. En este trabajo también se ha demostrado por primera vez que el receptor A de la IL-17 se expresa en los tejidos de la superficie ocular humana, con patrones de distribución diferentes según el epitelio considerado.

Por otra parte, se ha comprobado que determinadas nanopartículas preparadas a partir de gelatina cationizada y condroitín sulfato son sistemas eficaces para vehicular el siRNA al interior de las células epiteliales de la córnea. Sin embargo, la aproximación terapéutica basada en el silenciamiento de citoquinas proinflamatorias mediante siRNA necesita ser reconsiderada.

Organización

Este trabajo de tesis opta a la Mención Internacional en el Título de Doctor. Por lo tanto, su organización se ajusta a lo requerido por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Valladolid. Además de los habituales apartados de un trabajo científico, la memoria de tesis incluye un resumen en inglés, donde se repasan los antecedentes, se justifica la unidad temática del trabajo, se presentan las hipótesis de trabajo y los objetivos perseguidos, se resumen la metodología empleada y los resultados obtenidos, y se exponen su discusión y las conclusiones alcanzadas. Además, la parte del trabajo correspondiente a los resultados de los experimentos que se realizaron en colaboración con los grupos de investigación del Dr. Bernd Fischer de la Universidad de Halle-Wittenberg y el Dr. Friedrich Paulsen de la Universidad de Erlangen-Nuremberg, ambas en Alemania, se han redactado por completo en inglés. Los resultados correspondientes a esta parte han dado lugar a una publicación (Arranz-Valsero y cols., 2013), que se adjunta como Anexo I al final de la memoria de tesis (página 191).

Los apartados de Metodología, de Resultados y de Discusión se han organizado según los cuatro ejes que han constituido este trabajo. En primer lugar se presentan los tres modelos de inflamación propuestos: modelo de inflamación corneal inducida por exposición a citoquinas, modelo de herida corneal y modelo de inflamación corneal inducida por exposición a sobrenadantes bacterianos (siendo este último el apartado al que hace referencia la Mención Internacional). Y por último, se presenta la aproximación terapéutica contra la inflamación en los tejidos de la superficie ocular, basada en una nanomedicina para el silenciamiento génico de la IL-6, diseñada en colaboración con investigadores del grupo NANOBIOFAR, de la Universidad de Santiago de Compostela. Esta organización se resume en el esquema (Figura 1) que aparece a continuación.

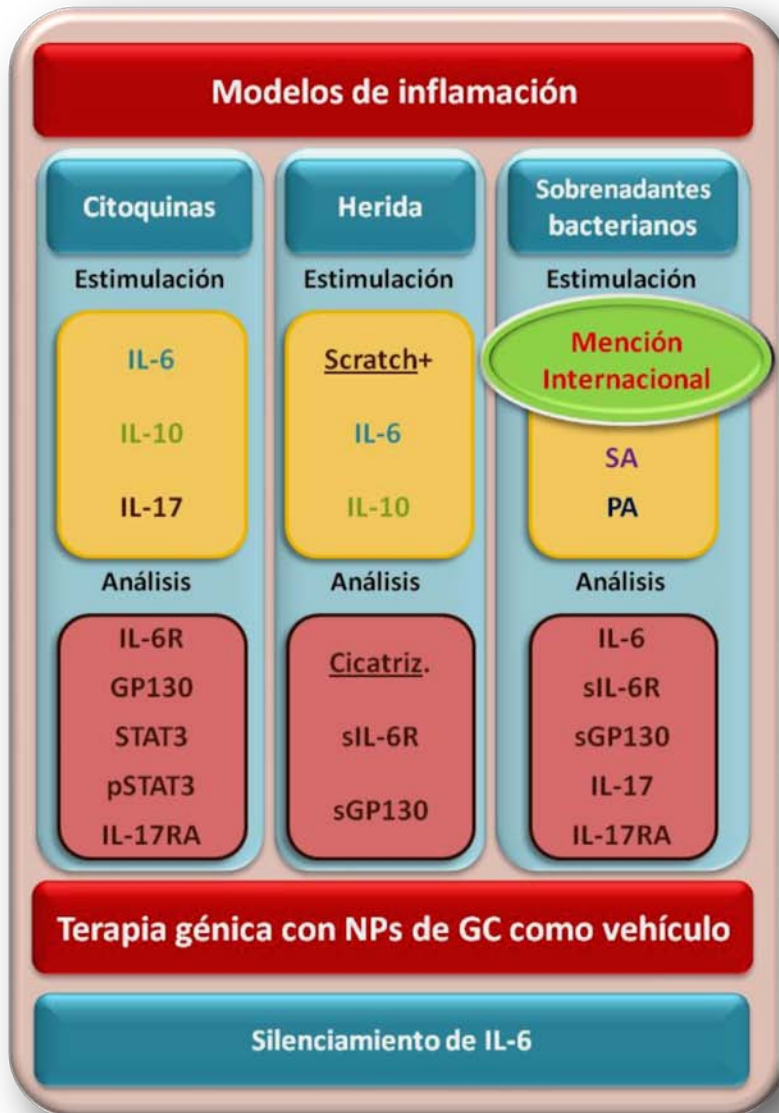


FIGURA 1. Esquema de la organización de la memoria de Tesis.



ENGLISH SUMMARY

INTRODUCTION

Ocular surface

The front part of the eye, known as the ocular surface (OS), is comprised of the cornea, limbus, conjunctiva, and tear film, and is the first barrier between the environment and the inner eye. The cornea has a major role in sight, so besides its protective role, the physical integrity is essential for the maintenance of vision (Figure 1).

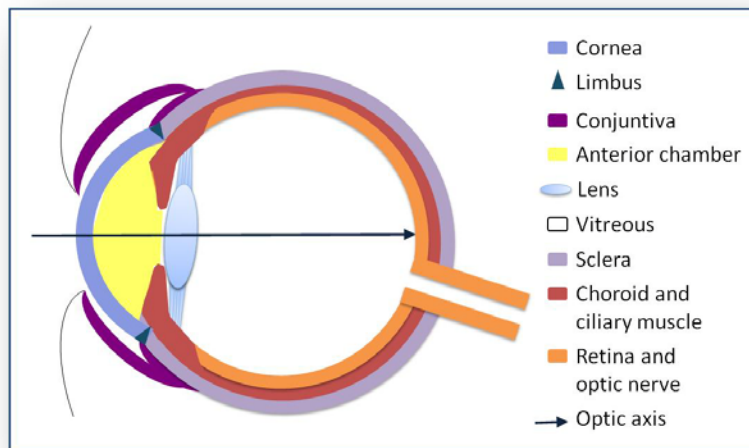


FIGURE 1. Schematic diagram of the eye.

The OS is part of the lacrimal functional unit, along with the lacrimal glands, and the interconnecting nervous, immune, and endocrine systems (Stern et al., 2004). A well-regulated behavior of all the components is essential for the maintenance of OS homeostasis. Damage to any of these components can lead to clinical signs that range from mild, as in seasonal conjunctivitis, to sight-threatening complications, such as vernal keratoconjunctivitis or corneal abrasion (Peate, 2007).

The eye is a very impermeable structure (Urtti, 2006). The structural characteristics of the corneal epithelium increase the difficulty for any topically administered substance to reach the cells inside the eye (Kinoshita et al., 2001).

Moreover, the systemic administration of drugs targeting the eye is hampered by the blood-ocular barrier. However, the ocular mucosa has a great capacity of absorption. Transmucosal administration of ocular drugs offers several advantages, such as greater effectiveness and fewer side effects than systemic administration. Nevertheless, the penetration of topically instilled drugs is limited due to physiological mechanisms, such as blinking and tear clearance, and to the barrier characteristics of the OS. In fact, only a few seconds after instillation, less than 5% of the instilled eyedrops remain available at the OS (Maurice & Mishima, 1984; Keister et al., 1991) (Figure 2).

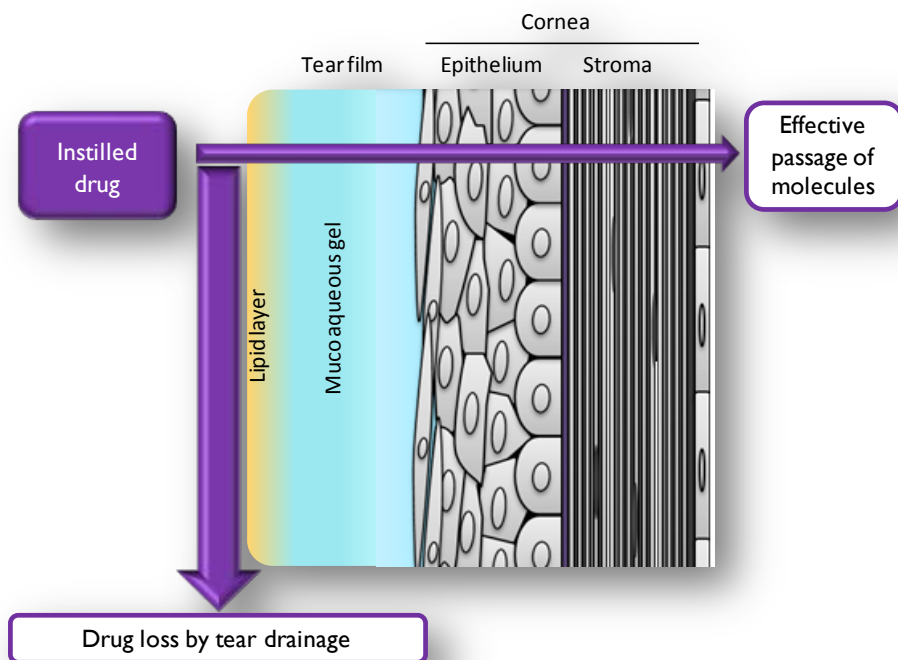


FIGURE 2. The tear film, along with the structure and physiology of the cornea, prevent the penetration of most of the instilled drug. Adapted image from Diebold Y et al., 2010.

This is the main reason why new ways of drug delivery are being tested. Different colloidal systems made from diverse biodegradable materials are being developed as carriers for drugs and other potentially therapeutic molecules to achieve an improved interaction with and delivery through the OS barriers.

Inflammation

Inflammation is a natural process occurring after tissue injury to accelerate tissue regeneration. The inflammation process in the eye occurs in the same way as in the rest of the body in spite of the ocular “immune privilege”. This “privilege” implies the tolerance of the ocular immune system to foreign antigens, thus avoiding the collateral inflammation that is associated with the normal immune response. The inflammatory response in the OS is intended to protect the vision, destroying the agent of the harm, and repairing the damaged tissues. An enhanced inflammatory response can sometimes turn into a pathologic process (Nathan, 2002). This kind of pathology can also affect the ocular surface (Ueta & Kinoshita, 2012).

Ocular inflammation is usually related to an imbalance in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine levels. For example, corneal, limbal, and conjunctival tissue graft rejection involves Th1 cytokines, such as $INF\gamma$ and $TNF\alpha$, that are expressed in the OS of the host and produce an inflammatory state in all the surrounding tissues (Wadia & Tambur, 2008; Romagnani & Crescioli, 2012). For the limbus, which is located at the corneoscleral junction and contains a population of limbal stem cells, half of the allogenic grafts fail, due in part to inflammation caused by an imbalance of cytokines (España et al., 2004). Besides the well-known elements of the immune system, newly discovered participant structures, such as different epithelia and endothelia, have now been identified as important elements of the immune state that determines the success or failure of the OS.

Destabilization of cytokine levels or regulatory factors and the development of chronic inflammation due to autoimmunity or to repeated exposure to an antigen are harmful for the OS tissues. Among OS inflammatory diseases, which affect thousands of people each year, ocular allergy causes–destabilization of Th2 cytokines (Leonardi et al., 2008). Other inflammatory OS diseases are due to bacterial keratitis and corneal ulcers produced by chemical or mechanical damage. *Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infections are frequent causes of bacterial keratitis. Both pathogens usually develop in the extracellular environment of the OS, growing as biofilms on mucous membranes. However, the pathogens can sometimes invade corneal epithelial cells and trigger inflammation (Fleiszig et al., 1994; Fleiszig et al., 1995; Edwards et al., 2010). In some cases, once the infection is controlled, host defense mechanisms may maintain an activated status and contribute to

initiating a chronic inflammatory process. Among the different immune responses, the Th17 pathway is the main one activated during infection by extracellular pathogens (Pappu et al., 2010; D'Elcios et al., 2011).

Cytokines secreted by immune cells or by the infected cells, along with other regulatory, environmental, and genetic factors, participate in the determination of the Th1, Th2, or Th17 immune responses (Liang et al., 2006). In fact, these low molecular weight molecules (from 15 to 30 kDa) are the chemical messengers between activated immune cells and non-immune cells, and are responsible for the regulation of a wide range of physiological mechanisms such as proliferation, gene expression, chemotaxis, apoptosis, etc. An adequate balance in expressed cytokines, assures a good implementation of the immune response and a successful protection against a pathologic situation.

This work focuses on the role of three cytokines: interleukins (IL-) 6, 10, and 17, in different inflammatory situations: cytokine stimulation-based inflammation, wound healing-linked inflammation, and bacterial supernatants exposure inflammation.

IL-6

IL-6 is a multifunctional cytokine related to a wide range of inflammatory conditions in the OS. For example, it is expressed in tears from dry eye patients, and is related to pain, tear film production and stability, and the integrity of the ocular epithelium (Enriquez-de-Salamanca et al., 2010). IL-6 levels have been used as a biomarker of the disease evolution in treated dry eye patients (Turner et al., 2000). IL-6 has a protective role during infection with PA (Xue et al., 2002), and it is also one of the major cytokines responsible for differentiating T helper lymphocytes into Th17 cells (Hohki et al., 2010).

IL-6 signal transduction needs the binding of an IL-6 dimer to two specific transmembrane receptors (IL-6R) and activation of two copies of the transmembrane glycoprotein (GP) 130, leading to their dimerization and hexameric complex formation (Ward et al., 1996). Then, the activated Janus kinases (JAK) self-phosphorylate and induce the phosphorylation of the receptor complex and the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Subramaniam et al., 2013). The activated STAT3 dimers enter the nucleus and operate as a transcription regulator (Yoshimura, 2006; Murray, 2007).

GP130 and STAT3 are widely expressed proteins, but IL-6R expression is limited to hepatocytes and some leukocytes (Tenhumberg et al., 2008). Nonetheless, the immune system can increase the number of potential IL-6 target cells with the IL-6 trans-signaling pathway: IL-6 binds the soluble form of IL-6R (sIL-6R) and transmits the signal through the transmembrane GP130 (Ahmed et al., 2007). The ability of OS cells to produce sIL-6R has been reported (Shoji et al., 2007; Ebihara et al., 2011; Sugaya et al., 2011). On the other hand, GP130 can also be found as a soluble fragment (sGP130). It acts as an IL-6 antagonist by inhibiting the binding of the preassembled IL-6-sIL-6R to the transmembrane GP130, thus effectively restraining IL-6 signaling (Heinrich et al., 1998).

IL-10

IL-10 is a cytokine with an immunosuppressive role in human cells (De Kozak et al., 2002) and develops an immunomodulatory role in ocular inflammatory diseases (Ghasemi et al., 2012). Along with transforming growth factor beta (TGF β), IL-10 limits a broad variety of immune reactions and thus avoids tissue damage. However, while TGF β has a constitutive expression, IL-10 expression is induced by the milieu conditions (Li et al., 2012). The main IL-10 secreting cells are monocytes and macrophages, as well as Th1, Th2, and Th17 lymphocytes (Sabat et al., 2010). It is also produced by dendritic cells, B lymphocytes, and mast cells.

IL-10 production is associated with immune diseases, such as lupus erythematosus, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis (Cobbold et al., 2003). Recently, it has also been associated with ocular inflammation processes (Ghasemi et al., 2012). Low circulating levels of IL-10 are present in autoimmune diseases (Salmaggi et al., 1996), such as Sjögren syndrome (Szodoray et al., 2008), while high circulating levels reduce the risk of diabetic retinopathy in diabetes mellitus patients (Lee et al., 2008). In the eye, higher than normal IL-10 levels have been found in patients with glaucoma (Baudouin et al., 2004), primary intraocular lymphoma (Cassoux et al., 2007), and corneal graft rejection (van Gelderen et al., 2000). In a sheep model of corneal graft, application of IL-10 gene therapy to the OS decreased the rejection risk (Klebe et al., 2001). Additionally, topical treatment with IL-10 improved the recovery of stromal herpetic keratitis patients (Boorstein et al., 1994).

IL-10 signal transduction occurs when an IL-10 dimer binds to the heterodimer transmembrane receptor IL-10R1 and IL-10R2 (Windsor et al.,

1993), also involving the STAT3 mediator. Although IL-10 receptor expression is usually linked to immune cells, a positive effect in the protection of the corneal barrier has been recently found by exposing corneal epithelial cells to IL-10 (Contreras-Ruiz et al., 2012a).

IL-17

IL-17 is the hallmark cytokine of the recently described Th17 cells. Six isoforms are known (IL-17A–F), and the expression varies depending on cell type, tissue, and disease (Kim et al., 2002). Some innate sources of IL-17, such as natural killer and myeloid cells, have been reported (Cua & Tato, 2010) and are thought to act before adaptive immunity takes place. IL-17A (also known as IL-17) is the main cytokine responsible for initiating innate responses against infection by stimulating the production of cytokines, neutrophil chemoattractants, and antimicrobial peptides. IL-17A-producing cells have been identified in the mid-peripheral cornea in a mouse model of dry eye disease (De Paiva et al., 2009). This cytokine is also expressed in corneas from patients with herpetic stromal keratitis (Maertzdorf et al., 2002). However, IL-17A production is usually linked to leukocytes, while IL-17C is linked to epithelial cell host defense, acting in an autocrine manner (Pappu et al., 2012).

IL-17A signal transduction needs at least two receptors, among the five receptors described (IL-17RA–E), but the highest affinity appears with the binding of IL-17A to IL-17RA (Ely et al., 2009; Onishi et al., 2010). IL-17RA is expressed in the majority of human cell membranes (Kramer et al., 2007), e.g., human leukocytes (Thiele et al., 2000; Das Sarma et al., 2009), human bronchial epithelial cells (McAllister et al., 2005), and human corneal fibroblasts (Maertzdorf et al., 2002). However, little is known about IL-17RA within the epithelial cells of the OS. A protective role against bacterial inflammation has been postulated for IL-17 (Cho et al., 2010).

Among other roles, this cytokine increases macrophage inflammatory protein-3-alpha (MIP3 α) expression, a chemoattractant protein with antimicrobial properties, as demonstrated in airway epithelial cells *in vitro* (Kao et al., 2005). However, IL-17 and other Th17-related molecules may also be responsible for the pathogenesis of disease (Nakae et al., 2003; Yu et al., 2007; Gaffen, 2008). For example, in dry eye disease, IL-17 is related to an increase of pro-inflammatory factors and OS dysfunction (de Paiva et al., 2009).

Gene silencing

New tools for the treatment of ocular inflammation

A great number of OS inflammatory diseases are based on pro-inflammatory cytokine overexpression. Thus, a novel therapeutic approach to treat ocular inflammatory processes is to avoid the overexpression of these cytokines by blocking the protein or the receptors. The blockade may be accomplished by means of peptides that bind to the receptor, thus preventing the effector molecule from reaching it. Therefore, the signaling cascade will not take place, and the inflammation will be stopped. Nonetheless, current treatments for ocular inflammation are not completely specific and present some side effects (Diebold et al., 2011). There is still a great need for developing new therapies for the treatment of ocular inflammatory diseases.

A promising approach to solve that problem is based on the use of the recently described gene silencing technology. Gene silencing can be defined as an RNA interference (RNAi) process that blocks production of the messenger RNA (mRNA) of the targeted gene. This is a regulatory mechanism typical of eukaryotic cells, used as an intracellular defense against exogenous RNAs, such as viral RNAs. The study of this naturally occurring mechanism led to the development of the induced RNAi technique (Leung & Whittaker, 2005). Briefly, the insertion of an exogenous RNA chain restricts the expression of the targeted gene by binding its mRNA by means of base pair complementarity. This binding leads to the degradation of the mRNA through the effector molecules of this pathway: Dicer and RISC complexes. The exploitation of this technology can be adapted to treat inflammation by targeting pro-inflammatory mediators and thus avoiding the translation of genes activated during the inflammatory process.

There are several ways of gene silencing, involving different sorts of RNAi (Scherer & Rossi, 2003; Dorsett & Tuschl, 2004) and different pathways (Figure 3). Among them, RNAi based on small interfering (si)RNA yields the best results (Dallas & Vlassov, 2006). Unlike double stranded (ds)RNA, this molecule eludes the stress response by entering the RNAi pathway further downstream (Caskey et al., 2011; Estornes et al., 2012).

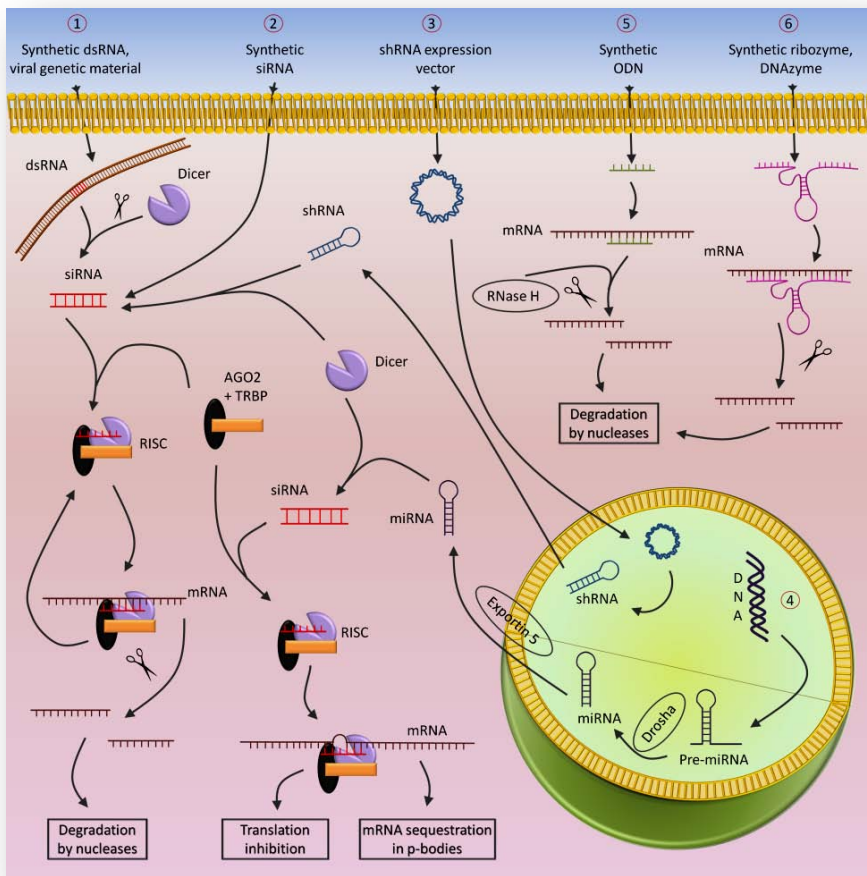


FIGURE 3. Schematic showing the different gene silencing pathways.

siRNA-based therapies

siRNA molecules are double-stranded short RNAs (21-28 base pair ribonucleotides). Thermodynamic stability is enhanced by the presence of two unpaired deoxyribonucleotides in the 3' ending (De Fougères et al., 2007). siRNA has been evaluated as a potential therapeutic agent for a variety of nucleic acid based diseases, such as HIV, hepatitis C, and cancer (Stevenson, 2003; Storvold et al., 2006; Wilson & Richardson, 2006). siRNA specific knockdown is currently being tested for ocular diseases such as diabetic retinopathy and age-related macular degeneration (Reich et al., 2003; Tolentino et al., 2004; Gomes Dos Santos et al., 2005; Hirano et al., 2010). Additionally, there are some studies evaluating siRNA application for the treatment of glaucoma (Mediero et al., 2009; Borrás, 2012).

In most studies, siRNA is delivered using invasive administration routes that are not well tolerated by patients. For example, in ocular diseases, siRNA is directly injected into the anterior chamber (Russell et al., 2006) or to the subconjunctival region (Nakamura et al., 2004). siRNA penetration to the epithelium can also be enhanced by other physical methods, such as electroporation or iontophoresis (Hao et al., 2010). Thus, the method of administration for RNAi-based therapy is a major inconvenience. Some viral vehicles have been tested *in vivo* (Carlson et al., 2004), but this approach involves some ethical and/or medical risks, such as virulence recovery of the viral vector.

There are few studies using siRNA technology delivered by non-invasive or minimally invasive means to the eye. Thus, the main obstacle in the treatment of OS inflammatory diseases with siRNA technology is still the vehicle and the route of administration.

Vehicles for ocular delivery of genetic material

Ocular drug administration

Three main obstacles have restrained the development of safe and effective treatments based on RNAi: side effects, low stability of RNA molecules, and physiological barriers. Therefore, new vehicles for the delivery of nucleic acids, and specifically siRNA, into eukaryotic cells have been developed: transfection agents like lipid formulations (Turchinovich et al., 2010), inactivated viruses (Chen et al., 2009), and nanoparticulate systems (Sánchez & Alonso, 2006) (Figure 4).

Gene therapy agent administration to the ocular tissues includes systemic injection, several forms of ocular injection, and topical instillation (Davies et al., 2003; Conley et al., 2008; Diebold et al., 2011). More than one single dose is needed for gene therapy, as the effects are always transient. Blood-ocular barriers impede the passage of substances from the bloodstream to the eye, and several intraocular injections are usually needed. As this is an invasive and painful way of administration, it is not well tolerated, and patients often abandon the treatment.

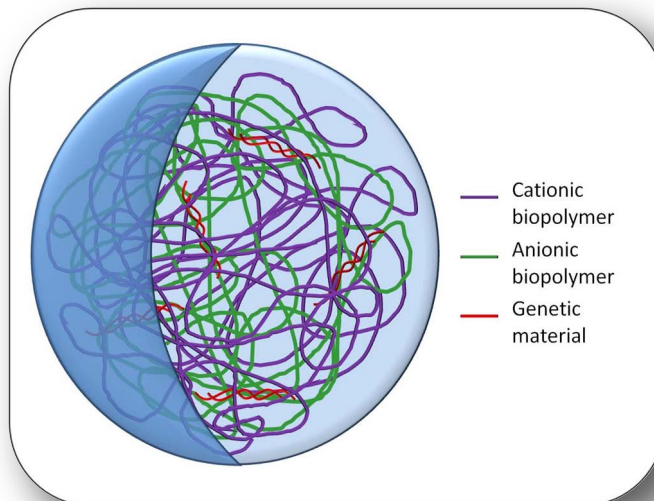


FIGURE 4. Schematic of a nanoparticle with the genetic material entrapped in its core.

Taking this into account, the most suitable way of administering therapeutic genetic material into the eye is by means of topically applied eyedrops. Unfortunately, the physiological barriers of the OS make the entrance of the genetic material to the cell cytosol difficult. Thus, the development of novel and effective vehicles for gene therapy, able to deliver genetic material to the OS cells, is one of the major challenges in this field.

Nanoparticles for ocular administration

Recently, the use of colloidal nanoparticulate systems for the delivery of drugs to the eye have been tested (Sánchez & Alonso, 2006; Diebold et al., 2007; de la Fuente et al., 2008a; Paolicelli et al., 2009). These systems are composed of spherical nanoparticles (NPs) obtained from different biodegradable biomaterials and are below 500 nm in size. The NPs are able to entrap the drug in the polymeric core, and thus act as a delivery vector (Sánchez & Alonso, 2006). Different materials, from biological to metallic, are being tested, but none combines great absorption ability with good biocompatibility and low toxicity.

There are five main characteristics in the development of new NPs for topical delivery of genetic material to the eye: (1) reduced loss by tear drainage to yield higher bioavailability, (2) high tissue specificity to reduced loss in the

transit across tissues, (3) increased bioavailability of the genetic material to improve cellular absorption, (4) protection of the genetic material from cell nucleases, and (5) improved ability to guide the genetic material into the cell nucleus or cytosol (Achouri et al., 2012).

Our research groups have wide experience in the development of biopolymer-based NPs for controlled release of drugs to the eye (Calvo et al., 1997; Alonso et al., 2001; de Campos et al., 2004; de la Fuente et al., 2008b; Konat Zorzi et al., 2011). The use of biopolymers increases the bioavailability and decreases the drug lost by tear drainage. It is also a safe technology (de Campos et al., 2004; Enriquez de Salamanca et al., 2006; Contreras-Ruiz et al., 2010). By slightly modifying the components of the NPs to meet the requirements of the nucleic acids, this technology is useful for the delivery of siRNAs. Hyaluronic acid (HA)-based NPs have proved to be useful in the delivery of nucleic acids to the ocular cells (de la Fuente et al., 2008c; Contreras-Ruiz et al., 2011). However, the advantage of NPs over HA solutions has been questioned (Dyer et al., 2002). Thus, new biopolymers are being tested, such as cationized gelatin (CG) and chondroitin sulfate (CS) (Xu et al., 2008).

Gelatin is a natural protein polymer with the ability to form networks with holes of different size, depending on concentration. It is also able to become a positively charged polymer by adding a polyamine such as spermine, spermidine, or ethylenediamine. The positively charged NPs attract the siRNAs that are negatively charged. On the other hand, CS is a negatively charged sulfated glycosaminoglycan. In the presence of a crosslinking agent, positive and negative polymers, along with the genetic material, will spontaneously form stable NPs (patent P200803136). *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the ability of gelatin-based delivery systems to introduce siRNA in the targeted cells (Matsumoto et al., 2006; Obata et al., 2012; Saito & Tabata, 2012). Until now, this technology has not been tested in siRNA administration through the ocular mucosa.

MOTIVATION & ORGANIZATION

Motivation

The purpose of every treatment against pathologies affecting the OS is the maintenance of sight. The study of the molecular and biochemical processes that take place during pathological situations of the OS is important to better understand the physiopathological mechanisms. This knowledge will allow the establishment of new therapeutic targets and the development of new systems for the treatment of each pathology in a more specific way and with fewer side effects. The knowledge gained through these studies can also lead to the improvement of existing treatments.

In this work, we used *in vitro* models to study the effect of IL-6, IL-17, and IL-10 on the IL-6 signaling pathway in different OS inflammatory processes. Three different models have been used for three different inflammatory situations: (1) ocular chronic inflammation based on dysregulated cytokine expression as occurs in dry eye disease, (2) corneal damage or wound as occurs during surgery or by mechanical or chemical injuries, and (3) bacterial keratitis, which is a common cause of corneal graft rejection.

Corneal damage caused by inflammation, infectious diseases, or injury is the fourth cause of blindness in the world after cataracts, glaucoma and age-related macular degeneration (Resnikoff & Keis, 2012). Sometimes, treatment failure makes a corneal graft necessary. However, this is not a totally safe surgery due to the risk of rejection and the menace of active keratitis (Hackett et al., 2011). Understanding the biochemical processes taking place during inflammatory or infectious keratitis or in corneas damaged by injury could be helpful for a more specific treatment. Also, it may provide different tools to reduce the rejection risk when transplantation remains the only solution to maintain vision.

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine that is acquiring high importance in the understanding of the development of OS inflammatory processes. It has been associated with pain, decreased tear stability, graft rejection, bacterial infections, and autoimmunity, as explained in the Introduction section. This is why the study of the IL-6 signaling pathway is of great importance in the

identification of new therapeutic targets and the establishment of new treatments based on the blocking of this and/or other related molecules.

Additionally, the involvement of IL-6 in the differentiation pathway of the recently described Th17 cells has increased the relevance of this molecule. Moreover, IL-10, which is also one of the molecules considered for this study, is involved in the regulation of the pathogenesis of Th17 cells (McGeachy & Cua, 2008). As shown in Figure 5, higher concentrations of IL-10 limit the development of an immunopathological role of Th17 cells, and thus serve a beneficial regulatory role.

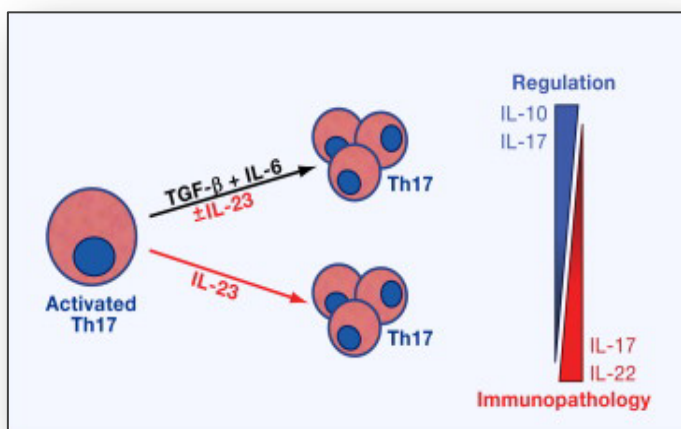


FIGURE 5. Involvement of IL-6, IL-17, and IL-10 in Th17 cells differentiation, clonal expansion, and pathogenesis regulation. From McGeachy MJ & Cua DJ, 2008.

IL-17 expression is generally related to Th17 cells. The ability of corneal epithelial cells to produce IL-17 has not been elucidated so far. The presence of IL-17 receptor A in the other tissues of the OS, e.g., cornea, limbus, conjunctiva, has not been described either.

Although the use of animals often gives a good insight regarding what actually happens in human eyes, in this Thesis work we performed all experiments *in vitro* using human tissues. Because this is a preliminary study with extensive analyses of different situations and molecules, we followed the three “Rs” concept for alternatives to the use of animals in research: reduce, refine, replace. Specifically, we replaced the use of animals by *in vitro* models.

Although *in vivo* models of inflammation already exist (Marquart, 2011), the *in vitro* use of corneal epithelial cells permits the study of the specific contribution of this cell type to the different inflammatory situations under study. A distinct advantage of *in vitro* studies is that they are conducted in a controlled environment that is free of influence and interference derived from other cell types.

In the last part of this study, a novel technology is proposed for the treatment of inflammatory processes of the OS: IL-6 gene silencing. It is based on the topical delivery of siRNA within gelatin-based nanoparticles. There are not many studies using siRNA technology that takes advantage of minimally- or non-invasive administration routes, which are likely to have better acceptance by patients, to treat OS inflammatory diseases. However, good results are being achieved in other fields, such as in the treatment of viral infections (Blake et al., 2012) and in cancer (Bora et al., 2012). These were the reasons that we tried to apply this novel technology to the pathologies of interest for our research group.

With that purpose in mind, we counted on the experience of our research group in the development of NPs for controlled release of bioactive agents across the ocular barriers (Alonso et al., 2001; de Campos et al., 2004; Contreras-Ruiz et al., 2010; Konat Zorzi et al., 2011). This experience has been possible thanks to the collaboration with our colleagues from the group NANOBIOFAR of the University of Santiago de Compostela, that has lasted for more than a decade.

Organization

This Doctoral Thesis applies for the International-awarded Doctorate Degree. It has been organized at the University of Valladolid, under the regulations of the International Doctorate Committee. The joint requirements are as follows: a general summary in English, in which the thematic unit of the work is justified, and the objectives, methodology, results, discussion, and conclusions are presented.

This Thesis report is organized in four sections (Figure 6). The first three sections correspond to each proposed inflammation model: (1) cytokine-stimulated inflammation model, (2) wound healing model, and (3) bacterial supernatants inflammation model. With the third section, in which the experiments were performed during my stay in the research group of Dr. Bernd

Fisher at the University of Halle-Wittenberg and of Dr. Friedrich Paulsen at the University of Erlangen-Nuremberg, this thesis matches the requirements for the International-awarded Doctorate Degree. In addition, the achieved results have been published in Molecular Vision (please, see Annex I, page 191 (Arranz-Valsero et al., 2013)). The last section includes the proposed gene silencing therapeutic approach based on CG-based NPs.

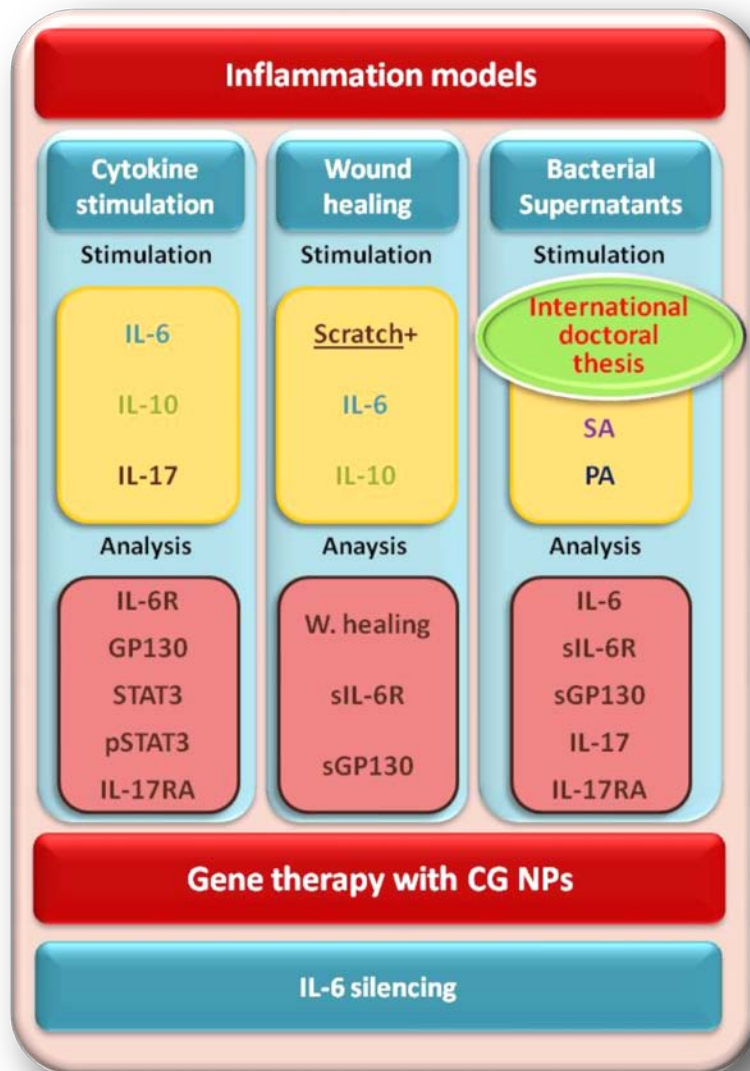


FIGURE 6. Schematic of the Thesis report.

HYPOTHESES

The development of this thesis study was dependent upon the following two hypotheses:

1. The study of IL-6 and related molecules in inflammation-simulating conditions will lead to the identification of molecular changes in human corneal epithelial cells and determine if those changes contribute to the maintenance or regulation of disease pathogenesis.

2. With small interfering RNAs (siRNAs), it is possible to silence cytokines involved in excessive or uncontrolled inflammation of the ocular surface. The development of novel biopolymer-based nanoparticles to deliver the silencing RNAs will improve the internalization and the efficacy of gene silencing.

OBJECTIVES

General objectives

1. Use different *in vitro* models of human corneal epithelial cell inflammation to determine the contribution of IL-6 and related molecules to the OS inflammatory processes.
2. Use novel biopolymer-based nanoparticles as vehicles to deliver siRNAs and silence the expression of cytokines involved in OS inflammatory diseases.

Specific objectives

1. To determine the contribution of IL-6 and molecules of the IL-6 signaling pathway in an *in vitro* corneal inflammation model based on cytokine exposure.
2. To determine the contribution of IL-10 and IL-17 in the expression of molecules of the IL-6 signaling pathway in an *in vitro* corneal inflammation model based on cytokine exposure.
3. To evaluate the effect of IL-6 and IL-10 individually and in combination on epithelial wound healing in an *in vitro* scratch model.
4. To determine whether or not human corneal epithelial cells express Th17-derived cytokines and mediators in response to bacteria-derived stimuli.
5. To determine whether or not human OS normal tissues express the receptor A for IL-17, and verify that it is a functional receptor in a human corneal epithelial cell line.
6. To silence the expression of IL-6 in a human corneal epithelial cell line by using biopolymer-based nanoparticles as vehicles to deliver siRNA.

METHODOLOGY

Four different *in vitro* models were prepared using an immortalized human corneal epithelial (HCE) cell line (Araki-Sasaki et al., 1995). Stimulation conditions, collected samples, techniques, and analyzed molecules for each corresponding model are summarized in Table 1.

TABLE 1. Methodology summary for the four *in vitro* models.

Sample	Technique	Molecules
Cytokine stimulation model		
IL-6 IL-10 IL-17 IL-6 + IL-10 IL-17 + IL-10	Supernatants Protein lysates mRNA	ELISA WB qPCR
		IL-6R sIL-6R GP130 sGP130 STAT3 pSTAT3
Wound healing model		
IL-6 IL-10 IL-6 + IL-10	Supernatants Living cells Fixed cells	ELISA Phase contrast microscopy EdU MMC IF
		sIL-6R sGP130 α -actinin
Bacterial supernatants model		
SA PA	Supernatants Protein lysates mRNA Fixed cells Tissues	ELISA WB qPCR IF IG IHC
		IL-6 sIL-6R sGP130 IL-17 IL-17RA MIP3 α
Gene silencing		
NPs siGAPDH siIL-6a siIL-6c	Supernatants mRNA Cells	ELISA qPCR FC
		GAPDH IL-6

Acronyms: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; WB, Western blotting; qPCR, real-time reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction; EdU, 5-ethyl-2'-desoxyuridine; MMC, mitomycin C; IF, immunofluorescence; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; IG, immune-gold; IHC, immunohistochemistry; FC, flow cytometry.

Cell culture

HCE cells were seeded onto plastic plates or slides and grown until confluence at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 + GlutaMAX-I with the following supplements: 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 10 ng/ml epidermal growth factor, and 5 µg/ml insulin., the following stimulating conditions were applied when the cells were confluent: exposure to cytokines or bacterial supernatant, scratch, or NP transfection. Cells were then maintained in the specific conditions for different times of study depending on each study.

Samples

The following cytokines were used: IL-6 (10 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), and IL-17 (20 ng/ml), and the following combinations: IL-6 + IL-10, and IL-17 + IL-10, in DMEM without supplements. Also, SA and PA supernatants were applied in 1:50 or in 1:100 dilution. Cell culture supernatants were collected and used for ELISA analysis of the following molecules: IL-6, sIL-6R, sGP130, IL-17A, and MIP3α. Cell lysates obtained at the same time points were used for protein determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting (WB) for IL-6R, GP130, STAT3, pSTAT3, and IL-17RA. Other lysates were analyzed for mRNA using real-time, reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for the same molecules. Cold methanol- or 4% paraformaldehyde-fixed cells were used for immunofluorescence (IF) or immuno-gold (IG) microscopy, respectively.

Human tissue samples were obtained from cadaveric donors, fixed in 4% formalin, embedded in paraffin, sectioned (7 µm), and deparaffinized. Non-specific binding was blocked with 5% goat serum in Tris-buffered saline. Then, samples were incubated with primary and secondary antibodies. Samples were incubated with the mix of the Vectastain ABC kit for 30 min and then with 2% diaminobenzidine for 5 min. Nuclei were stained by quickly dipping the slides in hematoxylin.

Scratch assay

We used a scratch assay, based on the model described by Liang et al. (2007). Briefly, two linear scratches were made using a sterile 10 µl pipette tip across each well of confluent HCE cultures, creating a cell-free area. Cultures were gently washed with DMEM to remove loose cells. Cells were maintained in DMEM culture medium supplemented with 1% FBS and with the

corresponding stimulating conditions. Immediately after the scratch and after 4, 8, and 24 h, images of the scratched area were captured using phase contrast microscopy. The remaining scratch wound widths at 6 different points per image were measured.

To determine if the wound closure was related to cell migration or to cell proliferation, two proliferation assays were performed. For the first assay, confluent cells were treated with mitomycin C (MMC) 16 h prior to the scratch assay. The experiment was then carried out as described above. In the other assay, cells were incubated with the thymine analogue EdU (10 μ M) for fluorescence detection of proliferative cells. Fluorescence was detected with a Click-iT EdU Alexa-Fluor647 image kit, following the manufacturer's instructions. In the same samples, the cytoskeleton was imaged by immunofluorescence detection of α -actinin or by exposure to phalloidin.

Transfection with NPs and siRNA

NPs were prepared by the slightly modified ionotropic gelation technique developed by Calvo et al. (1997). NPs were made of cationized gelatin (CG) with spermine (sp), spermidine (spd), or ethylenediamine (et). To compensate the positively charged polymer, chondroitin sulfate (CS) or hyaluronic acid (HA) was added. Spermidine used as crosslinking agent was denoted as SPD. The following combinations were used to make the corresponding NPs: GCsp/CS:SPD (NP "X"), GCspd/HA:SPD (NP "Y"), and GCet/CS:SPD (NP "Z").

The NPs were assayed as vehicles to deliver the siRNAs targeting IL-6. Two commercially validated siRNA sequences were tried for IL-6 silencing: "a" and "c". Briefly, confluent cells were exposed to siRNA-loaded NPs for 3 h. Next, the remaining NPs were washed away with phosphate buffered saline (PBS), and the cells were maintained in normal conditions for 48 h. Cell culture supernatants were then collected and cell lysates obtained. Internalization efficiency and cell viability were assessed using flow cytometry (FC) with a FITC-linked polymer and an Annexin-V-APC + Propidium iodide commercial kit.

Statistical analysis

Data were calculated as means \pm standard error of the mean. A two-way ANOVA was used to compare multiple groups, followed by Bonferroni test. The Student *t* test was used in the bacterial supernatants-stimulation model. In the scratch model, a two-factor design of experiment method, followed by Levene test was applied. A value of $p \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS SUMMARY

Results obtained in the three inflammation models are summarized separately. The last part of this section presents the results of the silencing experiments.

Cytokine stimulation-based inflammation model

Protein and mRNA expression of IL-6 signaling pathway molecules were evaluated in cell culture supernatants and cell lysates from cytokine-exposed HCE cells. Significant changes compared to control cells are indicated in Table 2 by blue arrows (significant increase) and red arrows (significant decrease), at corresponding time points.

Secreted protein expression was time-dependent in control and in stimulated cells. There were no significant changes in any stimulating condition for sIL-6R or sGP130 when compared to that of controls. However for IL-17-stimulated cells, there was a decreased tendency for sIL-6R secretion at 72 h. Similarly for IL-6-, IL-17-, and IL-17 + IL-10-stimulated cells, there was a decreased tendency for sGP130 secretion at 72 h.

IL-6R expression was significantly higher in IL-17-stimulated cells at 6 h; however in IL-17 + IL-10-stimulated cells at 72 h, it was lower than in control cells. At 6 h, GP130 expression was increased in IL-6-, IL-17-, IL-6 + IL-10-, and IL-17 + IL-10-stimulated cells. At 24 h, GP130 expression was increased in every condition except in IL-6-stimulated cells. At 72 h, GP130 expression was increased in IL-17-stimulated cells.

STAT3 expression was increased in IL-6-stimulated cells only at 72 h. On the other hand, pSTAT3 expression was increased in IL-6- and IL-6 + IL-10-stimulated cells at 6 h. At 24 h, pSTAT3 expression was increased in IL-6-, IL-10-, and IL-6 + IL-10-stimulated cells, and at 72 h the increase was present only in IL-6 + IL-10-stimulated cells.

The qPCR analysis revealed only changes in GP130 mRNA expression, which was decreased in IL-6-stimulated cells at 24 h.

TABLE 2. Results summary of protein and mRNA expression in cytokine-exposed HCE cells.

Analyzed molecules	Stimulating conditions of HCE cells														
	IL-6			IL-17			IL-10			IL-6+IL-10			IL-17+IL-10		
	Protein	mRNA		Protein	mRNA		Protein	mRNA		Protein	mRNA		Protein	mRNA	
IL-6R			↑ at 6 h										↓ at 72h		
sIL-6R		-			-			-			-			-	
GPI30	↑ at 6 h	↓ at 24 h	↑ at 6, 24, and 72 h			↑ at 24 h			↑ at 6 and 24 h				↑ at 6 and 24 h		
sGPI30		-			-			-			-			-	
STAT3	↑ at 72 h														
pSTAT3	↑ at 6 and 24 h	-			-	↑ at 24 h		-	↑ at 6, 24, and 72 h		-			-	

Each column shows protein or mRNA expression in response to the proposed cytokines. Each row shows the studied molecules. Blue arrows, statistically significant increases compared to controls ($p \leq 0.05$); red arrows, statistically significant decreases compared to controls ($p \leq 0.05$). Empty boxes, absence of statistically significant differences. Dashes, assay was not done.

Corneal wound healing inflammation model

Scratched areas had an initial width of $570.57 \pm 5.75 \mu\text{m}$. The rate of wound closure was different depending on cytokine exposure. Immediately after the scratch (T0) and after 4 h (T4), wounds in IL-6-exposed cells were significantly smaller than those of cells exposed to the other conditions ($p \leq 0.05$). Wound width in IL-6- or IL-10-exposed cells, but not in IL-6 + IL-10-exposed cells, was significantly smaller than that of control cells at 8 h (T8) (Figure 7). All wounds were closed after 24 h regardless of the experimental condition.

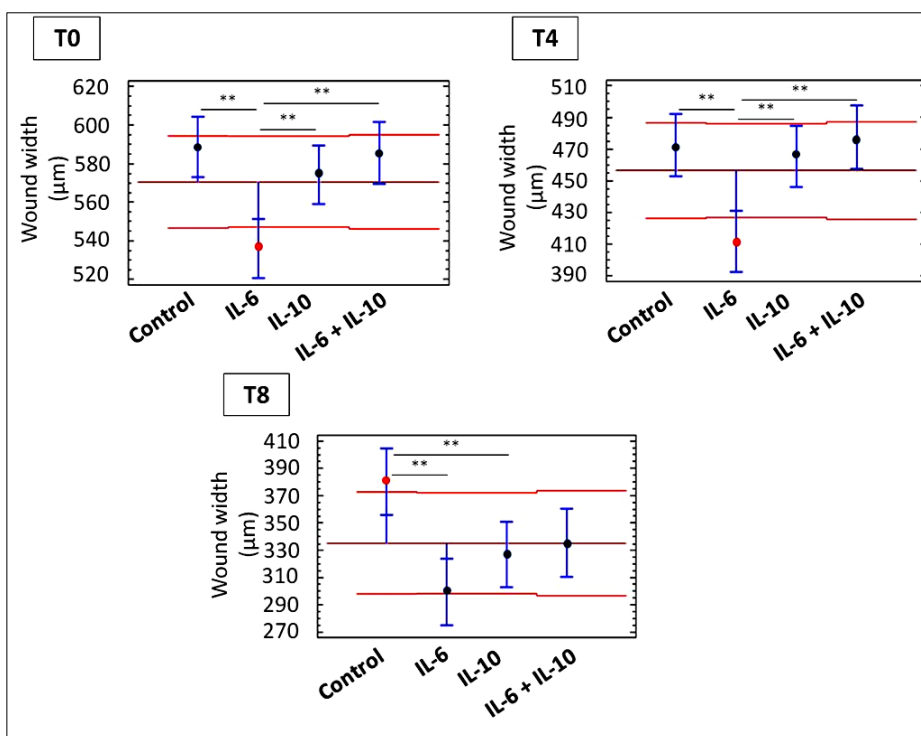


FIGURE 7. Wound width at different time points in cultures exposed to different conditions. Data are expressed as mean \pm SEM. Means located above or under the red bars are significantly different from the total mean (horizontal brown bar) ($p \leq 0.05$). Statistically significant differences between samples are indicated by **($p \leq 0.01$).

The influence of IL-6 and IL-10 on scarring was examined. The analysis of microphotographs revealed no differences among wounds in cells exposed to different stimulation conditions. However, there were differences depending on the initial shape of the scratch. When the scratch was more uniform, then the final wound site was almost imperceptible. In contrast, when the scratch was less uniform, there was a more evident scarring.

sIL-6R and sGP130 expressions were quantified in cell culture supernatants in each condition. There were no significant differences among the different conditions.

Cultures pre-treated with MMC were also scratched, and the wound widths were measured (Figure 8). At T0, there were no differences in wound closure between MMC-treated or untreated cultures. At T4, IL-6-exposed MMC-treated cultures had a significantly higher wound width. At T8, MMC-treated cultures with and without IL-6 exposure had significantly higher wound widths than untreated cells. At 24 h (T24), the scratch in untreated cultures was closed, while in MMC-treated cultures the wound was still open. In MMC-treated cultures, a large number of dead cells was present in the cell-free area at T8 and thenceforth.

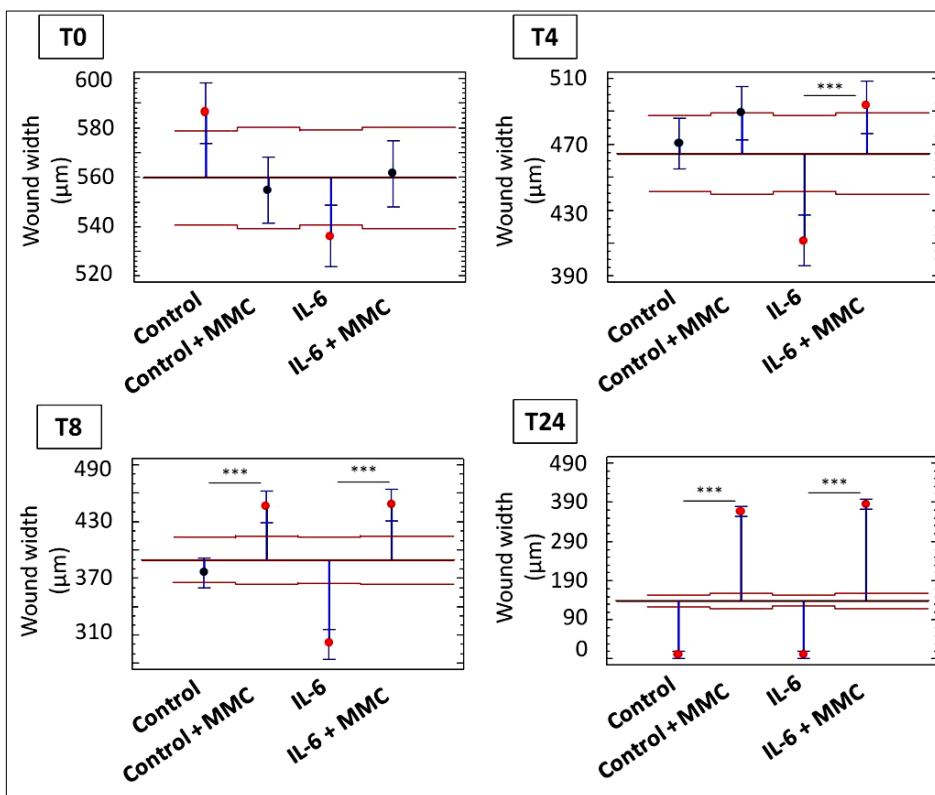


FIGURE 8. Wound width at different time points, in stimulated and control cells, pre-treated or not with MMC. Data are expressed as mean \pm SEM. Means located above or under the red bars are significantly different from the total mean (horizontal brown bar) ($p \leq 0.05$). Statistically significant differences between samples are indicated by ***($p \leq 0.001$).

The percentage of proliferative cells in the scratch borders or in distant areas of the monolayer was quantified through EdU detection. For both, the percentage increased with time in all conditions but was significantly higher in IL-6 + IL-10-stimulated cultures than in control cultures at T8 ($p \leq 0.001$).

Cell migration in the scratch borders was evaluated through cytoskeleton detection with phalloidin or an α -actinin antibody. At 1 h (T1), some actin filaments of non-proliferative cells were directed to the cell-free area, independently of the stimulation conditions. At T4 and T8 a greater number of cells presented actin filaments directed to the scratched area, mostly in non-proliferative cells. However at T8, this phenomenon was also observed in some proliferative cells. There were no differences in cell morphology among the different stimulation conditions.

Bacterial supernatants inflammation model

This part is fully explained in English in a separate section because it is the research work performed outside the University of Valladolid to meet the requirements for the International-awarded Doctorate Degree. Please see page 131, in the Results.

***In vitro* silencing of IL-6 using CG-based NPs**

A first approach to gene silencing was performed in HCE cells with a siRNA targeting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), using either Lipofectamine2000 or JetPEI as commercial transfection agents. siGAPDH, at a concentration of 20 nM, was transfected into HCE cells in complexes with the commercial agents. A reduction of up to 70% of GAPDH expression was obtained at both protein and mRNA levels.

A smaller level of silencing, less than 10%, was obtained with sequences **a** and **c** of siIL-6 when transfected to HCE cells at a concentration of 20 nM in Lipofectamine complexes. Higher concentrations were tried for both sequences, reaching 55% silencing at mRNA level with 160 nM siRNA. Therefore in further experiments, that concentration was used for siIL-6 sequences when transfecting HCE cells with NPs.

Three different kinds of NPs, referred to as NP X, Y, and Z, were used as IL-6-targeted siRNA carriers. The main physicochemical characteristics of these NPs are included in Table 3. It is worth mentioning that the diameter of the NPs was between 250 and 280 nm, making them suitable for transfection without

harming the cells. Also, the electrical charge was not very high, +20 mV, thus reducing the toxicity risk without increasing the likelihood of aggregation.

TABLE 3. Physicochemical properties of the NPs.

NP	Composition	Prot+:Glyc-:CLA	siRNA	Size (nm)	Pdl	ζ potential (mV)
X	GC _{sp} :CS:SPD	6:1:0.4	5%	250 ±30	0.19	+20 ± 3
Y	GC _{spd} :HA:SPD	6:0.7:0.2	5%	270 ±25	0.19	+21 ± 2
Z	GC _{et} :CS:SPD	6:1:0.6	5%	280 ±24	0.12	+21 ± 3

Prot+: cationized protein; Glyc-: negatively-charged glycosaminoglycan; CLA: cross-linking agent. Pdl: polydispersity index. ζ: zeta potential.

The effectiveness of the NPs as vehicles for delivery of siRNAs targeting IL-6 to HCE cells was evaluated. Gene silencing was calculated at protein and at mRNA levels by ELISA and qPCR analysis, respectively. For the IL-6 protein, the best silencing level, 26.6%, was obtained with NP X carrying the siIL-6 sequence **a**. For IL-6 mRNA, the best silencing, 16%, was achieved with the same sequence but using the NP Z vector. The same sequence with NP X vector achieved 14% silencing.

NP internalization and cell viability were determined only for NP X by flow cytometry at different time points. The greatest internalization rate was obtained at 3 h of transfection time, with no increase in cell death. The influence of siRNA concentration on the internalization rate was also evaluated. The greatest internalization rate was obtained at a concentration of 160 nM.

DISCUSSION

In this work, we developed three different models of *in vitro* inflammation using a HCE cell line. In each one, the influence of the specific trigger of the inflammatory process on the expression of IL-6 signaling pathway components or Th17 differentiation pathway components was evaluated. Moreover, a preliminary study of IL-6 silencing was performed. The Discussion section is structured in four parts, corresponding to the organization of the Thesis experimental work.

Cytokine stimulation-based inflammation model

The first corneal inflammation model was developed in a similar way to the inflammation model in human conjunctival epithelial cells reported by our group (Enriquez-de-Salamanca et al., 2008). That paper describes changes in the expression levels of different cytokines in a human conjunctival epithelial cell line in response to the exposure to pro-inflammatory molecules. The over-expression of pro-inflammatory factors in tears or at the OS has been related to chronic inflammatory or autoimmune diseases (Leonardi et al., 2008; Romagnani & Crescioli, 2012; Mochizuki et al., 2013). As these diseases are known to degrade the quality of life of the patients, the understanding of the molecular processes occurring during disease progression becomes a topic of great importance.

The selected cytokines were IL-6, a pro-inflammatory cytokine, IL-17, the hallmark cytokine of the Th17 response, and IL-10, a well-known immunomodulatory molecule. To determine the effect of these cytokines in the IL-6 signaling pathway, the expressions of membrane-bound and soluble IL-6 receptor, membrane-bound and soluble GP130, STAT3 and pSTAT3 were quantified.

The levels of secreted protein were not significantly different compared to controls under any condition. However, in IL-17-stimulated cells, IL-6R expression was significantly higher than that in control cells at 6 h. An increase in the receptor expression soon after stimulation could indicate the presence of a positive feedback loop for the Th17 response. For example, increased IL-6R would lead to more IL-6 signaling, which in turn would lead to more Th17 cell

differentiation early in the inflammatory process. An increase of IL-6R expression in CD4+ cells has been related to an increase in Th17 cells in chronic hepatitis B patients (Zhang et al., 2011), but the increase of IL-6R expression in non-immune cells has not been reported yet. On the other hand, the combination of IL-17 + IL-10 produced a decrease in IL-6R expression, suggesting a regulatory role of IL-10 when combined with IL-17.

GP130 expression patterns in different stimulating conditions are described in Figure 9. IL-6 produced an early increase in GP130 expression. IL-10 also produced an increase in GP130 expression, later in time. The stimulation with a combination of both revealed a GP130 increase similar to the individual levels of stimulation. IL-17 stimulation induced an early increase of GP130, sustained in time. The role of IL-10 as a positive regulator of GP130 via STAT3 has been described in mast cells (Traum et al., 2012). IL-10 signaling involves STAT3 activation, as does IL-6 signaling. Although IL-10 signaling is independent of GP130, the increase of pSTAT3 after IL-10 stimulation would lead to a positive regulation of GP130 expression. However, to the best of our knowledge, IL-17 has not been related to GP130 so far.

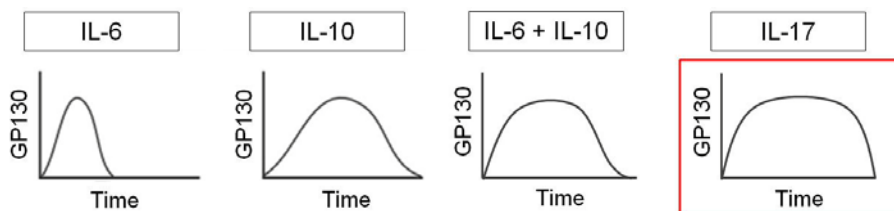


FIGURE 9. Qualitative expression of GP130 over time in different stimulating conditions.

Considering both, the data for protein and mRNA expression, it may seem that they are not consistent with one another. However, the results of protein and mRNA expression give information about different points of the transcription/translation pathway. Thus, the apparent discrepancies could be explained. For example, GP130 mRNA expression decreased at 24 h after IL-6 stimulation, while GP130 protein expression increased in every condition by maintaining constant mRNA levels, except after IL-6 stimulation, which was the only condition that produced a decrease in mRNA levels.

GP130 expression is regulated by SOCS3 protein, which inhibits cytokine signaling via GP130 and the JAK/STAT pathway (Silver & Hunter, 2010). sGP130 is a known antagonist of IL-6 (Heinrich y cols., 1998). In our results, sGP130

expression tended to decrease in IL-6-stimulated cells. These data, along with the decrease in GP130 expression in IL-6-stimulated cells, lead us to think that IL-6 signaling regulation under these conditions is mediated by other kinds of molecules, such as SOCS3. On the other hand, under IL-17 stimulation there was an increase in GP130 expression and a tendency to decrease the sGP130 release. This could be considered as a double positive feedback of IL-17 in the IL-6 signaling pathway.

In tumor cells, IL-17 stimulation has been related to an increase and activation of STAT3 via IL-6 release (Wang et al., 2009; Gu et al., 2011). However, the role of IL-17 in GP130 expression has not yet been elucidated. As long as IL-17 stimulation caused a more time-sustained increase of GP130 expression than IL-6 stimulation, this positive regulation could not occur via IL-6, as previously described for STAT3 in tumor cells (Figure 10).

These results suggest the involvement of GP130 in a new signaling pathway, not yet described, related to the Th17 immune response. The increase provoked by IL-17 stimulation in IL-6R and GP130 expression would allow an enhanced IL-6 signaling reception, and this signal amplification could greatly promote the differentiation and clonal expansion of Th17 cells.

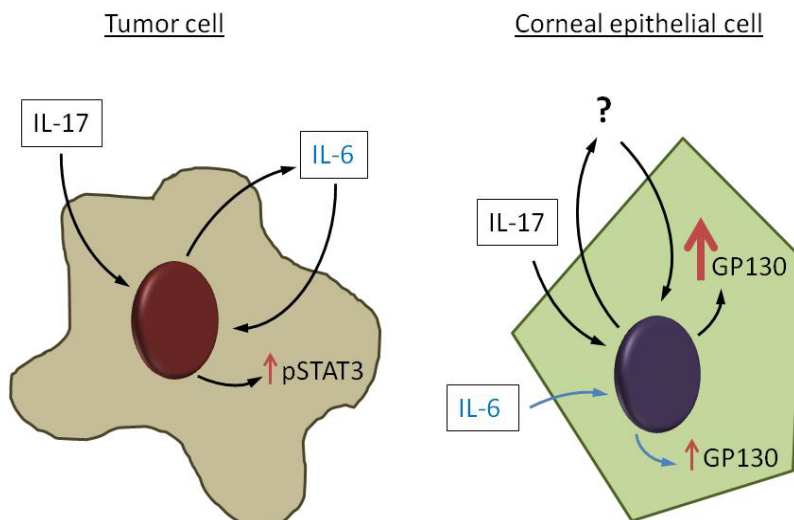


FIGURE 10. Comparison between tumor cell and corneal epithelial cell responses to IL-17 stimulation.

pSTAT3 expression patterns in different stimulating conditions are described in Figure 11. IL-6 produced an early increase in pSTAT3 expression. A

later increase was found with IL-10 stimulation. Besides, there was a synergistic action of the IL-6 and IL-10 combination in terms of pSTAT3 expression. Conversely, following the comparison with tumor cell related pathways, the stimulation with IL-17 did not produce a pSTAT3 increase in corneal epithelial cells.

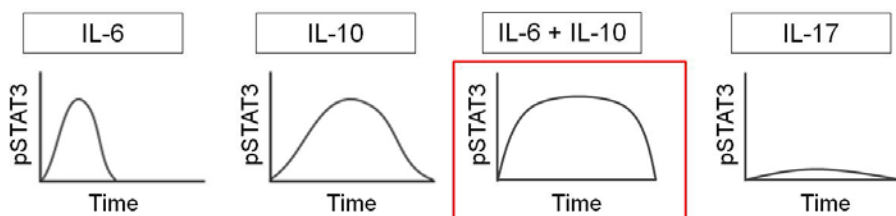


FIGURE 11. Qualitative expression of pSTAT3 over time in different stimulating conditions.

We consider that the most relevant findings from this section are the following:

1. IL-6 stimulation led to an increase in the expression of mediators of its signaling pathway, producing a positive feedback loop.
2. IL-17 stimulation led to an early increase in IL-6R expression and a sustained increased expression of GP130.
3. IL-6 + IL-10 stimulation led to an increase in pSTAT3 expression, a synergistic result compared with the individual level of stimulation.

Wound healing model

The second corneal inflammation model was based on the scratch model described by Liang et al. (2007). This is a model that allows a quantitative evaluation of the wound healing process in epithelial or endothelial cell lines by creating a cell free area, termed the scratch, and measuring the wound healing rate in response to different stimuli.

Corneal injury can happen accidentally or during surgical procedures. Corneal wound healing occurs in a controlled way with the aim of preserving vision. However, an inflammatory process, such as a bacterial infection, or cytokine imbalance can lead to a surgery failure that, in turn, can be sight-

threatening. Actually, elevated levels of IL-6 have been associated with the opacification of the posterior capsule after cataract surgery (Lewis, 2013), one of the most common surgeries in the ocular field.

The expressions of membrane-bound and soluble IL-6 receptor, membrane-bound and soluble GP130, STAT3 and pSTAT3 were quantified. The effects of IL-6, IL-10, and IL-6 + IL-10 stimulation were evaluated. Both IL-6 and IL-10, but not IL-17, have been described as protectors of the epithelial barrier or enhancers of the re-epithelialization (Nakamura & Nishida, 1999; Contreras-Ruiz et al., 2012a).

In our experiments, the mean wound width was around 570 μm . In control conditions, the wound was closed after 24 h. The limitations due to the equipment available did not allow us to evaluate bigger wounds. However, corneal surgical wounds are around 2 mm (Allen et al., 2012), and accidental wounds can be even bigger.

Evaluation of the wound healing rate in different conditions revealed that the fastest wound closure happened with IL-6 stimulation, which is in accordance with previous results using rabbit cells (Nakamura & Nishida, 1999). IL-10 exposure produced a delayed wound closure with respect to IL-6, but faster than control cells. Considering the results of the previous inflammation model, IL-10 probably induced an increase in GP130 and pSTAT3 expression, both of which are mediators of the IL-6 signaling pathway. Thus, the increase in these mediators would increase IL-6 signaling rate in the culture medium, achieving the same effect although delayed with regard to the direct stimulation with IL-6.

Recent studies of wound healing in human fetal tissue reveal that a fast healing process is scarless thanks to the recruitment of fibroblasts (Coolen et al., 2010). A slower healing process leads to the deposition of extracellular matrix elements and the transition of fibroblasts to myofibroblasts, producing pathology and even fibrosis (Eckes et al., 2000; Micera et al., 2006). This pathologic wound healing process, along with local inflammation and neovascularization can induce failure in the functional recovery of the OS, which can threaten eyesight (Ferrari et al., 2013). According to our results, the presence of IL-6 in wounded corneal tissue would lead to a scarless healing process, while the presence of IL-10, producing a slower wound healing, could produce scarification.

Surprisingly, the role of IL-10 as protector of a scarless wound healing process has been postulated in a mouse model (Shi et al., 2013). These contradictory results make it necessary to develop three-dimensional models of wound healing, in which an evaluation of the interaction between epithelial cells and fibroblasts can be possible. The expression of different molecules of the extracellular matrix, such as different kinds of collagen or metalloproteinases, can be determined. Moreover, the fibroblast-myofibroblast transition can be evaluated in such a three-dimensional model in the presence of the different stimulating conditions considered for this study.

On the other hand, the stimulation with IL-6 + IL-10 did not produce the same synergistic effect as in the cytokine stimulation-based inflammation model with regard to pSTAT3 expression. In the presence of IL-6 + IL-10, the wound closure rate was close to that of the control. STAT3 activity has been related to the wound healing process (Ekblad et al., 2013), and the wound closure rate could increase in the presence of high amounts of pSTAT3 induced by IL-6 + IL-10 stimulation. However, in the model used for this study, the opposite effect was observed. It is possible that IL-10 acts as a modulatory cytokine in the presence of IL-6, triggering other molecular signaling and inhibiting the effect of IL-6.

Some published data suggest that proliferation is involved in wound healing *in vitro* (Liang et al., 2012). In the present study, cell proliferation was inhibited by pre-treating the cultured cells with MMC. MMC-treated cells had a slower wound closure rate than untreated cells. However, the analysis of the proliferation percentage in the different stimulation conditions did not reveal any significant differences between the cells situated at the edge of the scratch. Surprisingly, there was a greater proliferation rate in cells located in different areas of the monolayer compared to that of the edge of the wound. Despite this fact, the scratch was closed after 24 h in the absence of MMC. These data indicate that another mechanism besides proliferation is involved in the wound healing process *in vitro*, possibly cell migration. So we decided to further explore the potential contribution of cell migration to the wound healing process.

Cell migration is considered by several authors as the main mechanism involved in wound healing in the scratch model (Ramaesh et al., 2012; Seet et al., 2012). In the present study, the cytoskeleton was stained to detect those migrating cells at the edges of the scratch. Both phalloidin and α -actinin

antibody were used to visualize actin fibers. The direction of actin fibers indicated if the cells were migrating towards the cell-free area of the scratch or not migrating at all. Using both EdU and actin fiber staining, we could see that the cells located in the edge of the scratch were not proliferating and migrating at the same time, at least for the first hours of the study.

Although the number of proliferative cells was not increased compared to that of controls, the wound healing process was accelerated in IL-6-stimulated cells. We can say that cell migration was the main mechanism that led to wound closure in this stimulation condition. Also after 8 h, there were a great number of dead cells in the cell-free area in MMC-treated cells. A possible explanation for this is that these cells may have migrated to help in the wound closure, but then died because they could not proliferate. However, a deeper study of migration would be necessary to better understand the events happening during wound closure.

Finally, there was an increased proliferation rate for the cells in monolayer areas distant to the wound edge after 8 h of IL-6 + IL-10 stimulation. This stimulatory condition led to the slowest wound closure speed, presumably increasing the risk of scarring. A higher proliferation of epithelial cells would enhance the secretion of extracellular matrix into the wound, leading to scarring. This hypothesis would need a three-dimensional model of wound healing, with epithelial cells and fibroblasts co-culture, or an animal model of wound healing, to clarify the data.

We consider that the most relevant findings from this section are the following:

1. IL-6 stimulation accelerated wound closure in the *in vitro* wound healing model. This effect was inhibited by IL-10 co-stimulation.
2. Proliferation rate at the edges and in the distant areas of a scratched monolayer were similar; however, when the proliferation was inhibited, the wounds did not close completely.
3. In addition to cell proliferation, cell migration was also an essential mechanism that participated in wound closure.

Bacterial supernatants inflammation model

The third corneal inflammation model was based on bacterial supernatants stimulation of a HCE cell line. This model was described by Paulsen et al. (2008) and simulates the inflammatory response after a bacterial infection. Among the pathogens affecting the OS, SA and PA are frequent causes of bacterial keratitis, sometimes inducing a severe corneal injury (Barequet et al., 2008). Bacterial keratitis is a frequent complication of surgeries affecting the OS such as pterygium excision, corneal grafts, cataract surgery, etc.

In this model, bacterial supernatants instead of pathogens themselves were used. In this way, cross contamination with other cell cultures, independent from this study, could be avoided. Bacterial supernatants contain pathogen-associated molecular patterns (PAMP) that interact with eukaryotic cells *in vitro* and simulate an infection. Some molecules related to IL-6 signaling pathway were analyzed in this model, along with molecules related to the Th17 immune response.

During infectious inflammatory processes, the immune system determines the T cell response, e.g., Th1, Th2, or Th17, depending on a broad variety of genetic and environmental factors. These factors include the type of cytokines secreted by the infected cells or specific immune cells at the place of infection. The Th17 pathway is commonly activated through cytokines during infection with extracellular bacteria. The cytokines, including IL-6, are involved in differentiating naïve T cells into Th17 cells (Hume et al., 2005). Tekstra et al. (1999) have reported that vascular endothelial cells can initiate and support an inflammatory response after infection by pathogenic microorganisms, but the ability of corneal epithelial cells to achieve the same response has not been completely elucidated thus far.

In our work, HCE cells under basal conditions secreted IL-6 into the culture medium in a time-dependent manner. Moreover, SA supernatant, but not PA supernatant, induced a significant increase in IL-6 secretion. This *in vitro* model of corneal bacterial infection demonstrates how HCE cells are able to react against SA-PAMPs by increasing IL-6 production. It is possible that bacterial PAMPs lead to a nearly immediate increase of IL-6 secretion through mRNA stabilization, a characteristic mechanism of short-lived cytokines, as explained by Liton et al. (2009).

At earlier stimulation time points, even before 6 h, IL-6 mRNA was rapidly translated into protein, contributing to the high increase in IL-6 secretion observed in SA-stimulated cells. In addition, Lutter et al. (2000) reported that bacterial agents restrict eukaryotic protein synthesis. For IL-6, this leads to the inhibition of mRNA degradation. Thus, although there was no increase in mRNA production, we found an increase in IL-6 protein expression provoked by restricted mRNA degradation.

Later, after 72 h, IL-6 mRNA levels dropped to the control levels while the secreted IL-6 progressively increased over time. Decreasing levels of IL-6 mRNA could indicate a transient effect of the *in vitro* stimulation with bacterial PAMPs. However, while PA-stimulation did not have any effect on secreted IL-6 expression, we observed a significant decrease in IL-6 mRNA expression at 6 h and 24 h. This could indicate regulation by the HCE cells to inhibit IL-6 secretion. This would avoid a proinflammatory milieu when IL-6 is not actually needed. In our work, we used a PA strain that is perhaps not pathogenic or not pathogenic to HCE cells, and further studies are needed to determine if other PA strains, including ocular pathogenic strains, produce a different response.

Desiccating stress, another common cause of OS inflammation, increases IL-6 and IL-17A expression (Maertzdorf et al., 2002). IL-17A is also expressed in corneas from patients with herpetic stromal keratitis (De Paiva et al., 2009). However, our results show that the production of IL-17A, the hallmark protein of the Th17 pathway, is not increased after stimulation with the bacterial supernatants in HCE cultures. Furthermore, we observed a decrease in IL-17A mRNA levels at 6 h exposure. This led us to think that corneal epithelial cells may not be the main sources of IL-17 during infectious inflammation, but that they are able to downregulate IL-17A mRNA production.

Nevertheless, HCE cells can be considered active producers of IL-6. In the inflamed eye, IL-6 promotes the differentiation of the lymphocytes attracted to the Th17 cells (Hohki et al., 2010). The presence of these cells in the affected area would explain an increase in IL-17A amounts at the OS. Moreover, potential innate immune cells present at the site of infection may respond to bacterial products by producing IL-17A. In turn, this could act via IL-17R on epithelial cells, resulting in secretion of chemotactic factors such as MIP3 α that may recruit more leukocytes to the site of infection. This demonstrates a protective role of IL-17A when expressed in response to bacterial infection, a

role that is different from the pathogenic role when expressed by Th17 cells in autoimmune or chronic inflammatory diseases (Gaffen, 2008).

As mentioned in other sections, to improve the treatment of inflammatory diseases, knowing the components of the signaling pathway is sometimes as crucial as knowing the ligands themselves. Therefore, we also studied soluble IL-6R and GP130, both important to the IL-6 signaling pathway. Although IL-6 expression was increased in the presence of bacterial supernatants, sIL-6R secretion by the HCE cells was not significantly increased at any of the studied stimulation times. There was a tendency to increase sIL-6R secretion in 1:50 dilution-stimulated cells as compared to the control. Taking into account that IL-6R expression is mainly limited to hepatocytes and some leukocytes, our results suggest that other cell types at the OS are responsible for the secretion of the soluble form of the receptor. This could assure the propagation of IL-6 signals into the infected corneal epithelial cells, at least at earlier time points of infection.

However, expression of sGP130 increased significantly at the earliest time point and then decreased at the next time point. At later times, there were no detectable differences between the control and treated cells. The soluble receptor sGP130 acts as an antagonist of IL-6 signaling by inhibiting the binding of the preassembled IL-6-sIL-6R to the transmembrane GP130 (Heinrich et al., 1998). This may reflect changes in response to increased IL-6 secretion. Thus, the initial protective response to neutralize potential inflammatory effects of IL-6 would be later overcome by the reduced sGP130 levels. This could result in a more proinflammatory outcome in response to bacterial products. Therefore, based on our results, we assume that the same HCE cells that produce high amounts of the proinflammatory cytokine IL-6 also autoregulate its production by secreting a potential inhibitor, the sGP130 receptor (Figure 12).

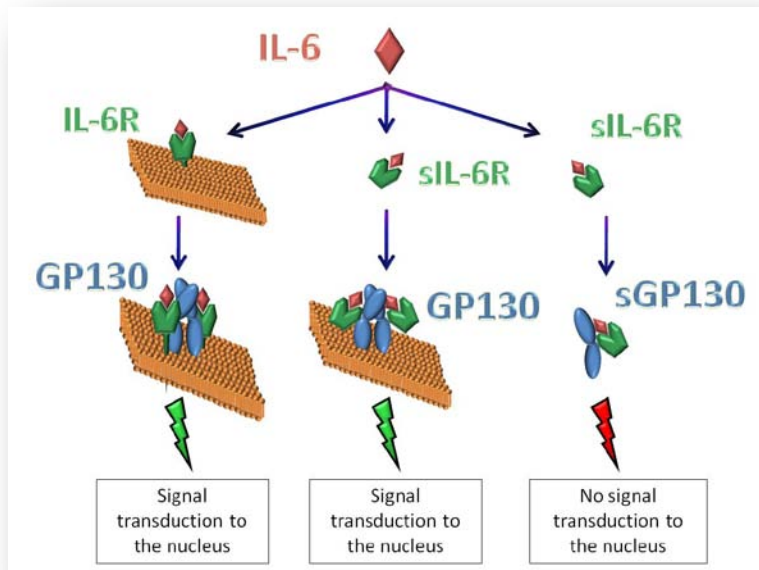


FIGURE 12. Possible interactions between IL-6 and its receptor complex and regulation by sGP130.

Mouse corneal fibroblasts express IL-17RA (Molesworth-Kenyon et al., 2008), and IL-17RA mRNA has been found in human corneal fibroblasts (Maertzdorf et al., 2002). But until now, IL-17RA protein expression has not been identified in cells of the human OS. We found IL-17RA protein expressed in human corneal, limbal, and conjunctival epithelial cells. A different pattern of reactivity with the antibody was present depending on the cell type and location. Considering the distribution of the reaction, corneal and limbal immunohistochemistry microscopy sections presented intense reactivity in the most apical epithelial cell layer. However, expression of IL-17RA in the conjunctival epithelium was present as a weaker and more homogeneous reactivity in every cell layer, even in stromal cells. The superficial cells of the OS are usually the most exposed to pathogens, and this could explain the abundant presence of cytokine receptors in the most superficial epithelial cell layers of corneal and limbal cells, but not in the conjunctiva, which is not directly involved in vision.

We also found differences among the three different ocular surface regions (cornea, limbus, and conjunctiva) regarding the pattern of the reaction within the cells. IL-17RA expression was present as perinuclear vesicular reactivity and

in the cytosol of corneal epithelial cells, which is in agreement with our *in vitro* immunofluorescence microscopy results. Limbal cells were stained only at the cell-cell contact regions, and conjunctival epithelial cells presented a homogeneous reactivity. We can presume that limbal cells are in an active region in terms of IL-17A signaling and paracrine signaling, which would explain the reactivity at cell membranes of the IL-17 cascade. The presence of the receptor in granules within the cytosol of corneal epithelial cells suggests that IL-17RA is present as a precursor awaiting the appropriate signal that triggers IL-17RA processing.

N-glycosylation of IL-17RA has been reported in T cells (O'Connor et al., 2009) as a mechanism of receptor maturation, and a glycosylated 110 kDa protein has been described in patients with oral inflammation (Garley & Jablonska, 2008). In our work, IL-17RA was present as an 85 kDa protein, which is lower than the predicted molecular weight based on amino acid sequence analysis (96 kDa; [UniProt Knowledgebase](#)). We first thought that this could correspond to an immature form of the receptor and that the stimulation with bacterial supernatants did not lead to receptor maturation. Thus, we determined if IL-17RA maturation could occur in the presence of higher amounts of the main ligand IL-17A. The stimulation of HCE cell cultures with IL-17A did not lead to a higher molecular weight protein as determined with SDS-PAGE and WB. However, our MIP3 α secretion results in IL-17A-stimulated HCE cells indicated that the IL-17RA was functional, as it transduced a signal leading to increased MIP3 α expression (Kao et al., 2005).

We consider that the most relevant findings from this section are the following:

1. Corneal epithelial cells were able to initiate through IL-6 secretion an inflammatory response after PAMP stimulation.
2. Corneal epithelial cells were not innate sources of IL-17 during exposure to bacterial supernatants *in vitro*, but participated in the Th17 immune response regulation.
3. IL-17RA was expressed in epithelia from the OS and was a functional receptor in the HCE cell line.

***In vitro* silencing of IL-6 using CG-based NPs**

The last part of this thesis work focused on an *in vitro* therapeutic approach based on gene silencing of the inflammatory diseases of the OS. As previously mentioned, the pathogenesis of inflammatory diseases often occurs when the inflammation process becomes chronic. This process leads to sight-threatening epithelial damage. Silencing the expression of one of the cytokines may be a therapeutic approach applicable to every inflammatory process (McCarthy et al., 2013). However, there are not many reports about silencing inflammatory molecules in the eye, and most of them aim to treat age-related macular degeneration by targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) (Campa & Harding, 2011). In our study, the targeted molecule was the IL-6, which is involved in a great variety of inflammatory processes, as previously discussed.

For reasons explained in the Introduction, two siRNA sequences were chosen to carry out gene silencing in this work. siRNA molecules are very susceptible to degradation by cellular nucleases (Khatri et al., 2012), as this is a natural defense mechanism against viruses or transposons. However, siRNAs are able to enter the cells through endocytosis. Once in the cytosol, they can specifically bind mRNA, inhibiting the translation into protein (López-Fraga et al., 2009). Some studies demonstrate that the effectiveness of naked siRNA applied to the eye is related to the activation of the toll-like receptor-3 (TLR3) and not to the siRNA mechanism itself (Rossi et al., 2008; Kleinman et al., 2012). To avoid this unspecific response, the siRNA must be administered within suitable carriers.

Biopolymer-based vehicles can be used as non-viral carriers for siRNA molecules. Once applied to the OS as eyedrops, biopolymer-based vehicles can interact with the receptors of OS epithelial cells or with the non-cellular mucous layer, depending on the carrier composition, increasing in this way the residence time (Kompella et al., 2010). Conventional formulations topically applied to the OS suffer a great loss by tear drainage and blinking. Among possible vehicles for the topical administration of genetic material to the eye, such as liposomes, microcapsules, and transfection agents, the NPs offer several advantages, such as (1) protection of siRNA sequences against degradation by nucleases, (2) increased biocompatibility, and (3) controlled release of the genetic material for a sustained administration (Cruz et al., 2012).

Besides the physiological need to associate the siRNA with NPs, the preliminary silencing assays using naked siRNA in corneal epithelial cells *in vitro*, demonstrated that a vehicle was needed to improve the silencing rate. A 70% rate of gene silencing was reached when the siRNA was administered associated with a transfection agent, such as Lipofectamine, a commercial product that is only acceptable for research.

Two different siRNA sequences targeting IL-6 were chosen to compare the results obtained with the targeting of two different regions of the IL-6 mRNA. The same concentrations used for siGAPDH were tried for siIL-6 (20 and 40 nM), obtaining no more than 10% of silencing. Raising the siRNA concentration to 160 nM improved the silencing rate to 37%, at protein level.

After three hours of contact, the internalization rate of the NPs was about 50%, producing less than 10% of cell death. In the eye, a topically instilled drug will not last for three hours in contact with the cells of the OS. However, the use of NPs will increase drug bioavailability because of the mucoadhesive properties, allowing the drug to reach target cells before blinking or tear drainage clear the drug from the OS (Alonso & Sánchez, 2004).

Although the analysis of the internalization showed promising results, indicating that gelatin-based NPs are good vehicles for the delivery of the siRNA to corneal epithelial cells, the IL-6 silencing rate obtained was not as good as expected. Expression of IL-6 protein was reduced by 30%, and only a 20% silencing was achieved at the mRNA level. Both were below the silencing rate obtained when using Lipofectamine as the siRNA carrier.

Three possible reasons can explain the lower rate of silencing with the CG-based NPs. Either the siRNA sequences were not specific, or the NPs did not have a good siRNA release, or else the choice of the therapeutic target was not adequate. First, the siRNA sequences were commercially validated, thus the specificity should not be questioned. However, the validation of the sequences was performed in HeLa cells, a cervical carcinoma cell line. As tumor cells, HeLa cells may have suffered mutations in their genome. So, the specific siRNA sequences for HeLa cells may not be the same for other cell lines such as the HCE cell line used in this study.

The CG-based NPs proved to have a good internalization rate while maintaining high cell viability. Thus, the lower than expected level of IL-6 silencing is probably not related to a toxic effect from the NPs. While the NPs effectively entered the cells, the ability to release the siRNA has not been

tested. The siRNA may be entrapped in the NP core, unable to reach the mRNA. However, considering the low silencing rate obtained with Lipofectamine-delivered siRNA, this may not be the reason for the silencing failure in this model.

These considerations lead us to think that the choice of a proinflammatory cytokine as a target for gene silencing by means of siRNA may not be technically feasible at this time. The siRNA acts by binding the complementary mRNA sequence, which leads to degradation by cellular nucleases. However, the terminal 3' region of the mRNA is rich in adenosine/uridine elements that play an important role in mRNA stabilization, preventing mRNA degradation by nucleases (Chen & Shyu, 1995). Thus protection of the cytokine mRNA from nuclease activity may be the cause of silencing failure with siRNA targeting IL-6.

Originally, the aim of this study was to evaluate the effect of IL-6 silencing in the *in vitro* inflammatory models. siRNA-mediated silencing of ocular inflammation-related molecules has been evaluated in a corneal wound healing model (Gorovoy et al., 2008), in corneal neovascularization (Seta et al., 2007), and in infectious keratitis (Guo et al., 2012; Sauer et al., 2012). However, the obtained IL-6 silencing rate in control experiments of this work was not as expected given the 70% silencing for siGAPDH or in the published reports mentioned above. Considering that this is a high-cost technology, we decided not to try the silencing in the *in vitro* inflammation models.

Another therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases of the OS, based on gene silencing, could be the targeting of IL-6 receptor or some other molecule of the signaling pathway. Targeting cytokine receptors with specific siRNA has already produced good results (Hou et al., 2013). For example, the decrease in TGF β receptor 2 expression in corneal fibroblasts reduced the inflammatory response by reducing TGF β signaling (Nakamura et al., 2004).

With the results of the cytokine stimulation-based inflammation model in mind, GP130 could be an interesting target for gene silencing with therapeutic potential. Expression of GP130 was the most altered in response to stimulation with every cytokine tested. Time restrictions impeded us to include these experiments in this thesis work. However, it would be of great interest to evaluate, in the future, the effect of GP130 silencing in an *in vitro* cytokine stimulation-based inflammation model. Such a study would analyze the expression of IL-6 signaling pathway molecules and other mediators of the

inflammatory response such as cytokines (IL-1, IL-8, IFN γ), factors (TGF β , VEGF), or receptors (TLRs, CD44).

We consider that the most relevant findings from this section are the following:

1. Spermine-cationized gelatin/chondroitin sulfate nanoparticles were promising vehicles for the delivery of genetic material into corneal epithelial cells.
2. siRNA-mediated gene silencing targeting IL-6 mRNA was not an effective approach in the *in vitro* inflammation model used in this study.

CONCLUSIONS

1. IL-6 and IL-17 contribute to the maintenance of the inflammatory status of HCE cells in a cytokine stimulation-based *in vitro* corneal inflammation model, creating a positive feedback loop.
2. The presence of IL-6, but not IL-10, increases the wound healing rate of HCE cells in an *in vitro* corneal wound healing model. In it, wound closure is the result of the combination of cell proliferation and cell migration.
3. HCE cells are able to initiate an inflammatory response, after the exposure to bacterial supernatants, by enhancing the secretion of IL-6 and by regulating the pro-inflammatory response with differential secretion of sGP130.
4. Receptor A for IL-17 is expressed in human tissues of the OS. HCE cells also express this receptor and it is functional *in vitro*.
5. Increased production of IL-6 and the presence of a functional receptor for IL-17 in HCE cells suggest that corneal epithelial cells act as indirect participants in the Th17 immune response.
6. Cationized gelatin-based nanoparticles are effective vehicles for the delivery of IL-6 siRNA into HCE cells *in vitro*. However, IL-6 gene silencing as a therapeutic approach for the treatment of ocular surface inflammatory diseases is not an effective strategy in our experimental conditions.



INTRODUCCIÓN

**“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo,
involúcrame y lo aprendo.”**

(B. Franklin)

*“Tell me and I forget, teach me and I remember,
involve me and I learn.”*



Superficie ocular

La parte anterior del ojo, denominada superficie ocular (SO), está formada por la conjuntiva, la córnea, el limbo y la película lagrimal. Se caracteriza por formar una primera barrera entre el entorno y el medio interno del ojo. Entre sus funciones se encuentra, por lo tanto, la de protección contra agentes externos nocivos. De las partes mencionadas, la córnea destaca por ser el epitelio que se sitúa en el eje óptico (Figura 2). La integridad de la misma es fundamental, no sólo por su función de barrera, sino además por su implicación en el mantenimiento apropiado de la visión. Una pequeña herida o una alteración del entorno que no tendría mayor trascendencia en otro epitelio, pueden suponer un compromiso de la visión en el caso de la córnea.

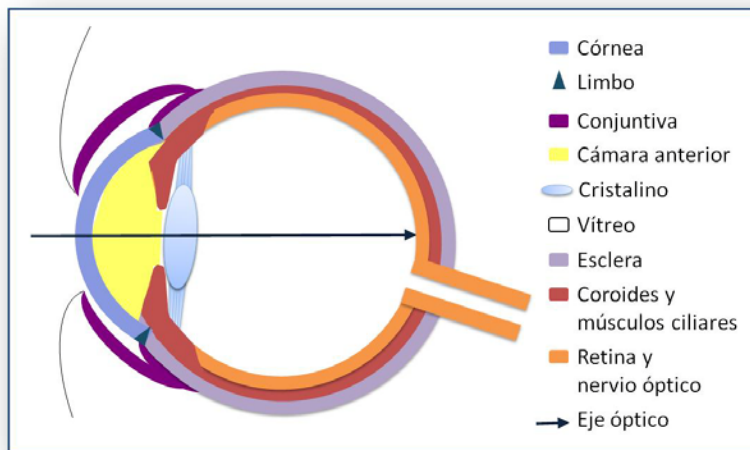


FIGURA 2. Esquema del globo ocular.

Junto con las glándulas lagrimales y todos los circuitos nerviosos, hormonales e inmunológicos que regulan la producción de los diferentes componentes de la lágrima, la SO forma parte de lo que se denomina unidad funcional lagrimal (Stern y cols., 2004). La integridad de cada uno de sus componentes es esencial para mantener la homeostasis y un correcto funcionamiento de todo el conjunto. La disfunción de la SO puede producir un espectro muy amplio de manifestaciones clínicas que van desde los frecuentes síntomas de irritación ocular, como ocurre en la conjuntivitis alérgica estacional, a patologías oftalmológicas asociadas a la pérdida de visión, como

las formas graves del síndrome de ojo seco, las formas más severas de alergia como la queratoconjuntivitis vernal o las abrasiones corneales (Peate, 2007).

El globo ocular en su conjunto es una estructura muy impermeable (Urtti, 2006). Las propias características histológicas del epitelio corneal dificultan la penetración de sustancias al interior de los tejidos oculares (Kinoshita y cols., 2001). Además, existen una serie de barreras denominadas globalmente hemato-oculares, que impiden el paso de sustancias de la sangre al interior de estos tejidos. Sin embargo, la mucosa ocular posee una gran capacidad de absorción. El epitelio corneal, que es un epitelio no queratinizado cuya fisiología requiere cierto estado de humedad y que es capaz de secretar mucinas, es considerado parte de la mucosa ocular.

La vía transmucosa de administración de fármacos ofrece diversas ventajas frente a la administración sistémica, principalmente relacionadas con el aumento de la efectividad y la disminución de los efectos secundarios. A diferencia de otras mucosas, con la mucosa ocular nos encontramos ante una serie de limitaciones para el tratamiento de enfermedades por la vía transmucosa. Por una parte, las particulares características de barrera de la córnea que se han mencionado más arriba establecen una interacción y una limitación del paso efectivo de moléculas activas a su través. Por otra parte, la capacidad de retención de los medicamentos instilados es escasa; la mayor parte del volumen instilado se pierde en pocos segundos por drenaje, lagrimeo y parpadeo, de modo que menos del 5% de la dosis aplicada va a alcanzar los tejidos oculares (Maurice & Mishima, 1984; Keister y cols., 1991) (Figura 3).

Es por ello que una de las alternativas exploradas en los últimos años para mejorar la interacción y el transporte de moléculas activas a través de la mucosa ocular, al igual que para otras superficies mucosas, ha consistido en el uso de sistemas coloidales de estructura diversa, obtenidos a partir de diferentes biomateriales de carácter biodegradable.

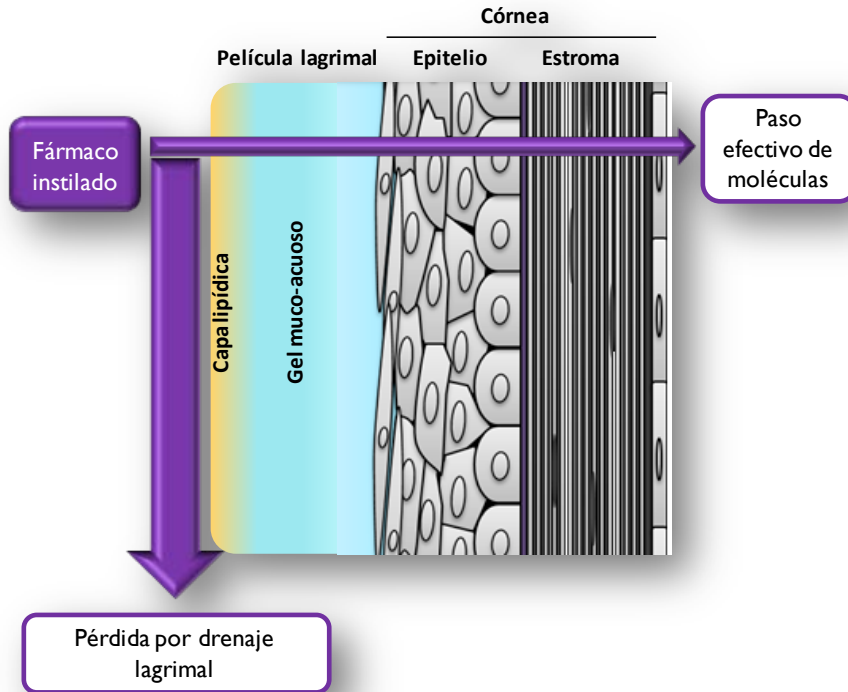


FIGURA 3. La película lagrimal y la estructura y fisiología de la córnea impiden la penetración de la mayor parte del fármaco instilado. Imagen adaptada de Diebold Y y cols., 2010.

Inflamación

La inflamación de la SO es un proceso natural que se produce para proteger el entorno de la visión, desencadenándose cuando alguna patología afecta a la parte anterior del globo ocular. A pesar del característico “privilegio inmune” del ojo, la inflamación ocular transcurre de manera similar al resto del organismo, con el fin de destruir el agente externo causante de un daño y reparar rápidamente los tejidos dañados. Este “privilegio inmune” implica la tolerancia del sistema inmune ocular frente a los antígenos extraoculares, evitando así la inflamación colateral asociada a la respuesta inmune. Sin embargo, una respuesta inflamatoria descontrolada o excesiva puede contribuir a la aparición de una situación patológica de difícil resolución (Nathan, 2002), la cual puede ocurrir también localizada solamente a nivel de la mucosa ocular (Ueta y Kinoshita, 2012).

La inflamación ocular tiene un importante componente de desequilibrio en cuanto a la regulación de la presencia de citoquinas pro y antiinflamatorias. Por ejemplo, el rechazo al trasplante es un fenómeno inmune que implica citoquinas proinflamatorias derivadas de linfocitos T colaboradores (Th) tipo Th1 (como INF γ y TNF α) (Wadia y Tambur, 2008; Romagnani y Crescioli, 2012). Los trasplantes alogénicos de limbo (el nicho de las células madre epiteliales de la córnea), que se realizan para la reconstrucción de la SO en caso de deficiencia severa de células madre, fracasan en un 50% tras tres años de seguimiento (España y cols., 2004). Este fracaso se correlaciona en gran medida con un grave estatus inflamatorio de base en las estructuras de la SO receptora del tejido.

El desequilibrio en los niveles de citoquinas, quimioquinas y otros factores reguladores, o una cronificación de la inflamación debido a respuestas autoinmunes o a exposiciones repetidas al mismo antígeno, puede conllevar un daño en el tejido que se pretendía proteger. Este desequilibrio se traduce en un proceso inflamatorio que afecta a todas las estructuras de la unidad funcional lagrimal y constituye la base de importantes enfermedades de la SO. Entre las enfermedades inflamatorias que afectan a la SO, se encuentran las diversas formas de alergia ocular (Calonge, 1999), todas ellas graves problemas oftalmológicos que afectan anualmente a miles de personas y que transcurren con alteración en los niveles de las citoquinas correspondientes a una respuesta mayoritaria de tipo Th2 (Leonardi y cols., 2008).

Otro tipo de enfermedades concretas que afectan a la SO y que pueden comprometer la visión son las queratitis bacterianas y otros tipos de úlceras corneales producidas por acción mecánica o química. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* (SA) o *Pseudomonas aeruginosa* (PA) son causas frecuentes de estos tipos de queratitis. Ambas son bacterias extracelulares que crecen formando biofilms o en membranas mucosas. Sin embargo, estos patógenos pueden invadir las células epiteliales y causar inflamación (Fleiszig y cols., 1994; Fleiszig y cols., 1995; Edwards y cols., 2010). En algunos casos, una vez controlada la infección, los propios mecanismos de defensa del cuerpo mantienen un estado activado y contribuyen al inicio de un proceso inflamatorio crónico. Entre las diferentes respuestas inmunes, la de tipo Th17 es la que se activa principalmente durante las infecciones por patógenos extracelulares (Pappu y cols., 2010; D'Elios y cols., 2011).

La selección de la respuesta inmune entre los tres tipos mencionados (Th1, Th2 o Th17) viene determinada tanto por el tipo de agente causante de la respuesta, como por el tipo celular afectado, además de por un equilibrio en los niveles de citoquinas y factores reguladores, entre otros factores genéticos y medioambientales (Liang y cols., 2006).

Las citoquinas, que son moléculas de bajo peso molecular (entre 15 y 30 kDa), son secretadas tanto por células especializadas como por otros tipos celulares, entre los cuales destacan las células epiteliales. Su papel principal es el de mediador entre células inmunes activadas y células no inmunes, controlando gran variedad de mecanismos fisiológicos celulares (proliferación, expresión génica, quimiotaxis, apoptosis, etc.). Un correcto equilibrio en la expresión de las citoquinas permite un funcionamiento adecuado de la respuesta inmune, así como una protección eficaz ante una situación patológica.

A continuación se exponen las principales características de las citoquinas sobre las cuales se centra este trabajo: las interleuquinas (IL-)6, 10 y 17.

IL-6

La IL-6 es una citoquina multifuncional que participa en un amplio espectro de condiciones inflamatorias oculares. Se ha relacionado la presencia de IL-6 en la lágrima de pacientes con síndrome de ojo seco de tipo evaporativo con el dolor, la producción y la estabilidad lagrimal y la integridad del epitelio

(Enriquez-de-Salamanca y cols., 2010). Se ha llegado a utilizar el nivel de expresión de esta citoquina como biomarcador de la evolución del síndrome de ojo seco grave o moderado, en pacientes que recibían tratamiento para esta enfermedad (Turner y cols., 2000). También se ha encontrado una expresión elevada de IL-6 en la lágrima de pacientes que sufren de enfermedad de injerto contra huésped (Riemens y cols., 2012), en un trabajo en el que los autores sugieren que la IL-6 está involucrada en etapas tardías, pudiéndose asociar a la severidad de la enfermedad. Sin embargo, se ha establecido un papel protector de la IL-6 durante la infección corneal por PA (Xue y cols., 2002). Por otra parte, entre los papeles que desempeña la IL-6, se encuentra el de regulador de la diferenciación y expansión clonal de los linfocitos Th17 (Hohki y cols., 2010).

La transducción de señales mediante la IL-6 ocurre a través de la unión específica de dos moléculas de IL-6 a dos receptores de IL-6 (IL-6R, también denominado CD126). Este homodímero, a su vez, se une a dos copias del mediador transmembrana denominado glicoproteína 130 (GP130, también conocido como CD130), resultando un complejo hexamérico (Ward y cols., 1996). La cascada de señales que se activa en consecuencia pasa por la activación de las JAK quinasas, que fosforilan al receptor y a ellas mismas. Las zonas fosforiladas constituyen los sitios de anclaje para el transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT3) o para otros adaptadores de la vía de las MAP quinasas o de PI3K/Akt (Subramaniam y cols., 2013). La unión de dos unidades de STAT3, fosforiladas a su vez por las JAK quinasas, provoca su dimerización y traslocación al núcleo, donde actúan como reguladores de la transcripción (Yoshimura, 2006; Murray, 2007) (Figura 4).

Tanto el STAT3 como la GP130 son proteínas expresadas en cualquier tipo celular; sin embargo, la expresión del IL-6R se limita a hepatocitos y algunos leucocitos (Tenhumberg y cols., 2008). Para compensar esta aparente limitación, el sistema inmune pone en juego la vía de trans-señalización permitiendo la unión de la IL-6 a una forma soluble del receptor (sIL-6R), obtenida mediante *splicing* alternativo en el procesamiento del ARN mensajero (ARNm). Dos copias de este heterodímero se unen a dos unidades del mediador transmembrana GP130, obteniéndose una transducción de señales idéntica a la obtenida mediante la unión al receptor IL-6R de membrana (Ahmed y cols., 2007). La capacidad de las células de la SO para producir sIL-6R ha sido demostrada recientemente (Shoji y cols., 2007; Ebihara y cols., 2011; Sugaya y cols., 2011).

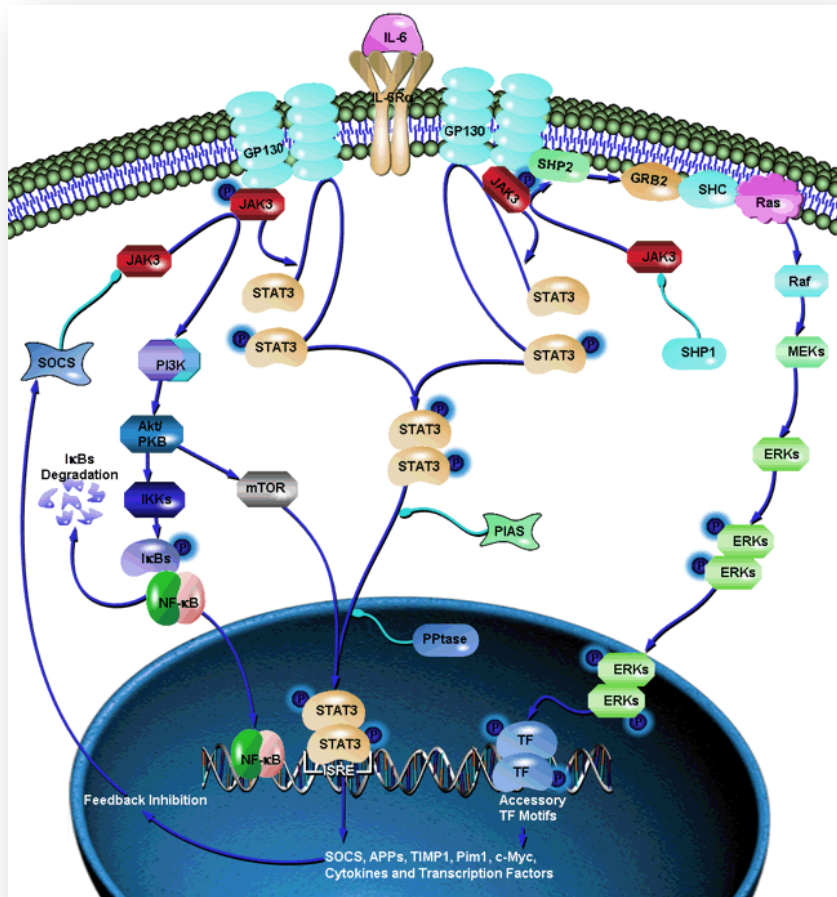


FIGURA 4. Vías de señalización de la IL-6. Imagen tomada de SABiosciences (<http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6 Pathway>).

Por otra parte, también la GP130 posee una forma soluble (sGP130), cuya acción, al contrario de lo que ocurre para la forma soluble del receptor de la IL-6, difiere de la de su forma transmembrana. En este caso, la sGP130 actúa como antagonista de la señalización mediada por IL-6 (Heinrich y cols., 1998), uniéndose al heterodímero formado por la IL-6 y el sIL-6R, impidiendo su unión al mediador transmembrana GP130 e inhibiendo así la cascada de señalización de forma efectiva.

IL-10

La IL-10 es una citoquina con función de inmunosupresor endógeno natural en el ser humano (De Kozak y cols., 2002) y, en el caso de enfermedades inflamatorias oculares, tiene un papel inmunomodulador (Ghasemi y cols., 2012). Tiene una gran capacidad antiinflamatoria y junto al factor de crecimiento transformante beta (TGF β) limita una amplia variedad de reacciones inmunes específicas o inespecíficas, previniendo el daño tisular. Curiosamente, cuenta con varios análogos virales expresados en el virus de Epstein-Barr, en el Herpes virus tipo 2 equino, en el virus Orf y en el citomegalovirus.

Las principales células productoras de IL-10 son los monocitos y los macrófagos, además de los linfocitos Th, tanto Th1 como Th2 y Th17, según se ha descrito recientemente (Sabat y cols., 2010), pero su producción ha sido también relacionada con las células dendríticas, los linfocitos B y los mastocitos. Aun considerándose una citoquina inmunomoduladora, la expresión de IL-10 parece estar inducida por el entorno, contrariamente a otras citoquinas, como el TGF β , cuya expresión es constitutiva (Li y cols., 2012).

La IL-10 actúa en el cuerpo humano como homodímero (Windsor y cols., 1993). La señalización de la IL-10 ocurre a través de un receptor heterodímero transmembrana compuesto por los receptores IL-10R1 y IL-10R2. El homodímero de IL-10 se une en primer lugar al IL-10R1, cambiando su conformación y permitiendo la unión del IL-10R2. Las señales intracelulares desencadenadas por esta unión involucran también a la molécula STAT3 (Figura 5).

La producción de IL-10 parece ser crítica en el desarrollo de enfermedades graves de base inmune, como el lupus eritematoso y la esclerosis múltiple, entre otras, así como en enfermedades inflamatorias crónicas caracterizadas por un patrón de expresión de citoquinas tipo Th1, como la artritis reumatoide, la dermatitis de contacto y el rechazo de trasplantes (Cobbold y cols., 2003). Además, se ha asociado a diferentes procesos inflamatorios oculares (Ghasemi y cols., 2012). Los niveles de IL-10 en suero son más bajos en pacientes con enfermedades autoinmunes (Salmaggi y cols., 1996), como por ejemplo en pacientes con síndrome de Sjögren (Szodoray y cols., 2008), que en sujetos sanos. Sin embargo, los niveles de IL-10 están elevados en pacientes con glaucoma (Baudouin y cols., 2004), con linfoma primario intraocular (Cassoux y

cols., 2007) o en pacientes que están sufriendo rechazo a un trasplante de córnea (van Gelderen y cols., 2000). También se ha asociado un alto nivel de IL-10 en suero con un menor riesgo de sufrir retinopatía diabética, en pacientes con diabetes mellitus (Lee y cols., 2008). Hay trabajos que muestran una asociación entre la sobreexpresión de IL-10 y la depresión inmune y su papel preventivo, por ejemplo, de la inflamación tisular en casos de respuesta inmune de tipo alérgico (Bellinghausen y cols., 2001).

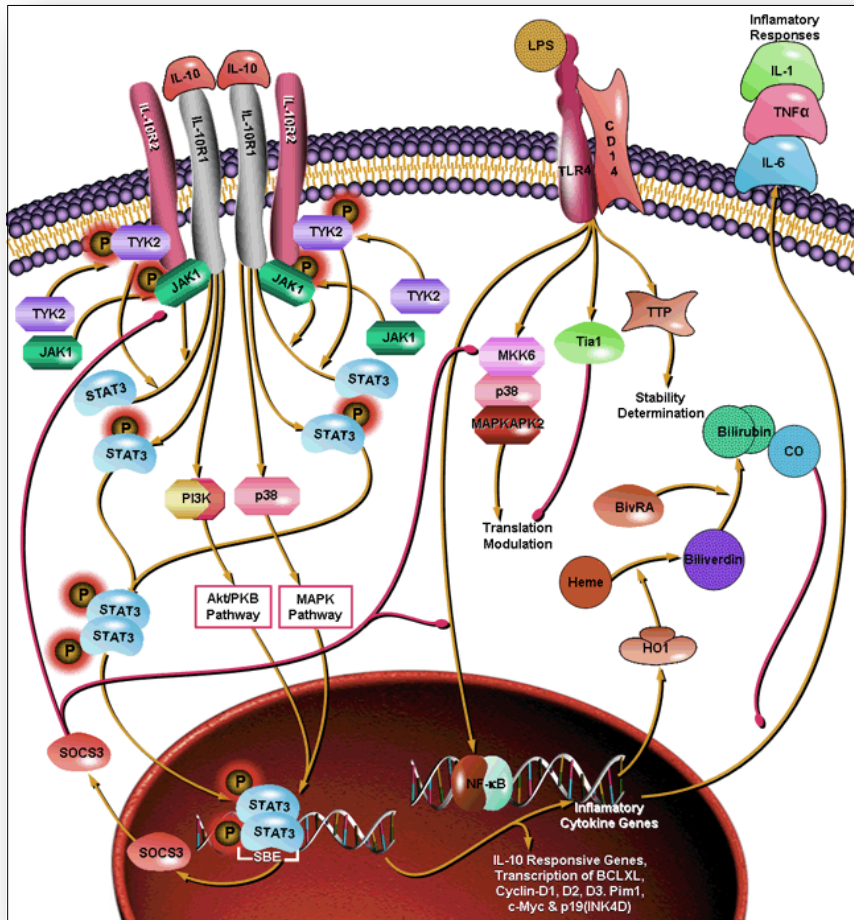


FIGURA 5. Vías de señalización de la IL-10. Imagen tomada de SABiosciences (<http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-10>).

Estos datos sugieren un efecto potencialmente terapéutico de la IL-10 en enfermedades inflamatorias y proliferativas oculares. De hecho, se están probando diversas terapias con IL-10. En un modelo de trasplante corneal en

oveja, el riesgo de rechazo disminuye al aplicar un tratamiento génico local con IL-10 (Klebe y cols., 2001). Además, el tratamiento con IL-10 hace que pacientes con queratitis estromal herpética mejoren notablemente (Boorstein y cols., 1994).

IL-17

La IL-17 es la molécula efectora característica de la respuesta inmune tipo Th17. Se conocen seis isoformas de esta citoquina (IL-17A/F), cuya expresión depende del tipo celular, del tejido y de la enfermedad en curso (Kim y cols., 2002). Algunos componentes de la inmunidad innata pueden producir y secretar IL-17, como es el caso de los linfocitos *natural killer* y las células mieloides (Cua y Tato, 2010), los cuales actuarían antes de que se active la inmunidad adaptativa en el caso de una infección. La IL-17A (también llamada solamente IL-17) es la principal citoquina responsable del inicio de respuestas innatas antiinfecciosas, estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias, de moléculas quimiotácticas capaces de atraer a neutrófilos al lugar de infección y de péptidos antimicrobianos.

Para activar la cascada de señalización de la IL-17 (Gaffen, 2009), es necesaria la presencia de dos de los cinco receptores descritos: IL-17RA-E. La mayor afinidad se encuentra en la unión entre la IL-17A y el IL-17RA (Ely y cols., 2009; Onishi y cols., 2010) (Figura 6). Se han descrito células productoras de IL-17 en la córnea media-periférica de un modelo de ojo seco de ratón (De Paiva y cols., 2009). También se ha visto que la IL-17 se expresa en las córneas de pacientes con queratitis estromal herpética (Maertzdorf y cols., 2002). Sin embargo, la producción de IL-17A está generalmente asociada a leucocitos, mientras que es la isoforma IL-17C la que se asocia habitualmente a protección por parte de las células epiteliales, actuando de manera autocrina (Pappu y cols., 2012).

Por su parte, el IL-17RA se expresa en la mayoría de las membranas celulares humanas (Kramer y cols., 2007), por ejemplo en las de los leucocitos (Thiele y cols., 2000; Das Sarma y cols., 2009), en las de las células del epitelio bronquial humano (McAllister y cols., 2005) y en los fibroblastos corneales humanos (Maertzdorf y cols., 2002). Sin embargo, no se ha descrito la presencia del IL-17RA en las células epiteliales de la SO.

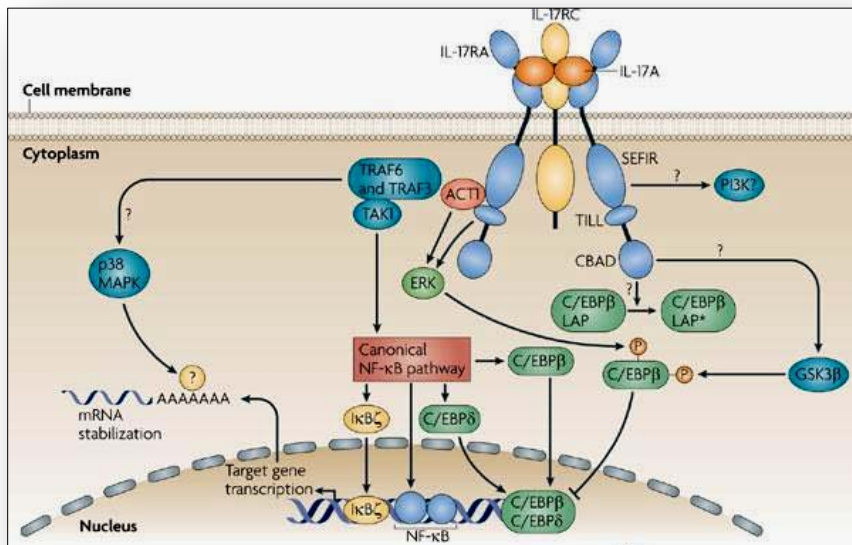


FIGURA 6. Vía de señalización de la IL-17A. Imagen tomada de Gaffen SL., 2009.

En cuanto a los papeles que desempeña la IL-17, se ha postulado un papel potencialmente protector contra la inflamación bacteriana (Cho y cols., 2010). Esta citoquina es capaz de incrementar la expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa ($MIP3\alpha$), una proteína quimiotáctica con propiedades antimicrobianas, como se ha demostrado *in vitro* en células epiteliales de las vías respiratorias (Kao y cols., 2005). Sin embargo, tanto la IL-17 como otras moléculas relacionadas con los linfocitos Th17 pueden relacionarse con la patogénesis de la enfermedad (Nakae y cols., 2003; Yu y cols., 2007; Gaffen, 2008). Por ejemplo, se ha establecido una relación entre los Th17 y el síndrome de ojo seco: durante el curso de esta enfermedad, la presencia de IL-17 está asociada a un aumento en los niveles de factores proinflamatorios y a una disfunción de la barrera ocular (De Paiva y cols., 2009).

Silenciamiento génico

Nuevas herramientas para el tratamiento de la inflamación ocular

Como se ha visto anteriormente, la base de una gran cantidad de enfermedades inflamatorias que afectan a la SO es la sobreexpresión de moléculas proinflamatorias. Una aproximación terapéutica contra la inflamación ocular es la de evitar esa sobreexpresión mediante el bloqueo de la propia molécula marcadora del estatus inflamatorio o del receptor o receptores de la misma en los tejidos de la SO. Ese bloqueo se puede conseguir, al menos teóricamente, con péptidos que se unan al receptor, impidiendo de ese modo el acceso del ligando natural y, consecuentemente, el inicio de la cascada de mensajeros que llevaría finalmente a la expresión de los genes implicados en la respuesta específica de la unión de la molécula con su receptor.

Sin embargo, los tratamientos actuales contra la inflamación ocular no son todo lo eficaces que se podría esperar de un tratamiento específico y no carecen de efectos secundarios (Diebold y cols., 2011). Por lo tanto, la necesidad de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la SO es clara. Existen otras posibilidades de bloqueo local de la respuesta inflamatoria, como el silenciamiento génico. Se trata de un proceso en el cual un ARN interfiere en la traducción de los genes que se activan específicamente como consecuencia del estatus inflamatorio permanente y la bloquean. A ese ARN se le denomina ARN interferente o de interferencia (ARNi).

El silenciamiento génico es un mecanismo propio de todas las células eucariotas, que representa una defensa eficaz frente a la entrada de ARN exógeno a dichas células, como es el caso de los ARN virales. El estudio de este mecanismo natural ha llevado al desarrollo de la técnica del silenciamiento inducido artificialmente mediante ARNi (Leung y Whittaker, 2005). Gracias a él, se consigue atenuar la expresión de un determinado gen, mediante la introducción en la célula de una molécula de ARN exógeno por métodos químicos, físicos o biológicos, que pueden ser la permeabilización de las células mediante detergentes, el empleo de vehículos virales o moleculares, la inducción de la transcripción mediante la transfección con un plásmido, etc.

Para ser eficaz, el ARNi debe poseer una secuencia de pares de bases complementaria a la del ARNm del gen que se pretende silenciar (gen diana). Mediante el apareamiento de pares de bases y sirviéndose de la maquinaria enzimática de la propia célula (los denominados complejos Dicer y RISC), se consigue “cortar” el ARNm, impidiendo así la traducción a proteínas de dicho ARN. De este modo, se logra silenciar la expresión del gen diana.

Existen diferentes tipos de ARNi (Scherer y Rossi, 2003; Dorsett y Tuschl, 2004) que van a poner en marcha diferentes mecanismos intracelulares, como se puede ver en la Figura 7.

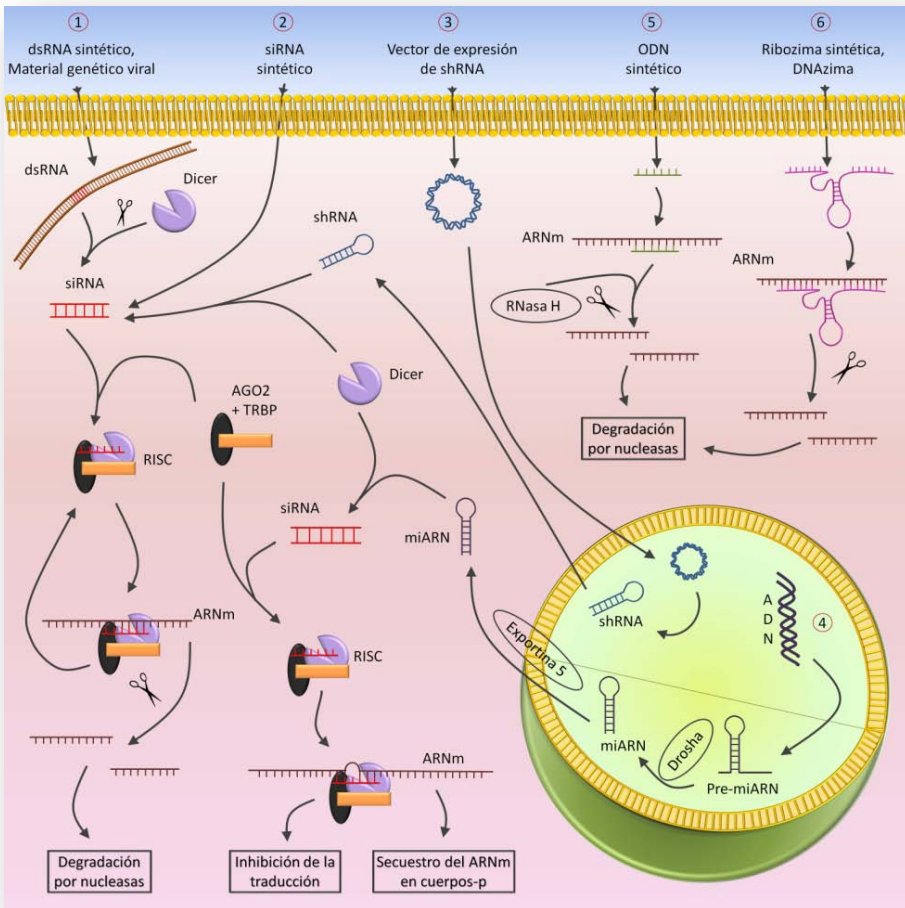


FIGURA 7. Diferentes vías de silenciamiento génico.

Los diferentes tipos de ARNi son los siguientes: **1.** el ARN largo de doble cadena (dsRNA) que sigue la misma ruta que el material genético viral; **2.** el ARN pequeño de interferencia (siRNA), que se une a la vía anterior saltándose el paso inicial; **3.** los vectores de expresión de ARN corto en horquilla (shRNA), que requieren el paso por el núcleo celular y **4.** el micro ARN (miARN), procedente del ADN endógeno. Existen otras aproximaciones al silenciamiento génico basadas en ácidos nucleicos que no sean ARN, como **5.** los oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN) y **6.** las ribozimas y enzimas de ADN (DNAzimas).

Entre todos ellos, la interferencia de ARN basada en siRNA es la que más se viene usando últimamente. Se trata de una tecnología que ha demostrado ser muy útil para silenciar los genes de células de mamíferos, con gran especificidad y potencia (Dallas y Vlassov, 2006). Además, evita los problemas de otras moléculas como el dsRNA que, al ser introducido en la célula eucariota, induce la respuesta antiviral del interferón (IFN) y induciendo la muerte celular (Caskey y cols., 2011; Estornes y cols., 2012).

Terapias basadas en siRNA

El siRNA es una molécula de ARN de doble cadena, que contiene de 21 a 28 pares de ribonucleótidos apareados dos a dos por los apareamientos descritos por Watson y Crick. Además, contiene un par de desoxirribonucleótidos desapareados en el extremo 3', lo cual le confiere estabilidad termodinámica a la molécula (de Fougerolles y cols., 2007). De esta manera, se consigue una mayor especificidad y eficiencia.

Existen diferentes referencias en la literatura sobre estudios hechos con siRNA en roedores (Dallas y Vlassov, 2006). Estos estudios están encaminados a determinar la eficacia del tratamiento con siRNA en el caso de diversas enfermedades, como las infecciones virales (Influenza, hepatitis B o C), la hipercolesterolemia, el cáncer y distintos tumores (adenocarcinoma pancreático, tumor de células germinales), etc. Los estudios se encuentran ya en estado muy avanzado en el caso de enfermedades que cursan con hipervascularización (Dorsett y Tuschl, 2004). Por ejemplo, en el hígado de ratón se alcanza una reducción de la expresión del gen diana de hasta el 90%. Además, el siRNA ha sido probado como terapia en gran variedad de enfermedades de base genética, como el HIV, la hepatitis C y el cáncer (Stevenson, 2003; Storvold y cols., 2006; Wilson y Richardson, 2006).

En el ámbito ocular, el siRNA se ha empleado en el caso de enfermedades inflamatorias y proliferativas que llevan asociado un proceso de neovascularización, como la retinopatía diabética, la retinopatía de la prematuridad o la degeneración macular asociada a la edad (Reich y cols., 2003; Tolentino y cols., 2004; Gomes Dos Santos y cols., 2005; Hirano y cols., 2010). Hay algún ejemplo más de estudio de una posible aplicación en el ámbito del glaucoma (Mediero y cols., 2009; Borrás, 2012).

Pero en la mayoría de los estudios, se administra el siRNA de una forma invasiva que no siempre es bien tolerada por los pacientes. En el caso particular de la terapia ocular, se inyecta el siRNA directamente a la cámara anterior (Russell y cols., 2006) o a la región subconjuntival (Nakamura y cols., 2004), o se emplean otros métodos físicos para favorecer la entrada del material genético a través del epitelio, como la electroporación o la iontoforesis (Hao y cols., 2010). Se han probado vehículos virales *in vivo* para solventar esta limitación (Carlson y cols., 2004), pero conllevan muchos problemas éticos y/o médicos (como la posibilidad de “retromutación” del virus y readquisición de la capacidad virulenta del mismo), de forma que el riesgo que conlleva su uso en una forma de terapia potencial no suele ser aceptable. Hay pocos estudios sobre el siRNA en relación con los problemas concretos de la SO, en los cuales las técnicas de administración sean poco o nada invasivas, para una mejor tolerancia por parte del paciente. Los principales obstáculos en la terapia génica siguen siendo el vehículo para el material genético y la vía de administración.

Vehículos para el material genético

Administración ocular de fármacos

Desde el descubrimiento de la tecnología del ARNi y la posibilidad de la aplicación terapéutica de la misma, tres problemas han impedido el desarrollo de fármacos eficaces basados en ella. En primer lugar se ha comprobado la presencia de efectos secundarios no deseados, como podría suceder con un fármaco convencional. Además, la estabilidad de las moléculas efectoras (de ARN) es baja tanto a la hora de almacenar el fármaco, como una vez administrado, dentro del organismo. Por último, la administración eficiente de las moléculas efectoras a su sitio de acción está generalmente impedida por las barreras fisiológicas y los mecanismos de defensa celulares.

Para superar estos obstáculos, los ácidos nucleicos se introducen en las células eucariotas como potenciales agentes terapéuticos de tres maneras diferentes, principalmente: conjugados con agentes de transfección, incluidos en virus inactivados e incorporados en sistemas nanoparticulados biopoliméricos (Figura 8).

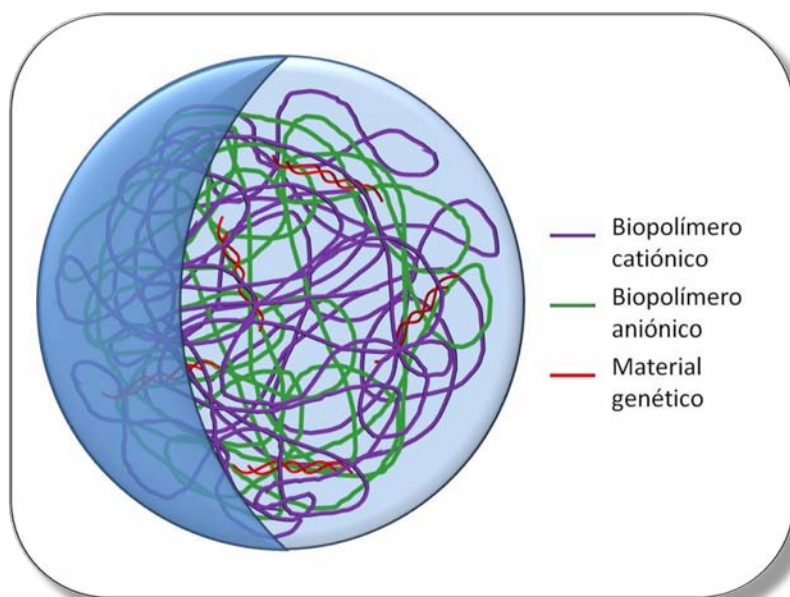


FIGURA 8. Esquema de una nanopartícula con el material genético incorporado en su matriz.

En el caso específico del siRNA, existen estudios en los que se administra conjugado con formulaciones lipídicas comerciales, como Lipofectamina2000 de Invitrogen, HiPerFect de Qiagen, o TransIT TKO de Mirus Bio que han sido probadas para la administración de siRNA *in vitro* (Turchinovich y cols., 2010). También se ha asociado a virus inactivados para su administración *in vivo* (Chen y cols., 2009).

La administración de agentes para terapia génica a los tejidos oculares incluye varias formas de inyección ocular, inyección sistémica e instilaciones tópicas mediante colirios. Entre las formas de inyección ocular se encuentran la inyección intravítrea, que proporciona una vía de entrada eficaz cuando los tejidos diana se sitúan en la parte posterior del ojo (Davies y cols., 2003), la inyección a la cámara anterior y la inyección subconjuntival (Conley y cols., 2008; Diebold y cols., 2011). Puesto que los efectos de la terapia por silenciamiento génico son transitorios, son necesarias varias inyecciones para completar el tratamiento. Siendo esta una vía de administración sumamente invasiva, dolorosa y no bien tolerada por los pacientes, suele llevar a un abandono del tratamiento. Por otra parte, debido a las barreras hemato-oculares mencionadas previamente, el paso de sustancias de la sangre a los tejidos oculares suele estar impedido. Por lo tanto, la inyección sistémica no es una buena opción de administración de agentes silenciadores a los tejidos oculares. Teniendo en cuenta estos datos, la vía más recomendada es la administración tópica del fármaco.

Sin embargo, las barreras inherentes al ojo dificultan la llegada del material genético al citoplasma celular. Por lo tanto, el desarrollo de una vía efectiva de administración del agente terapéutico, asegurando la permanencia del mismo en su lugar de acción tanto tiempo como sea posible, se hace sumamente necesario. Por esta razón, el desarrollo de vehículos no virales capaces de incorporar ARN y de liberarlo específicamente en los tejidos oculares es uno de los mayores desafíos en este campo de investigación.

Nanopartículas de administración ocular

Una de las alternativas exploradas en los últimos años para mejorar la interacción y el transporte de moléculas activas a través de la mucosa ocular, ha consistido en el uso de sistemas coloidales nanoparticulados: nanopartículas (NPs), de estructura diversa, obtenidos a partir de diferentes biomateriales de carácter biodegradable (Sánchez & Alonso, 2006; Diebold y cols., 2007; de la

Fuente y cols., 2008a; Diebold y Calonge, 2010). Estos sistemas se caracterizan por presentar una morfología esférica y un tamaño nanométrico. En el caso de su aplicación a la biomedicina, los tamaños preferidos son inferiores a 500 nm para favorecer su entrada en la célula, sin dañarla.

De forma simplificada, las NPs incorporarían en su interior (bien de forma encapsulada, bien inmovilizada en la matriz polimérica) el fármaco que se pretende administrar, actuando de este modo como un vehículo o vector (Sánchez & Alonso, 2006). Diversos grupos de investigación nacionales e internacionales, entre los que se encuentra el nuestro, están trabajando para desarrollar NPs adecuadas para emplearlas como vehículos para el transporte de los principios activos a través de las barreras celulares y tisulares, aprovechando su versatilidad para incorporar en su interior diversas macromoléculas, como proteínas, vitaminas o ácidos nucleicos (de la Fuente y cols., 2008b; Paolicelli y cols., 2009; Konat Zorzi y cols., 2011). Actualmente existen muchas posibilidades de diferentes materiales (incluso metálicos) que se encuentran en procesos de estudio en modelos celulares o animales (Diebold y Calonge, 2010). Pero aún no se ha puesto a punto un sistema nanoparticulado que cuente, al mismo tiempo, con una buena capacidad de incorporación de la molécula terapéutica, una buena polidispersión (el que todas las NPs tengan un tamaño en el mismo rango), una buena biocompatibilidad y una buena eliminación por el organismo, una vez hayan desempeñado su función.

Las características más importantes en el desarrollo de nuevas NPs como vehículos para la liberación controlada de material genético, son las siguientes: 1. que tengan baja pérdida por drenaje lagrimal, aumentando el tiempo de biodisponibilidad; 2. que minimicen la pérdida en los tejidos que atraviesan, es decir, que estén dirigidos; 3. que consigan una exposición máxima de las células diana al material genético exógeno, con una rápida absorción; 4. que protejan el material genético de las nucleasas celulares y 5. que sean capaces de dirigir su contenido bien al núcleo, bien al citoplasma (Achouri y cols., 2012).

Las NPs formadas a partir de compuestos naturales, biocompatibles (biopolímeros), con las cuales nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia, permiten mejorar la biodisponibilidad del principio activo, que normalmente se reduce a un 5% del volumen instilado debido a la pérdida por el reciclaje de la lágrima (Keister y cols., 1991). Además, se ha demostrado que estas NPs presentan una alta tolerancia y baja toxicidad tanto *in vitro* como *in*

vivo (de Campos y cols., 2004; Enriquez de Salamanca y cols., 2006; Contreras-Ruiz y cols., 2010). Esta tecnología puede ser aplicada a la administración de agentes para el silenciamiento génico, adecuando los componentes de las NPs a las necesidades del material genético. Así, se ha demostrado la eficacia de NPs basadas en biopolímeros, como el quitosano y el ácido hialurónico, en el transporte de material genético al epitelio de la SO (de la Fuente y cols., 2008b; Contreras-Ruiz y cols., 2011). Sin embargo, la ventaja de utilizar quitosano en las NPs frente a simples disoluciones de este polímero ha sido puesta en duda (Dyer y cols., 2002). Por lo tanto, otros polímeros están siendo probados para la terapia génica, entre los cuales se encuentra la gelatina cationizada (CG) (Xu y cols., 2008).

La gelatina es una proteína natural capaz de polimerizar, formando redes de mayor o menor densidad dependiendo de su concentración. La adición de una poliamina a la gelatina, como espermina, espermidina o etilendiamina, va a provocar que ésta se cargue positivamente, adquiriendo así la capacidad de incorporar material genético (cargado negativamente) en el entramado, por simple interacción de cargas. La incorporación de condroitín sulfato, que es un glicosaminoglicano sulfatado cargado negativamente, compuesto por una cadena de azúcares alternados (N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico), permite mejorar estas NPs, disminuyendo la toxicidad potencial de las NPs cargadas positivamente debido a la CG. En presencia de un agente reticulante y del material genético (el siRNA), la mezcla de los biopolímeros positivo y negativo va a formar espontáneamente NPs estables, con el material genético incorporado en su entramado (patente P200803136).

Hay estudios *in vitro* e *in vivo* que emplean la CG como componente de los sistemas de liberación controlada, para la administración de siRNA (Matsumoto y cols., 2006; Obata y cols., 2012; Saito y Tabata, 2012). Pero hasta el momento, no se ha aplicado esta tecnología a la administración del siRNA a través de la mucosa ocular.



JUSTIFICACIÓN

“Quien nunca ha cometido un error no ha intentado nada nuevo.”

(A. Einstein)

“Anyone who has never made a mistake has never tried anything new.”



El objetivo de todo tratamiento contra patologías que afectan a la SO es **preservar la visión**. El estudio de los procesos bioquímicos y moleculares que ocurren durante diferentes estados patológicos de la SO, puede ayudar a mejorar la comprensión de las manifestaciones clínicas, servir para identificar nuevas dianas terapéuticas y para desarrollar nuevos sistemas más específicos para su tratamiento y con menos efectos secundarios, o para incrementar la eficacia de los ya existentes.

En el presente trabajo, se ha estudiado el papel que juegan las interleuquinas IL-10, IL-17 e IL-6 (conocida citoquina proinflamatoria) y las moléculas de la vía de señalización de esta última en diversos **procesos inflamatorios** que afectan a la SO, utilizando para ello modelos *in vitro*. Se han utilizado tres modelos para tres situaciones inflamatorias diferentes: **1.** la inflamación ocular producida y cronificada por un entorno proinflamatorio, como podría ser el caso en el ojo seco, **2.** el daño corneal con desepitelización provocado, por ejemplo, por cirugías o por lesiones mecánicas o químicas y **3.** la queratitis bacteriana, causa común de rechazo al trasplante de córnea.

La **opacidad corneal** causada por un daño en la córnea producido tanto por alguna enfermedad infecciosa o inflamatoria como por una lesión, es la cuarta causa de ceguera en el mundo, después de las cataratas, el glaucoma y la degeneración macular asociada a la edad, según un estudio de 2012 (Resnikoff y Keys, 2012). Cuando el tratamiento falla y la visión se ve amenazada o menguada, el trasplante de córnea es la solución. Pero el trasplante sigue sin ser una cirugía completamente segura. Además de la conocida causa inmune de rechazo, las queratitis activas suponen un factor de alto riesgo para este trasplante (Hackett y cols., 2011). La comprensión de los procesos bioquímicos que intervienen en las queratitis infecciosas e inflamatorias o en las causadas por lesiones sería de ayuda a la hora de desarrollar nuevas terapias más efectivas para restaurar rápidamente la SO del daño que resulta de estos procesos patológicos, favoreciendo el mantenimiento de la visión o minimizando los riesgos de rechazo en los casos en los que el trasplante siga siendo necesario.

Entre las citoquinas participantes en los procesos inflamatorios de la SO, este trabajo se centra en una de ellas, la **IL-6**, y en parte de las moléculas de su vía de señalización. La IL-6 es una citoquina proinflamatoria cuyo estudio está adquiriendo cada vez mayor importancia en los procesos inflamatorios de la SO. Como se ha visto en la Introducción, se ha relacionado su expresión en la

lágrima de pacientes con el **dolor**, con una **baja estabilidad lagrimal**, con el **rechazo al trasplante**, con **infecciones bacterianas**, con procesos de **autoinmunidad**, etc. Por lo tanto, el estudio del entorno molecular de esta citoquina se hace necesario para poder identificar nuevas dianas terapéuticas y establecer nuevos tratamientos basados en el bloqueo de la IL-6 o de alguna de las moléculas de su vía de señalización.

Por otra parte, la participación de la IL-6 en la vía de diferenciación de los linfocitos tipo **Th17**, de reciente descripción, ha incrementado la importancia de esta molécula en los últimos tiempos. Asimismo, la IL-10, otra de las moléculas consideradas para este estudio, participa en la regulación de la patogénesis de la respuesta tipo Th17 (McGeachy y Cua, 2008), como se puede ver en la Figura 9.

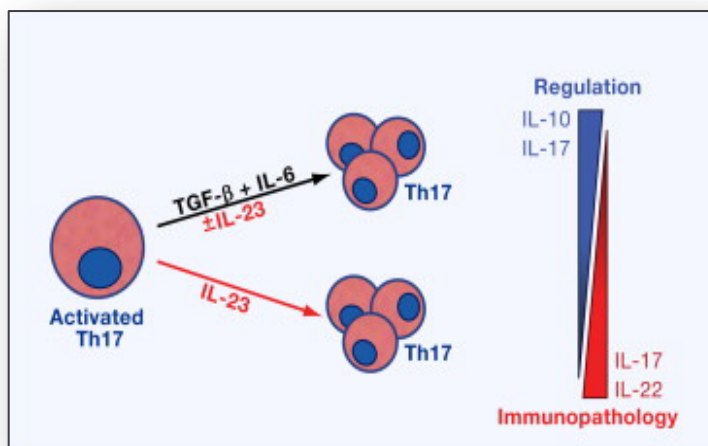


FIGURA 9. Participación de las IL-6, IL-17 e IL-10 en la diferenciación, expansión clonal y regulación de la patogénesis de las células Th17. Imagen tomada de: McGeachy MJ & Cua DJ, 2008.

La comprensión de los mecanismos de acción de las citoquinas relacionadas con los linfocitos Th17 puede ser de gran ayuda para incrementar el conocimiento de los mecanismos patogénicos de diversas enfermedades inflamatorias crónicas de la SO. La producción de IL-17, que está ligada generalmente a las células Th17, por parte de las células epiteliales corneales no se ha descrito hasta el momento. Tampoco se ha descrito la presencia de su principal receptor, IL-17RA, en los epitelios de las estructuras de la SO: la córnea, el limbo y la conjuntiva.

La ausencia en este trabajo de estudios en animales es debida a la voluntad de ajustarse al **principio “de las tres erres”**: reemplazar, reducir, refinar. Se ha reemplazado el uso de animales de laboratorio por un estudio en una línea celular humana. De este modo se evita emplear recursos animales en un estudio preliminar que abarca una gran cantidad de moléculas. Por este motivo, se quiere poner de manifiesto que el estudio que aquí se presenta es una aproximación a lo que puede estar pasando en un caso real. Existen, sin embargo, modelos animales de queratitis bacteriana (Marquart, 2011) y de otras enfermedades inflamatorias de la SO, pero la utilización de modelos *in vitro* permite evaluar la contribución exacta de las **células epiteliales de la córnea** a los procesos de respuesta estudiados, en un entorno privado de los demás componentes celulares de la SO.

Como último apartado de este trabajo, se estudia de forma preliminar la posible aplicación de una tecnología novedosa para el tratamiento de los procesos inflamatorios de la SO: **el silenciamiento génico de la IL-6**. Este silenciamiento está basado en la administración tópica de siRNA incorporado en **nanopartículas** formadas por polímeros naturales biocompatibles. Las NPs se incluyen dentro de los sistemas de liberación controlada de fármacos. El empleo de estos sistemas como vehículos para la internalización de moléculas activas al interior del organismo permite mejorar su absorción y distribución (Conti y cols., 2000).

Hay pocos estudios sobre la aplicación de la tecnología del siRNA en relación con los problemas concretos de la SO, en los cuales las técnicas de administración sean poco o nada invasivas, para una mejor **tolerancia por parte del paciente**. Esta fue una de las razones que nos movió a intentarlo en los tejidos y patologías de interés para nuestro grupo de investigación, animados por los buenos resultados obtenidos en otros campos, como el tratamiento de infecciones virales (Blake y cols., 2012) o el cáncer (Bora y cols., 2012).

Para ello, se contó con la participación de los miembros del grupo NANOBIOFAR de la Universidad de Santiago de Compostela, especialistas en tecnología farmacéutica, con el que nuestro grupo de investigación mantiene una estrecha colaboración desde hace más de una década. Gracias a ella, tenemos experiencia en el estudio biológico de NPs para la liberación controlada de fármacos, capaces de alcanzar su diana a través de las barreras oculares (de Campos y cols., 2004; Enriquez de Salamanca y cols., 2006; Diebold y cols., 2007; Contreras-Ruiz y cols., 2010; Konat Zorzi y cols., 2011).



HIPÓTESIS

**“Los viejos lo creen todo, los adultos todo lo sospechan,
mientras que los jóvenes todo lo saben.”**

(O. Wilde)

*“The old believe everything, the middle-aged suspect
everything, the young know everything.”*



Este trabajo de investigación se desarrolló a partir del planteamiento de las hipótesis siguientes:

1. El estudio del efecto de la IL-6 y de moléculas relacionadas en condiciones de simulación de procesos inflamatorios *in vitro* permite identificar cambios moleculares en células epiteliales corneales humanas y determinar su contribución al mantenimiento o la regulación de la patogénesis de los mismos.

2. Es posible silenciar *in vitro* citoquinas implicadas en enfermedades inflamatorias de la superficie ocular mediante el uso de ARNs pequeños de interferencia. El uso de nanopartículas basadas en compuestos biocompatibles como vehículo para estos ARNs mejora la internalización de los mismos y, por lo tanto, el silenciamiento.



OBJETIVOS

“Un objetivo sin un plan es solamente un deseo.”

(A. de Saint-Éxupéry)

“A goal without a plan is just a wish.”

“Tout objectif sans plan n'est qu'un souhait.”

Objetivos generales

1. Determinar la contribución de diversas citoquinas implicadas en procesos inflamatorios de la superficie ocular simulados en varios modelos *in vitro* con células epiteliales corneales humanas.
2. Silenciar la expresión de moléculas implicadas en enfermedades inflamatorias de la superficie ocular mediante ARNs pequeños de interferencia usando nanopartículas basadas en compuestos biocompatibles como vehículo para estos ARNs.

Objetivos específicos

1. Determinar la contribución de la IL-6 y algunas de las moléculas de su vía de señalización en un modelo *in vitro* de inflamación corneal por exposición a citoquinas.
2. Determinar la contribución de la IL-10 y de la IL-17 sobre la expresión de moléculas de la vía de señalización de la IL-6 en un modelo *in vitro* de inflamación corneal por exposición a citoquinas.
3. Evaluar el papel de la IL-6 y de la IL-10 y la combinación de ambas en la cicatrización de células epiteliales corneales en un modelo *in vitro* de herida corneal.
4. Comprobar si las células epiteliales corneales son capaces de expresar citoquinas y factores efectoras de la respuesta inmune tipo Th17 en respuesta a estímulos derivados de bacterias, en un modelo *in vitro* de inflamación bacteriana de la córnea.
5. Determinar si los tejidos de la superficie ocular humana normal expresan el receptor A de la IL-17 y comprobar si se trata de un receptor funcional en una línea celular de epitelio de córnea humana.
6. Silenciar la expresión de la IL-6 en una línea celular de epitelio de córnea humana, empleando nanopartículas basadas en biopolímeros como vehículos para la administración del siRNA.



METODOLOGÍA

“Según yo lo veo, si quieres el arco iris, tienes que soportar la lluvia.”

(D. Parton)

“The way I see it, if you want the rainbow, you gotta put up with the rain.”



Materiales

Cultivos celular y bacteriano

Los componentes del medio de cultivo y el kit de imagen Click-iT EdU Alexa-Fluor647 fueron de Invitrogen-Gibco (Inchinnan, Reino Unido), los soportes plásticos de cultivo de Nunc (Roskilde, Dinamarca) y las citoquinas de Prepro-Tech (Londres, Reino Unido), excepto la IL-17A que fue de Prospec (Ness-Ziona, Israel). La mitomicina C procedía de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.).

El medio digerido de soja y caseína para el cultivo bacteriano fue de Oxoid (Basingstoke, Reino Unido), la sangre de oveja de Heipha (Eppelheim, Alemania) y los filtros impermeables a bacterias de 0,22 μm de Millipore (Eschborn, Alemania). El material plástico para el cultivo también fue de Nunc.

Determinación de proteínas y ARN

Los kits del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para la IL-6, la IL-17 y la MIP3 α procedían de RayBiotech (Norcross, GA, EE.UU.) y los de la sGP130 y el sIL-6R, de Diaclone (Besançon, Francia).

El kit de cuantificación de proteínas, basada en el ácido bicinonínico (BCA), fue de Pierce (Rockford, IL, EE.UU.) y el reactivo *Simple Buffer Laemmli S3401*, de Sigma-Aldrich.

Los materiales empleados para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), incluyendo el marcador de peso molecular (Precision Dual Color), así como para la posterior detección mediante *Western blot*, fueron adquiridos en Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.). El Tween20 empleado para el tampón de lavado se adquirió en Sigma-Aldrich.

El anticuerpo primario dirigido contra el IL-6R procedía de Abcam (Cambridge, Reino Unido), el de la GP130 de R&D Systems, los del STAT3 y el pSTAT3 de Cell Signaling (Beverly, MA, EE.UU.) y los de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el IL-17RA y la α -actinina de Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, CA, EE.UU.). Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa para la detección por *Western blotting* fueron: cabra anti-conejo, de Santa Cruz Biotechnology y burro anti-ratón, de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, EE.UU.). Los anticuerpos

secundarios conjugados con Alexa Fluor488 empleados en inmunofluorescencia fueron de Invitrogen.

La contratinción de los núcleos celulares en las imágenes de inmunofluorescencia se realizó con Hoechst33342 en azul (Sigma-Aldrich) o con yoduro de propidio en rojo (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). La faloidina rodamina para visualizar el citoesqueleto fue de Invitrogen.

Los reactivos para la inmunohistoquímica fueron de Dako (Glostrup, Dinamarca). El medio de montaje *Vectashield* y el kit *Vectastain ABC* fueron de Vector Laboratories (Burlingame, CA, EE.UU.). Los materiales para el marcaje con inmuno-oro fueron de Aurion (Wageningen, Holanda) y la resina *Epon Glycidether 100* de Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Alemania).

Las columnas de purificación de ARN, la DNasa y el mix de reacción SYBR Green fueron adquiridos en Qiagen (Hilden, Alemania). El kit de cuantificación de ARN y el fluorómetro, así como el kit de síntesis de ADN copia (cDNA) fueron de Invitrogen. Las secuencias de cebadores para IL-6 y 18S se sintetizaron a partir de la aplicación electrónica de Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod_type=E@SYOLIGO); los cebadores para el IL-6R, la GP130 y el STAT3 se adquirieron validados en Origene Technologies (Rockville, MD, EE.UU.); los del IL-17A y el IL-17RA fueron también validados de SABiosciences (Frederick, MD, EE.UU.).

Síntesis, caracterización y transfección con NPs

Para la síntesis de las NPs se empleó gelatina, de Nitta Gelatin (Toronto, Ontario, Canadá), condroitín sulfato, de Calbiochem (Billerica, MA, EE.UU.), hialuronato sódico, de Bioibérica (Barcelona, España), espermina, espermidina y etilendiamina, de Sigma-Aldrich.

La Lipofectamina™2000 usada como agente de transfección control para los siRNAs procedía de Invitrogen. El otro agente de transfección probado fue JetPEI™-RGD (Polyplus transfection, Illkirch, Francia).

Los materiales de citometría fueron: el tampón de lavado (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) y el kit comercial de viabilidad Anexina V-APC/Yoduro de propidio (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.).

Se emplearon dos ARNs pequeños de interferencia (siRNA) de doble cadena, diseñados y validados, de Ambion-Applied Biosystems (Austin, TX, EE.UU.), dirigidos contra la IL-6. Para las pruebas iniciales, se utilizó un siRNA contra la enzima GAPDH, también de Ambion-Applied Biosystems. Se empleó un siRNA inespecífico contra la proteína verde fluorescente (EGFP), de Invitrogen. Las secuencias de los siRNA empleados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Secuencias de nucleótidos de los siRNA.

siRNA	Hebra sentido (5' – 3')	Hebra antisentido (5' – 3')
IL-6a	GAA CGA AUU GAC AAA CAA Att	UUU GUU UGU CAA UUC GUU Ctg
IL-6c	GGA GUU UGA GGU AUA CCU Att	UAG GUA UAC CUC AAA CUC Caa
GAPDH	UGG UUU ACA UGU UCC AAU Att	UAU UGG AAC AUG UAA ACC Atg

Las letras mayúsculas corresponden a ribonucleótidos y las letras minúsculas a los desoxirribonucleótidos añadidos en el extremo 3' para dar estabilidad a la molécula.

Equipamiento

La manipulación de las células se realizó en una cabina de flujo laminar de seguridad de tipo II Gelaire BSB 4A (ICN Biomedicals, Flow Laboratories, Sidney, Australia). Se mantuvieron las células en el incubador de CO₂ Leec Touch 190S (Leec, Nottingham, Reino Unido). Las imágenes de fluorescencia o de contraste de fases se tomaron con una cámara digital asociada al microscopio invertido de fluorescencia de Leica DMI 6000B (Wetzlar, Alemania).

Las cubetas y la fuente de electroforesis (Power Pac 200) para la SDS-PAGE, además del sistema de documentación de geles (Chemi-Doc® XRS) y el software Quantity One para el análisis volumétrico de las bandas obtenidas, fueron adquiridos en Bio-Rad. El termociclador Master Cycler personal, empleado para la síntesis de cDNA, fue de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y el termociclador 7500 RealTime PCR System de PCR a tiempo real semi cuantitativa (qPCR), de Ambion-Applied Biosystems.

Las medidas de espectroscopía de correlación fotónica y de anemometría láser Doppler de las NPs se realizaron con el Zetasizer HS III de Malvern Instruments (Malvern, Reino Unido). El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro Cytomics FC 500 (Beckman-Coulter). Los datos recogidos se analizaron con el software del programa Cytomics RXP (Beckman-Coulter). La

detección mediante microscopía electrónica de transmisión se realizó con un microscopio Zeiss EM 902 (Oberkochen, Alemania).

Modelos de estudio y ensayos en células epiteliales de la córnea

Para todos los estudios llevados a cabo en este trabajo de tesis, se empleó una línea celular continua de epitelio de córnea humano (HCE) (Araki-Sasaki y cols., 1995), cedida por la Dra. Begoña Seijo, del grupo NANOBIOFAR, de la Universidad de Santiago de Compostela.

Mantenimiento

Las células HCE se cultivaron en medio DMEM/F12 + GlutaMAX™-I suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin, 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF) y 5 µg/ml de insulina, a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂. Para el mantenimiento de las células se cambió el medio de cultivo cada dos días, evaluando su evolución mediante observación por microscopía de contraste de fases. Para los diferentes ensayos se utilizaron diferentes soportes para el crecimiento de las células, esperando siempre a que éstas alcanzaran, como mínimo, el estado de preconfluencia antes de comenzar los ensayos. Se entiende como preconfluencia el estado de las células que forman prácticamente una monocapa celular, quedando muy poco hueco libre de células en el soporte de cultivo.

En la Tabla 2 se resume el conjunto de técnicas utilizadas para cada uno de los modelos empleados. Todos ellos fueron realizados en células de la línea celular HCE. En cada modelo, estas células fueron expuestas a diferentes condiciones de estimulación, que se detallan a continuación. Las técnicas empleadas para la valoración del efecto de estas estimulaciones sobre las células epiteliales de la córnea coinciden para varios de estos modelos de trabajo, por lo que se explican en conjunto en un apartado independiente. Sin embargo, para cada modelo, se analiza el efecto de la estimulación sobre unas moléculas concretas, que se detallan en cada apartado correspondiente.

TABLA 2. Resumen de la metodología empleada en los diferentes modelos.

Muestra	Técnica	Moléculas
Modelo de estimulación con citoquinas		
IL-6 IL-10 IL-17 IL-6 + IL-10 IL-17 + IL-10	Sobrenadantes Lisados de proteínas ARNm	ELISA WB qPCR
		IL-6R sIL-6R GP130 sGP130 STAT3 pSTAT3
Modelo de herida corneal		
IL-6 IL-10 IL-6 + IL-10	Sobrenadantes Células vivas Células fijadas	ELISA Microscopía por contraste de fases EdU MMC IF
		sIL-6R sGP130 α -actinina
Modelo de estimulación con sobrenadantes bacterianos		
SA PA	Sobrenadantes Lisados de proteínas ARNm Células fijadas Tejidos	ELISA WB qPCR IF IG IHC
		IL-6 sIL-6R sGP130 IL-17 IL-17RA MIP3 α
Silenciamiento génico		
NPs siGAPDH siIL-6a siIL-6c	Sobrenadantes ARNm Células	ELISA qPCR FC
		GAPDH IL-6

ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; WB, *Western blotting*; qPCR, reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real semi cuantitativa; EdU, 5-etil-2'-desoxiuridina; MMC, mitomicina C; IF, inmunofluorescencia; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; IG, inmuno-oro; IHC, inmunohistoquímica; FC, citometría de flujo.

Modelo de inflamación corneal inducida por exposición a citoquinas

Se utilizó un ensayo de exposición de las células HCE a citoquinas, según un modelo de inflamación *in vitro* publicado por miembros de nuestro grupo de investigación (Enriquez-de-Salamanca y cols., 2008), en células de conjuntiva humana, para simular un ambiente proinflamatorio en la SO.

Se sembraron 80.000 células HCE por pocillo en placas de 12 pocillos, y se dejaron crecer durante 72 h. A continuación se mantuvieron en medio de cultivo DMEM sin suplementos (medio puro) durante 24 h, para ralentizar la proliferación y lavar los efectos que puedan surgir de la incubación con los suplementos. Transcurrido ese tiempo, se estimularon las células con las siguientes citoquinas: IL-6 (10 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml) e IL-17 (20 ng/ml), en medio puro, o con las siguientes combinaciones en las mismas concentraciones: IL-6 + IL-10 e IL-17 + IL-10. Se recogieron los sobrenadantes celulares a las 6, 24 y 72 h tras la estimulación y se emplearon para la determinación de proteínas por ELISA. Los lisados celulares obtenidos a esos mismos tiempos, se emplearon para la determinación de proteínas por electroforesis y *Western blot*, o para la determinación de ARNm por qPCR.

Se ensayaron todas las condiciones por duplicado, en tres experimentos independientes.

Modelo de herida corneal

Se simuló un modelo de herida corneal, utilizando un ensayo *in vitro* de *scratch* (arañazo o corte), basado en el modelo descrito por Liang y cols. (2007). Además, las células del cultivo “herido” se expusieron a las siguientes citoquinas: IL-6, IL-10 y la combinación de ambas.

Se sembraron 35.000 células HCE por pocillo en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer durante 72 h. A continuación se realizó un corte lineal o *scratch* en la monocapa celular mediante una punta de pipeta estéril de 10 µl, dejando una zona libre de células a lo largo del pocillo. Se realizaron dos lavados con medio puro para arrastrar las células despegadas y se añadieron las siguientes condiciones de estimulación: IL-6 (10 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), o una combinación de ambas en las mismas concentraciones, en medio de cultivo suplementado con 1% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de

estreptomycin. Inmediatamente después del *scratch* y a las 4, 8 y 24 h, se tomaron imágenes del área de la herida.

Para cada uno de los tres experimentos independientes realizados, se pusieron 3 pocillos para cada condición de estimulación y se seleccionaron al menos 4 áreas distintas de la herida por pocillo. De este modo, cada imagen tomada a los diferentes tiempos se correspondía con la misma zona fotografiada en los tiempos anteriores. Se tomaron 6 medidas de la anchura de la herida en cada imagen, así como el área de la misma.

Ensayos de proliferación

Con el fin de determinar la contribución de la proliferación celular a la cicatrización en el modelo *in vitro* de herida corneal, se realizaron los siguientes ensayos de proliferación.

Inhibición de la proliferación con mitomicina C

Se sembraron 25.000 células HCE por pocillo en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer durante 72 h. Se trataron las células con 10 µg/ml de mitomicina C, un agente alquilante de ADN que inhibe la proliferación celular, en el medio de cultivo durante 2 h. Seguidamente se lavaron las células y se incubaron en condiciones normales durante otras 16 h.

A continuación se realizaron las estimulaciones con la IL-6 en las mismas condiciones explicadas previamente, midiendo los cambios en la anchura de la herida a los mismos tiempos de estudio, con el mismo número de repeticiones para cada condición.

Detección de células proliferativas con EdU

Para la detección de las células proliferativas en el modelo de herida mediante el kit de imagen Click-iT EdU Alexa-Fluor647, se sembraron 13.000 células HCE por pocillo en placas *multichamber* de Permax™ de 8 pocillos. Se dejaron crecer durante 72 h en condiciones normales para que alcanzaran confluencia. A continuación, se realizó el *scratch* y se expusieron las células a las citoquinas IL-6, IL-10 y la combinación de IL-6 + IL-10, según el procedimiento explicado previamente.

Además, se añadió el análogo de timina EdU en el medio de cultivo a una concentración 10 μM , tanto en las condiciones control (en las células sin estimular), como en las condiciones de estimulación. En este ensayo, se retrasó el primer tiempo de estudio hasta 1 h tras el *scratch*, en vez de estudiar el tiempo inicial (T0), para dar tiempo a que las células incorporaran el EdU.

Se fijaron las células 1 h, 4 h y 8 h tras el *scratch* y se procedió a la detección siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se fijaron las células con 3,7% de formaldehído en tampón fosfato salino (PBS) (KCl: 200 mg/L; KH_2PO_4 : 200 mg/L; NaCl: 8.000 mg/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2.160 mg/L) durante 15 min a temperatura ambiente (TA), se permeabilizó con 0,5% Triton X-100 en PBS, durante 20 min a TA y se incubó 30 min con el mix de reacción siguiendo la relación indicada por el fabricante. Se contratiñeron los núcleos con Hoechst 33342, incubando en dilución 1:1500 durante 15 min a TA.

Se tomaron fotografías de los tres experimentos independientes realizados, mediante el microscopio invertido de fluorescencia, seleccionando 5 campos diferentes en la zona de la herida y 8 campos en zonas de la monocapa celular distantes del borde, para el recuento. Se contabilizaron las células totales en cada campo, marcadas con Hoechst en azul, y las células proliferativas con el EdU incorporado, marcadas en rojo. En las zonas de la herida se tuvieron en cuenta las 3 ó 4 capas de células más próximas al borde de la herida, sin contar nunca menos de 500 células para cada condición. A partir de estos datos se obtuvo el porcentaje de células proliferativas tanto en el borde de la herida como en zonas alejadas de la monocapa.

Marcaje del citoesqueleto

Se marcó el citoesqueleto en células que habían sido expuestas a la EdU, incubándolas con un anticuerpo de ratón anti α -actinina, en dilución 1:50, durante 1 h a 37 °C, seguido de un anticuerpo secundario de burro anti ratón marcado con Alexa Fluor488. Además, en los pocillos en los que no se había añadido la EdU al medio de cultivo, se incubaron las células fijadas con faloidina rodamina en dilución 1:100 durante 30 min a TA.

Modelo de inflamación corneal inducida por exposición a sobrenadantes bacterianos

Se utilizó un ensayo de estimulación de las células HCE con sobrenadantes bacterianos, basado en el modelo descrito por Paulsen y cols. (2008), que simula la reacción inflamatoria que sucede en el epitelio de la córnea tras una infección bacteriana.

Obtención de sobrenadantes bacterianos

Se obtuvieron sobrenadantes bacterianos de dos cepas: *Staphylococcus aureus* (SA), cepa SA113 (ATCC 35556) y *Pseudomonas aeruginosa* (PA), cepa PA01 (ATCC 15692). Se incubaron las cepas durante toda la noche a 37 °C en agitación en medio digerido de soja y caseína. Se sembraron diluciones 1:10 del cultivo bacteriano en Columbia agar suplementado con 10% de sangre de oveja y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se centrifugó dos veces una suspensión de las bacterias a una concentración 5×10^7 cfu/ml, durante 30 min a 6,000 rpm. Los sobrenadantes se filtraron dos veces con filtros impermeables a bacterias de 0,22 μ m y su esterilidad se comprobó por incubación en agar durante toda la noche.

Estimulación de las células HCE

Se sembraron 300.000 células HCE por placa Petri de 8,8 cm² o 15.000 células HCE por pocillo en placas *multichamber* de Permanox™ de 8 pocillos y se dejaron crecer durante 72 h. A continuación, se mantuvieron en medio puro durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se estimularon las células con los sobrenadantes de SA o PA (en diluciones 1:100 o 1:50) en medio puro. Se recogieron los sobrenadantes celulares a las 6, 24 y 72 h tras la estimulación y se emplearon para la determinación de proteínas por ELISA. Los lisados celulares obtenidos a esos mismos tiempos se emplearon para la determinación de proteínas por electroforesis y *Western blot*, o para la determinación de ARNm por qPCR. Las células estimuladas en *multichamber* se fijaron durante 7 min a -20 °C en metanol frío y se guardaron a -20 °C hasta su utilización para la detección de proteínas mediante inmunofluorescencia.

Se obtuvieron duplicados de todas las muestras, provenientes de tres experimentos independientes.

Estudio del silenciamiento *in vitro* de la IL-6 usando NPs de CG

Preparación de las NPs

Las NPs se prepararon por la técnica de gelificación ionotrópica modificada, desarrollada por nuestros colaboradores del grupo NANOBIOFAR de la Universidad de Santiago de Compostela (Calvo y cols., 1997b). De manera resumida la técnica consistía en la formación espontánea de NPs por interacción de cargas entre un polímero positivo, la gelatina cationizada (CG), un polímero negativo, el condroitín sulfato (CS) o el ácido hialurónico (HA), el siRNA que está cargado negativamente y un agente reticulante, la espermidina (SPD). La gelatina fue cationizada con tres tipos de aminas diferentes: espermina (sp), espermidina (spd) o etilendiamina (et).

En este trabajo, se probaron tres tipos diferentes de NPs (que denominamos NPs X, Y y Z), como vehículos para el silenciamiento de la IL-6, cuya composición se recoge en la Tabla 3. Para la preparación se mezclaron 150 µl de una solución de GC con las diferentes aminas mencionadas, a una concentración de 2 mg/ml, con 100 µl de una solución 0,25 mg/ml de CS o HA, más 4 µl de una solución de siRNA a una concentración de 3 mg/ml y 50 µl de una solución 0,25 mg/ml del agente reticulante.

TABLA 3. Tipos de NPs empleados para el silenciamiento de la IL-6 y su composición.

NP	Polímero catiónico	Polímero aniónico	Agente reticulante	siRNA
X	CGsp 300 µg	CS 25 µg	SPD 12,5 µg	siIL-6 12 µg
Y	CGspd 300 µg	HA 25 µg	SPD 12,5 µg	siIL-6 12 µg
Z	CGet 300 µg	CS 25 µg	SPD 12,5 µg	siIL-6 12 µg

Gelatina cationizada (CG), espermina (sp), espermidina (spd), etilendiamina (et), condroitín sulfato (CS), ácido hialurónico (HA).

Las NPs se formaron espontáneamente, incorporando el siRNA en el entramado, de manera similar a lo esquematizado en la Figura 8 página 64.

Caracterización de las NPs

Se determinó el tamaño de partícula y su distribución mediante espectroscopía de correlación fotónica y se analizó el potencial zeta por anemometría láser Doppler. La carga superficial de las NPs se determinó mediante la medida de su velocidad de migración en campo eléctrico, a partir de su movilidad electroforética, empleando la ecuación de Smoluchowski (Von Smoluchowski, 1921). Cada muestra de NPs se analizó por triplicado.

Transfección con las NPs

Se sembraron 65.000 células HCE por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 24 h, esperando a que alcanzaran 70% de confluencia. Dos horas antes de la transfección, se sustituyó el medio de cultivo por medio puro. Las transfecciones con las NPs cargadas con el siRNA en diferentes concentraciones (20, 40, 80, 160, 200 y 250 nM), se llevaron a cabo en un volumen final de 250 µl de la solución salina balanceada de Hank (HBSS).

Se probaron diferentes tiempos de transfección (1, 2, 3 y 4 h), tras los cuales, se retiraron las formulaciones, se lavaron los pocillos y se reemplazó el medio por medio completo de cultivo. A las 24 h tras la transfección se cambió de nuevo el medio de cultivo y a las 48 h se recogieron los sobrenadantes celulares para la posterior determinación de proteínas por ELISA. Los lisados celulares obtenidos se emplearon para la determinación de proteínas por electroforesis y *Western blot*, o para la determinación de ARNm por qPCR.

Los controles negativos incluidos en el ensayo consistían en células expuestas a NPs blancas, sin siRNA cargado, o a NPs cargadas con un siRNA inespecífico (dirigido contra la proteína verde fluorescente, EGFP, ausente en las células HCE). El control positivo consistía en un agente de transfección comercial, como vehículo para internalizar el siRNA. La transfección con los dos agentes de transfección comerciales probados (Lipofectamina y JetPEI) se llevó en las mismas condiciones explicadas previamente, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Se ensayaron todas las condiciones por duplicado, en tres experimentos independientes.

Ensayo de viabilidad e internalización mediante citometría de flujo

Se determinó la viabilidad de las células transfectadas con NPs y siRNA por citometría de flujo (FC) mediante la aplicación de un kit de viabilidad de Anexina V-APC/Yoduro de propidio, basado en los siguientes principios: si una célula está marcada con anexina V indica que está en apoptosis temprana, mientras que la célula marcada con yoduro de propidio es necrótica; el doble marcaje significa apoptosis tardía, mientras que la célula viable no presenta marcaje.

Se sembraron 200.000 células HCE por pocillo en placas de 12 pocillos y se dejaron crecer durante 24 h, para que alcanzaran un estado de preconfluencia. Se transfectaron las células del mismo modo explicado previamente, ajustando los volúmenes, con las NPs X con el siRNA incorporado. Como control positivo de internalización se empleó Lipofectamina como vehículo para un siRNA modelo marcado con fluoresceinamina.

Para la detección de las NPs mediante FC, se marcó el polímero negativo CS, componente de las NPs, con fluoresceinamina. Se probaron diferentes tiempos de transfección (1, 2, 3 y 4 h), tras los cuales, se retiraron las formulaciones, se lavaron los pocillos y se levantaron las células del soporte de cultivo mediante tripsinización.

Se pasaron las células a tubos de citometría y se lavaron dos veces para eliminar todo el medio de cultivo, centrifugando 5 min a 500 xg para separar las células del sobrenadante. Se resuspendió el precipitado de células en 100 μ l de *binding buffer* y se incubó 10 min en frío con 2,5 μ l de anexina V-APC y 5 μ l de yoduro de propidio (250 μ g/ml). Tras añadir 400 μ l adicionales de *binding buffer*, se analizaron las muestras en el citómetro de flujo, empleando un láser de ión argón (488 nm) y uno de HeNe (633 nm), para excitar los fluorocromos APC (rojo), yoduro de propidio (naranja) y fluoresceinamina (verde).

Se realizaron duplicados de cada condición de experimentación, de tres experimentos independientes. Para cada muestra se analizaron como mínimo 10.000 eventos.

Técnicas de análisis

Las muestras obtenidas en los diferentes modelos de inflamación *in vitro* empleados, fueron evaluadas mediante las técnicas analíticas que se recogen en la Tabla 2 (ver página 89). Dado que éstas coinciden en varios de los modelos, a continuación se expone el procedimiento general seguido en todos los casos, indicando las particularidades necesarias de cada uno.

Detección de proteínas secretadas mediante ELISA

La concentración de diferentes moléculas secretadas al medio de cultivo por las células expuestas a las diferentes condiciones, se cuantificó mediante los ensayos de ELISA. Se emplearon kits de ELISA comerciales para las siguientes moléculas: IL-6, sIL-6R, sgp130, IL-17 y MIP3 α .

Para cada ensayo se procedió según las instrucciones del fabricante. Los resultados de absorbancia obtenidos para cada muestra se relacionaron cuantitativamente con la concentración de la molécula estudiada en la muestra, gracias a una recta patrón. Los resultados obtenidos se expresaron en pg de proteína / ml de medio de cultivo. Para equiparar los datos, todos los volúmenes se ajustaron en función del tamaño del pocillo.

También se empleó esta técnica para medir la expresión relativa (R') de proteína remanente tras el silenciamiento de IL-6. Para determinar el porcentaje de silenciamiento, cuando procedía, se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\%R' = [\text{muestra}]_{\text{problema}} / [\text{muestra}]_{\text{siRNA inespecífico}} \times 100$$

$$\% \text{ silenciamiento} = 100 - \%R'$$

donde $[\text{muestra}]_{\text{problema}}$ representa la concentración de IL-6 en los sobrenadantes de las células expuestas al siRNA específico, mientras que $[\text{muestra}]_{\text{siRNA inespecífico}}$, representa la concentración de IL-6 en los sobrenadantes de las células expuestas al siRNA inespecífico (siEGFP).

Extracción y determinación de proteínas totales en lisados celulares

Para la extracción de proteínas, se lavaron las células con PBS frío y se añadió tampón RIPA (10 mM Tris HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% ácido desoxicólico; 1% Triton X-100; 0.1% SDS; 1 mM EDTA), suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (10 µl/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo; 10 µl/ml de una solución 100 mM de Na₃VO₄ y 6 µl/ml de aprotinina). Se rascaron las células para separarlas del soporte y romper las uniones entre células. Se agitó el lisado con un vórtex para homogeneizar, se incubó 30 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 15.000 xg, a 4 °C, durante 30 min. Se recogieron los sobrenadantes y se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó la técnica del BCA, procediendo según las instrucciones del fabricante. La determinación se realizó mediante un método de absorción colorimétrica en el multilector de microplacas, a una longitud de onda de 562 nm (longitud de onda de referencia 450 nm). El método de análisis cuantitativo se realizó mediante una curva patrón, utilizando diluciones seriadas de albúmina bovina de concentración conocida, como estándares.

Detección de proteínas mediante electroforesis y Western blot

Las muestras de proteína de los lisados celulares se mezclaron con el reactivo de Laemmli en proporción 1:1 y se cocieron a 110 °C durante 5 min. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización o se mantuvieron en hielo antes de cargarlas en un gel de poliacrilamida al 8%. Se realizó la SDS-PAGE para separar las proteínas según su peso molecular, cargando 8 µg de proteína totales por pocillo, utilizando los siguientes parámetros: 15 min a 70 V y 90 min a 110 V.

Para la identificación de las proteínas de interés en la muestra sometida a SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando una intensidad de 350 mA durante 90 min. Las membranas se bloquearon posteriormente a TA durante 1 h, usando como solvente tampón tris salino (TBS) 1X suplementado con 0,05% de Tween20 (TBS-T). Las condiciones de inmunodetección se recogen en la Tabla 4. El revelado de la actividad peroxidasa obtenida, se realizó por quimioluminiscencia, utilizando una mezcla 1:1 de *Immun-StarTM HRP Peroxide Buffer* e *Immun-StarTM HRP Luminol/Enhancer*.

TABLA 4. Resumen de anticuerpos y condiciones empleadas para la inmunodetección por *Western blot*.

Proteína	Solución de bloqueo	Anticuerpo primario	Referencia	Dilución	Tiempo de incubación	Temp. de incubación (°C)	Anticuerpo secundario	Referencia	Dilución	Tiempo de incubación	Temp. de incubación (°C)
IL-6R											
GP130	4% suero de burro y 5% BSA en TBS-T	Conejo anti-IL-6R	ab128008	1:200	Toda la noche	4	Cabra anti-conejo	sc-2004	1:2000	1 h	TA
STAT3	2% BSA en TBS-T	Ratón anti-GP130	MAB2281	1:160	Toda la noche	4	Burro anti-ratón	715-035-150	1:5000	1 h	TA
pSTAT3	4% suero de cabra y 5% BSA en TBS-T	Conejo anti-STAT3	9132S	1:2000	Toda la noche	4	Cabra anti-conejo	sc-2004	1:2000	1 h	TA
IL-17RA	4% suero de cabra y 5% BSA en TBS-T	Conejo anti-pSTAT3	9145P	1:1000	Toda la noche	4	Cabra anti-conejo	sc-2004	1:2000	1 h	TA
GAPDH	4% suero de burro y 5% leche en polvo en TBS-T	Conejo anti-IL-17RA	sc-30175	1:200	Toda la noche	4	Cabra anti-conejo	sc-2004	1:2000	1 h	TA
α-actinina	4% suero de burro y 5% BSA en TBS-T	Ratón anti-GAPDH	sc-51905	1:1000	Toda la noche	4	Burro anti-ratón	715-035-150	1:5000	1 h	TA
	4% suero de burro y 5% leche en polvo en TBS-T	Ratón anti-α-actinina	sc-17829	1:500	Toda la noche	4	Burro anti-ratón	715-035-150	1:5000	1 h	TA

BSA, albúmina de suero bovino; TBS-T, tampón tris salino + 0,05% Tween20; FBS, suero fetal bovino, TA, temperatura ambiente.

Inmundefección de proteínas en células y tejidos fijados

Detección de IL-17RA en células estimuladas por sobrenadantes bacterianos mediante inmunofluorescencia

Se emplearon las muestras de células expuestas a sobrenadantes bacterianos y fijadas como se explicó anteriormente. Se bloquearon las uniones inespecíficas con 4% de suero de burro en PBS. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario en dilución 1:50 en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C. Como anticuerpo secundario se empleó uno de burro anti-conejo, Alexa fluor488, en dilución 1:100 en PBS. Los núcleos se contratiñeron con yoduro de propidio en dilución 1:10.000 en PBS. Se empleó Vectashield como medio de montaje. Los controles negativos consistieron en muestras sin anticuerpo primario.

Se analizaron duplicados de cada condición, en tres experimentos independientes.

Localización ultraestructural del IL-17RA en células expuestas a IL-17A mediante marcaje con inmuno-oro

Se cultivaron células HCE en cubreobjetos de plástico y se expusieron a la IL-17A en concentración 20 ng/ml, empleando células no expuestas como control. Se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 2 h a 4 °C. Las muestras se sumergieron posteriormente durante 24 h en una solución de sacarosa en PBS, congelándose después en N₂ líquido. Se bloquearon las uniones inespecíficas en una solución de leche en polvo en PBS durante 30 min a TA. Se empleó el anticuerpo primario anti-IL-17RA en dilución 1:100 en una solución al 0,2% de BSA en PBS, incubándolo toda la noche a 4 °C. A continuación, se incubaron las muestras con el fragmento F(ab')₂ conjugado con oro coloidal, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras varios lavados, se fijaron las células en glutaraldehído al 2,5% durante 2 h a 4 °C. Posteriormente, se realizó una intensificación por plata durante 1,5 h y una post-fijación con 0,5% de OsO₄ en PBS durante 15 min, tras lo cual se incluyeron las muestras en resina Epon. Se obtuvieron secciones ultrafinas y se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión. El control negativo consistió en la omisión del anticuerpo primario.

Se analizaron duplicados de cada condición, en tres experimentos independientes.

Identificación del IL-17RA en tejidos humanos de la superficie ocular

Se obtuvieron muestras de tejidos de la superficie ocular humana de donantes cadáver que donaron por testamento al Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Universidad Martin Luther, Halle-Wittenberg, en Alemania, para fines de investigación o enseñanza, respetando las leyes vigentes en Alemania y en la Unión Europea. Este estudio contaba además con la aprobación institucional del comité ético de la Universidad de Halle-Wittenberg.

Se fijaron 6 muestras de córnea, 4 de limbo y otras 6 de conjuntiva en formalina al 4%, se incluyeron en parafina para obtener secciones de 7 μm y posteriormente se desparafinaron. Se bloquearon las uniones inespecíficas mediante 10 min de incubación con la solución comercial de bloqueo *Enzyme Block* y 1 h de incubación posterior con 5% de suero de cabra en TBS-T. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario anti-IL-17RA en dilución 1:100 en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C. Se empleó un anticuerpo secundario biotinilado cabra anti-conejo en dilución 1:100 en solución de bloqueo durante 30 min a TA. Para el revelado, se incubaron las muestras con la mezcla del kit *Vectastain ABC* durante 30 min y a continuación con 2% de diaminobencidina durante 5 min. Se contratiñeron los núcleos sumergiendo las muestras brevemente en hematoxilina. Como control positivo se usaron células HCE fijadas y expuestas a la IL-17. El control negativo consistió en la omisión del anticuerpo primario.

Extracción, cuantificación de ARNm y síntesis de ADN copia

Se extrajo la totalidad del ARN de los lisados celulares y se purificó mediante el empleo de pequeñas columnas de cromatografía del kit de extracción *RNAeasy-columns*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, se incubó 10 min a TA con DNasa para evitar la amplificación de ADN genómico. Se cuantificó el ARN total presente en las muestras mediante el *Quant-it™ RNA Assay Kit*, gracias al fluorómetro Qubit. Se sintetizó cDNA a partir de 1 μg de ARN, en una reacción de transcripción inversa, mediante el empleo del *Super Script® VILO™ cDNA synthesis Kit*, con los siguientes parámetros de amplificación: 10 min a 25 °C, 2 h a 42 °C y 5 min a 85 °C. Se almacenaron las muestras a -80 °C hasta su utilización.

qPCR

Se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm mediante qPCR para las siguientes moléculas: IL-6, IL-6R, GP130, STAT3, IL-17A, IL-17RA y GAPDH utilizando los niveles del ARN ribosomal de la proteína 18S como valores de referencia. Para llevar a cabo esta reacción se utilizó el reactivo *SYBR Green PCR Master Mix*, diluyendo 2 μl de muestra en un volumen total de 20 μl . Las secuencias de los cebadores específicos empleados para cada molécula de estudio, así como los ciclos de cada reacción y la longitud del fragmento amplificado se recogen en la Tabla 5. La señal de fluorescencia fue tomada después de cada ciclo de elongación a 72 °C.

El método de estudio elegido fue el semicuantitativo, que proporciona valores relativos a un control. La comparación entre muestras se realizó de la siguiente manera: los datos fueron normalizados mediante la resta del ciclo umbral (Ct) del gen endógeno de referencia (18S) al Ct de la muestra, para cada muestra ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{muestra}} - \text{Ct}_{18\text{S}}$). Esta diferencia se comparó a la misma diferencia de los controles de cada estudio, mediante la resta de estos últimos a los primeros ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{problema}} - \Delta\text{Ct}_{\text{control}}$).

Tratamiento de datos y análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para la comparación de múltiples grupos en el modelo de inflamación corneal por estimulación con citoquinas, se empleó un análisis de la varianza ANOVA, seguido del test de Bonferroni para comparar los datos dos a dos. En el modelo de herida se llevó a cabo un análisis estadístico basado en un diseño de experimentos de dos factores. Para contrastar las varianzas se empleó el test de Levene. A igualdad de varianzas, se llevó a cabo un análisis ANOVA para contrastar la igualdad de medias. Y si las varianzas eran diferentes, se empleó un test de Mood sobre la igualdad de las medianas basado en los rangos. Tanto en el modelo de inflamación por sobrenadantes bacterianos, como en el estudio del silenciamiento por NPs y siRNA, se comparó cada muestra problema con la muestra control mediante el test de la *t* de Student.

Para todos los casos, se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

TABLA 5. Resumen de cebadores específicos y condiciones empleadas para la cuantificación de ARNm por qPCR.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')		Amplificación			Longitud (pb)
			Ciclos	T (°C)	Tiempo (s)	
IL-6						
	sentido	GACAGCCACTCACCTCTTCA	1	94	180	171
				94	20	
	antisentido	CATCCATCTTTTCAGCCATC	36	59,1	30	
				72	30	
IL-6R						
	Referencia	HP200535	1	50	120	Desconocida
			1	95	600	
			40	95	15	
				60	60	
GP130						
	Referencia	HP205920	1	50	120	Desconocida
			1	95	600	
			40	95	15	
				60	60	
STAT3						
	Referencia	HP231378	1	50	120	Desconocida
			1	95	600	
			40	95	15	
				60	60	
IL-17A						
	Referencia	PPH00537B	1	50	120	Desconocida
			1	95	600	
			40	95	15	
				60	60	
IL-17RA						
	Referencia	PPH00983A	1	50	120	Desconocida
			1	95	600	
			40	95	15	
				60	60	
GAPDH						
	sentido	GAACGTGAAGGTCGGAGTCAAC	1	50	120	229
			1	94	180	
				94	20	
	antisentido	CTGGAAGATGGTGATGGGATTC	40	59	33	
				72	40	
18S						
	sentido	ACTCAACAGGGAAACCTCAGC	1	50	120	250
			1	94	180	
				94	20	
	antisentido	CGCTCCACCAACTAAGAACGG	40	59	33	
				72	40	

Los cebadores cuyas referencias comienzan por HP fueron de Origene Technologies y los que comienzan por PPH fueron de SABiosciences. La información ausente no la proporcionaron las respectivas casas comerciales.



RESULTADOS

“La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es ‘¡Eureka!’ sino ‘Qué curioso...’ .”

(I. Asimov)

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not ‘Eureka!’, but ‘That’s funny...’”

A continuación, se presentan los resultados obtenidos utilizando cada uno de los modelos de inflamación *in vitro* en células epiteliales corneales. Para un mejor seguimiento de los mismos, se ha estructurado esta sección según los tres modelos empleados:

1. Modelo de inflamación corneal mediante estimulación con citoquinas
2. Modelo de herida corneal
3. Modelo de inflamación corneal por sobrenadantes bacterianos.

Para finalizar, se presentan los resultados del silenciamiento de la IL-6.

Modelo de inflamación corneal inducida por exposición a citoquinas

Expresión de proteína secretada

Se analizó la expresión de diferentes moléculas de la vía de señalización de la IL-6, secretadas al medio de cultivo por las células HCE, en los sobrenadantes de las mismas recogidos a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h), mediante la técnica de ELISA. Se cuantificó su expresión en condiciones basales (control) y tras la estimulación con diferentes citoquinas: IL-6, IL-10, IL-17 y combinaciones de las mismas: IL-6 + IL-10 e IL-17 + IL-10.

- Expresión de la fracción soluble del receptor de la IL-6 (sIL-6R)

Como se observa en la Figura 10, la secreción basal del sIL-6R en las muestras control fue dependiente del tiempo: su expresión fue más elevada en los sobrenadantes recogidos tras periodos de tiempo más largos. De igual forma, la secreción de sIL-6R fue dependiente del tiempo en las condiciones de estimulación con diferentes citoquinas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de proteína secretadas en las diferentes condiciones de estimulación ni con el control a ninguno de los tiempos de estudio. Sin embargo, a las 72 h, se observó una tendencia de disminución de la secreción respecto al control en muestras que habían sido expuestas a la IL-17, sin llegar a ser estadísticamente significativa.

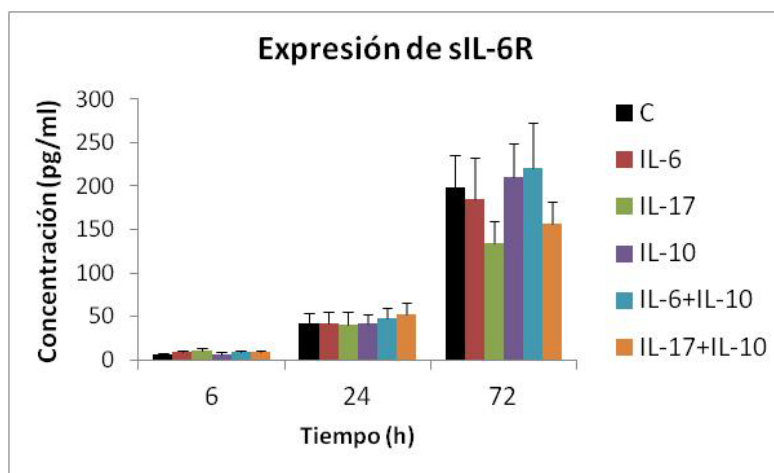


FIGURA 10. Expresión del sIL-6R en los sobrenadantes de las células HCE estimuladas con diversas citoquinas, analizada por ELISA.

- Expresión de la fracción soluble de la glicoproteína 130 (sGP130)

En la Figura 11 se observa que tanto la secreción basal de la sGP130 en las muestras control, como su secreción en condiciones de estimulación con las diferentes citoquinas fueron dependientes del tiempo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de proteína secretada en las diferentes condiciones de estimulación ni con el control a ninguno de los tiempos de estudio. Sin embargo, a las 72 h, se observó una tendencia de disminución de la secreción respecto al control en muestras que habían sido expuestas a IL-6, IL-17 y a una combinación de IL-17 + IL-10, sin llegar a ser estadísticamente significativa.

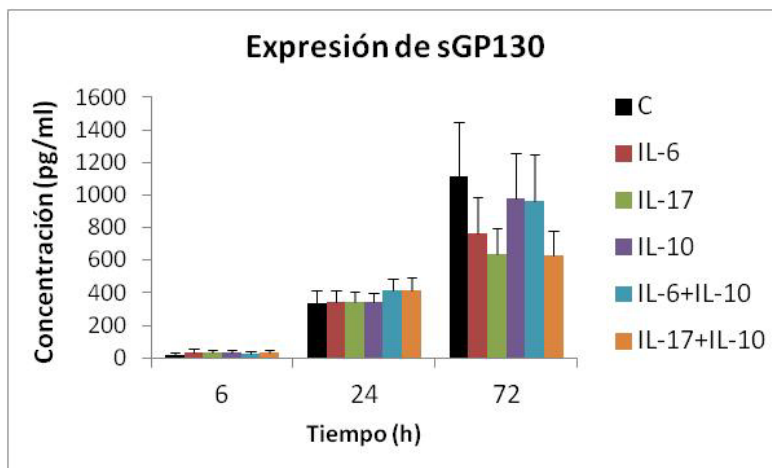


FIGURA 11. Expresión de la sGP130 en los sobrenadantes de las células HCE estimuladas con diversas citoquinas, analizada por ELISA.

Expresión citoplasmática de proteína

Se analizó la expresión citoplasmática de diferentes moléculas de la vía de señalización de la IL-6, en lisados celulares recogidos a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h) mediante electroforesis y *Western blot*. Se cuantificó su expresión en condiciones basales (control) y tras la estimulación con IL-6, IL-17, IL-10 y combinaciones de las mismas: IL-6 + IL-10; IL-17 + IL-10.

- Expresión del receptor de la IL-6 (IL-6R)

En la inmunodetección del IL-6R se observó una banda en 55 kDa tanto para las muestras control como para las muestras estimuladas. Se observó una disminución en la expresión del IL-6R entre las 6 h y las 24 h, en condiciones basales. A las 6 h se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión del IL-6R en las muestras estimuladas con IL-17, mientras que en las demás condiciones la expresión se mantuvo más o menos similar al control. A las 24 h, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa, mientras que a las 72 h la expresión del IL-6R en las muestras expuestas a la combinación de IL-17 + IL-10 fue estadísticamente menor que en el control y que en las muestras expuestas a la IL-10 y a la combinación de IL-6 + IL-10 (Figura 12).

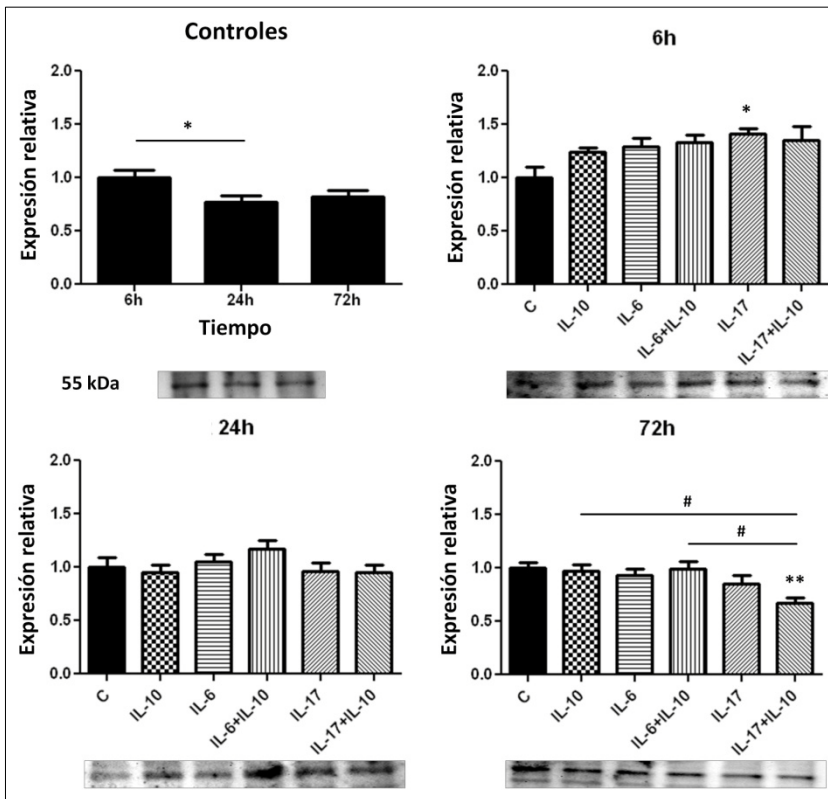


FIGURA 12. Expresión del IL-6R en condiciones basales y tras las estimulaciones, determinada por electroforesis y *Western blot*. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control se representan por * ($p \leq 0,05$) ó ** ($p \leq 0,01$); las diferencias entre grupos se representan por # ($p \leq 0,05$).

- Expresión de la glicoproteína 130 (GP130)

En la inmunodetección de la GP130 se obtuvo una banda en 130 kDa tanto para las muestras control como para las muestras estimuladas. La expresión en condiciones basales de GP130 fue mayor a 6 h que a 24 y a 72 h. En las muestras recogidas a 6 h, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y las células estimuladas con IL-6, IL-17 y las combinaciones de IL-6 + IL-10 y de IL-17 + IL-10, en las cuales la expresión sufría un incremento de 1,6 veces, 1,7 veces, 2 veces y 2,1 veces, respectivamente. La expresión de GP130 también aumentó significativamente en las muestras expuestas a la combinación de la IL-10 con las otras dos citoquinas, respecto a las expuestas solamente a la IL-10. A las 24 h, la expresión de GP130 fue aproximadamente 1,5 veces mayor que en el control en todas las condiciones,

excepto en las muestras expuestas a la IL-6. A las 72 h este aumento significativo sólo se mantuvo en las muestras expuestas a la IL-17 (Figura 13).

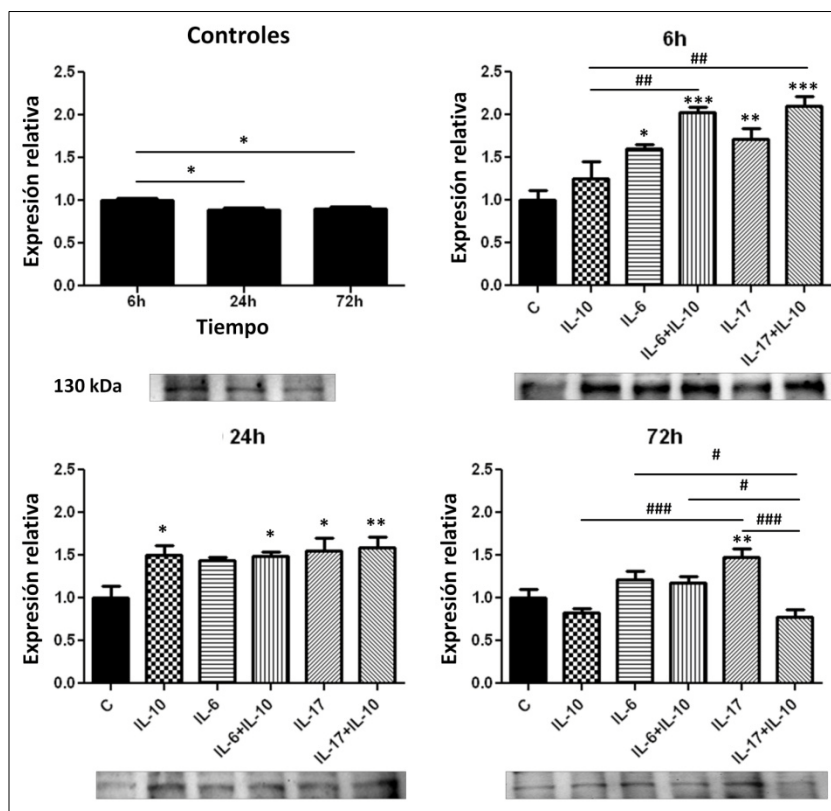


FIGURA 13. Expresión de la GP130 en condiciones basales y tras las estimulaciones, determinada por electroforesis y *Western blot*. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control se representan por * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) ó *** ($p \leq 0,001$); las diferencias entre grupos se representan por # ($p \leq 0,05$), ## ($p \leq 0,01$); ó ### ($p \leq 0,001$).

- Expresión del transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3)

En la inmunodetección del mediador inactivado STAT3 se obtuvo una banda en 88 kDa tanto para las muestras control como para las muestras estimuladas. La expresión basal de STAT3 fue menor a las 24 h que a las 6 h, pero a las 72 h se recuperaron los niveles encontrados a las 6 h, incluso un poco superiores, sin llegar a ser un aumento estadísticamente significativo. Ni a las 6 h ni a las 24 h se encontraron variaciones en la expresión del STAT3 entre ninguna de las

condiciones de estimulación, ni entre éstas y el control. A las 72 h, la expresión del STAT3 fue 1,6 veces mayor en las células expuestas a la IL-6 que en el control, siendo este aumento estadísticamente significativo. En las demás condiciones no se encontraron diferencias respecto al control (Figura 14).

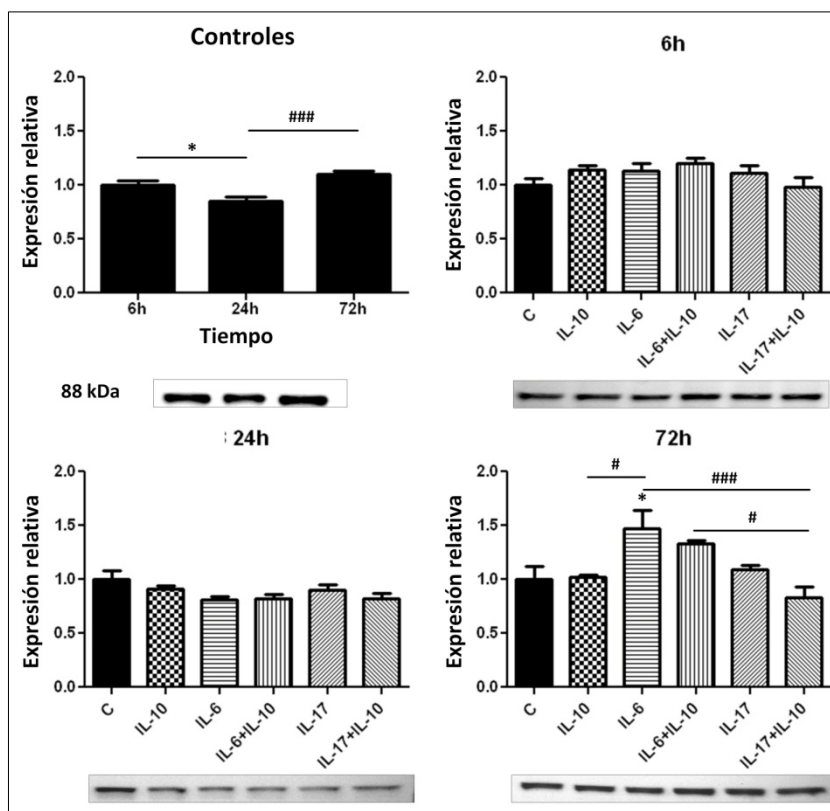


FIGURA 14. Expresión del STAT3 en condiciones basales y tras las estimulaciones, determinada por electroforesis y *Western blot*. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control se representan por * ($p \leq 0,05$); las diferencias entre grupos se representan por # ($p \leq 0,05$) ó ### ($p \leq 0,001$).

- Expresión del STAT3 fosforilado (pSTAT3)

En la inmunodetección del mediador fosforilado (activado) pSTAT3 se obtuvo una banda en 88 kDa tanto para las muestras control como para las muestras estimuladas. La expresión del pSTAT3 se mantuvo constante entre las 6 h y las 24 h, pero aumentó 1,5 veces a las 72 h. A las 6 h de estimulación, su expresión aumentó 1,6 veces en las células expuestas a la IL-6 y a la combinación de IL-6 + IL-10. A las 24 h se encontró un aumento

estadísticamente significativo respecto al control en las muestras expuestas a la IL-6, la IL-10 y la combinación de ambas, encontrándose en estas últimas el mayor aumento (1,4 veces, $p \leq 0,01$). A las 72 h la única diferencia estadísticamente significativa se encontró en las muestras estimuladas con la combinación de IL-6 + IL-10, en las cuales se observó un aumento de 1,4 veces respecto al control (Figura 15).

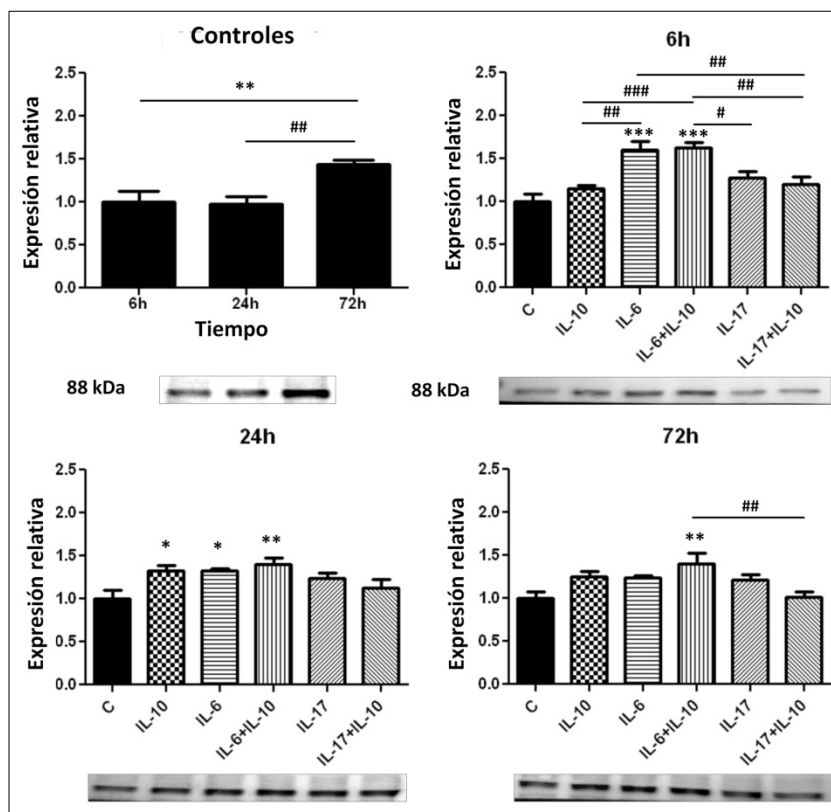


FIGURA 15. Expresión del pSTAT3 en condiciones basales y tras las estimulaciones, determinada por electroforesis y *Western blot*. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control se representan por * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) ó *** ($p \leq 0,001$); las diferencias entre grupos se representan por # ($p \leq 0,05$), ## ($p \leq 0,01$) ó ### ($p \leq 0,001$).

- Expresión del receptor A de la IL-17 (IL-17RA)

Se cuantificó la expresión del IL-17RA en muestras estimuladas con IL-17 y en muestras control mediante *Western blot*. Los datos se incluyen en el apartado de estimulación con sobrenadantes bacterianos.

Expresión de ARNm

Se analizó la expresión a nivel de ARNm de diferentes moléculas de la vía de señalización de la IL-6, en lisados celulares recogidos a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h). Se cuantificó su expresión en condiciones basales (control) y tras la estimulación con diferentes citoquinas: IL-6, IL-10, IL-17 y con combinaciones de las mismas.

- Expresión del IL-6R

En condiciones basales, la expresión del ARNm del IL-6R no sufrió cambios estadísticamente significativos a los diferentes tiempos de estudio, aunque se observó una tendencia de aumento a las 72 h. No se observaron variaciones estadísticamente significativas en su expresión en ninguna de las condiciones de estimulación estudiadas (Figura 16).

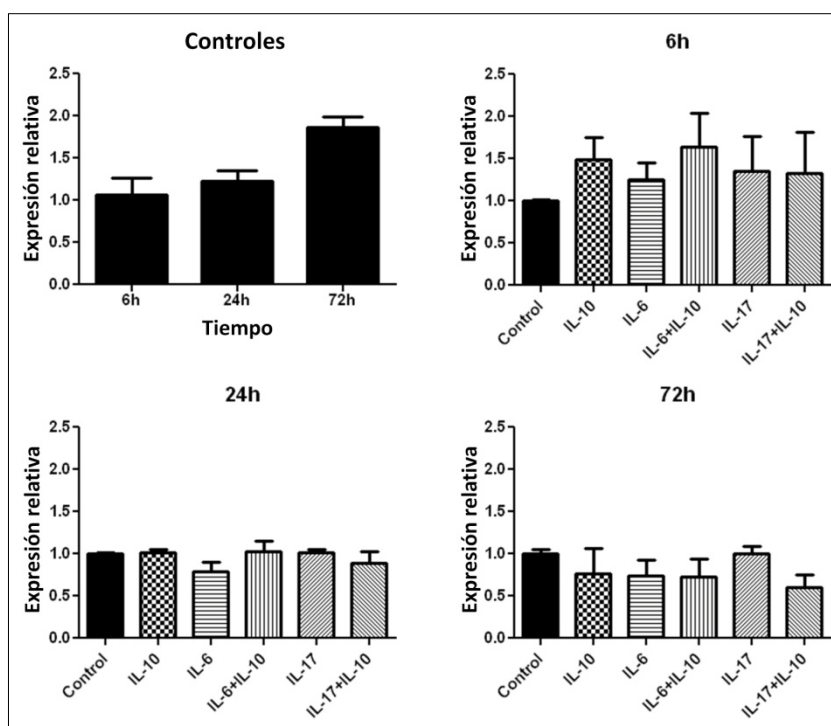


FIGURA 16. Expresión del ARNm del IL-6R en condiciones basales y tras las estimulaciones, determinada por qPCR.

- Expresión de la GP130

La expresión basal del ARNm de la GP130 se mantuvo constante entre las 6 h y las 24 h, pero aumentó 1,6 veces a las 72 h. No se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguna de las condiciones, a ninguno de los tiempos estudiados, excepto en las células expuestas a la IL-6 a las 24 h, en las cuales la expresión del ARNm de la GP130 fue 0,8 veces la del control (Figura 17).

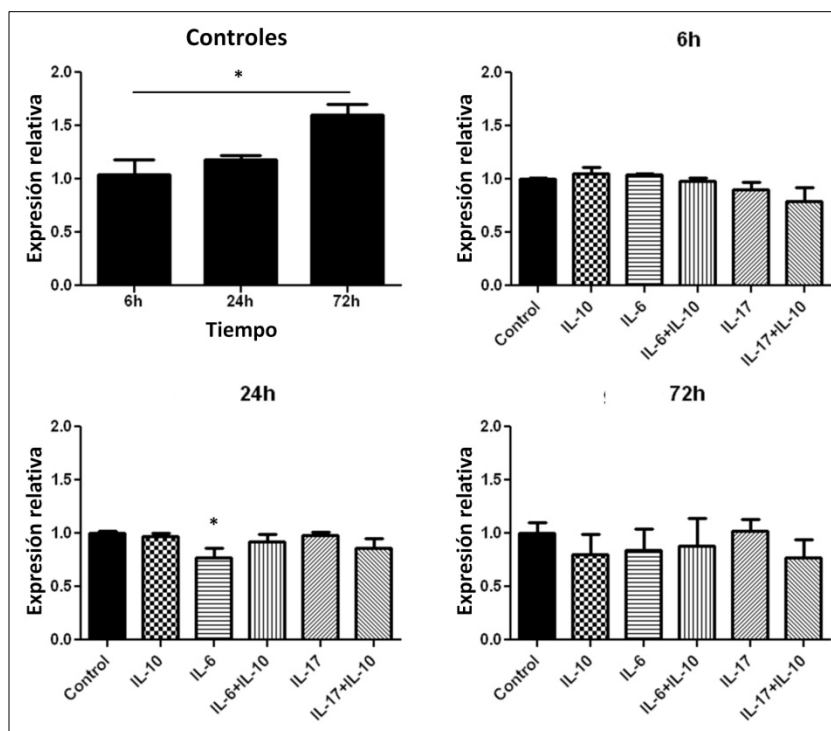


FIGURA 17. Expresión del ARNm de la GP130 en condiciones basales y tras las estimulaciones, determinada por qPCR. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control o entre grupos se representan por *($p < 0,05$).

- Expresión del STAT3

Se observó que la expresión basal del ARNm del STAT3 aumentaba en función del tiempo, con diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos temporales. Sin embargo, la expresión del STAT3 a cada tiempo se mantuvo constante independientemente de la condición de estimulación estudiada (Figura 18).

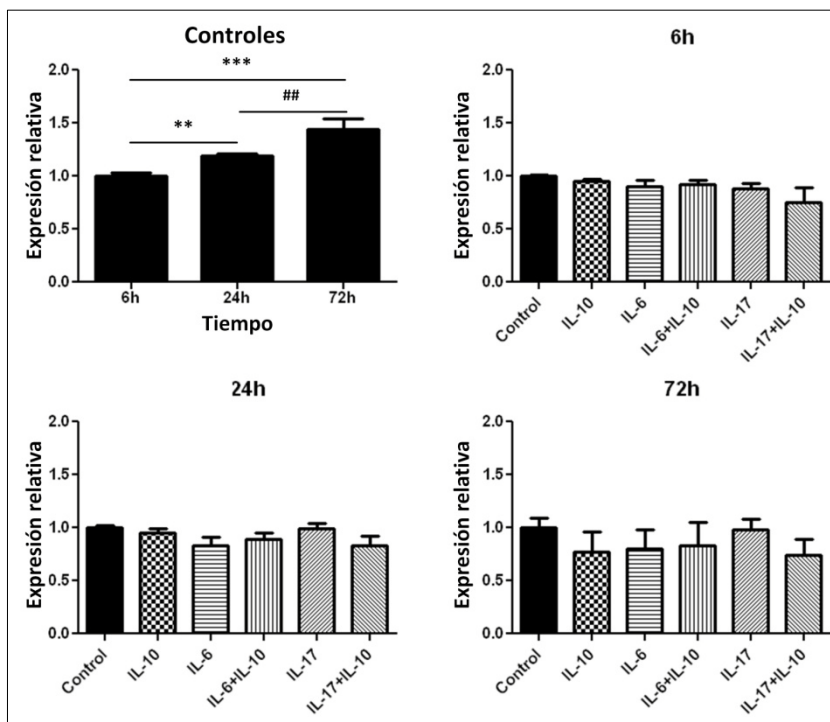


FIGURA 18. Expresión del ARNm del STAT3 en condiciones basales y tras las estimulaciones, determinada por qPCR. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control se representan por **($p \leq 0,01$) ó ***($p \leq 0,001$) y entre grupos se representan por ##($p \leq 0,01$).

Resumen de resultados

Los resultados obtenidos en este apartado se recogen de forma resumida en la Tabla 6.

TABLA 6. Resumen de resultados del modelo de inflamación corneal inducida por exposición a citoquinas.

Moléculas analizadas	Condiciones de estimulación de las células HCE														
	IL-6			IL-17			IL-10			IL-6+IL-10			IL-17+IL-10		
	Proteína	mRNA		Proteína	mRNA		Proteína	mRNA		Proteína	mRNA		Proteína	mRNA	
IL-6R			↑ a 6 h										↓ a 72h		
sIL-6R		-			-			-			-				-
GPI30	↑ a 6 h	↓ a 24 h	↑ a 6, 24 y 72 h			↑ a 24 h			↑ a 6 y 24 h				↑ a 6 y 24 h		
sGPI30		-			-			-			-				-
STAT3	↑ a 72 h														
pSTAT3	↑ a 6 y 24 h	-			-	↑ a 24 h		-	↑ a 6, 24 y 72 h		-				-

La tabla recoge en cada columna cada una de las condiciones de estimulación empleadas en el estudio y en cada fila las moléculas cuya expresión ha sido analizada. Las casillas blancas indican que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El guión que aparece en algunas casillas indica que el ensayo no procedía. Las flechas azules hacia arriba indican un aumento estadísticamente significativo respecto al control en la expresión de la molécula correspondiente a los tiempos de estudio indicados; las flechas rojas hacia abajo indican una disminución estadísticamente significativa respecto al control en la expresión de la molécula correspondiente a los tiempos de estudio indicados.

Modelo de herida corneal

Velocidad de cicatrización en un medio pro y/o antiinflamatorio

La anchura y el área de una herida producida en células HCE estimuladas mediante diversas citoquinas se midieron en imágenes tomadas a diferentes tiempos. En primer lugar se observó que la anchura de la herida y el área de la misma eran dependientes. Por lo tanto, en este trabajo sólo se expone el análisis de la anchura de la herida, omitiendo los datos del área.

La anchura inicial de las heridas, calculada como la media de las medidas tomadas en todas las condiciones de estimulación, fue de $570,57 \pm 5,75 \mu\text{m}$. El tiempo fue una variable de la cual dependía la anchura de la herida, ya que a medida que transcurría el tiempo, la anchura de las heridas en todas las condiciones iba disminuyendo. Sin embargo, la velocidad del cierre de la herida varió en función de las condiciones a las cuales se expusieron las células y del tiempo considerado (Figura 19).

Considerando T0 como el momento inicial, es decir, no más de 20 min después de haber realizado el *scratch* y sometido cada muestra a las condiciones de estimulación de estudio, se observó que la anchura media de las heridas en las células expuestas a la IL-6 fue significativamente menor que la media total y, además, fue significativamente menor que la anchura de las heridas de las células expuestas a las demás condiciones de estimulación: control, IL-10 y la combinación IL-6 + IL-10 ($p \leq 0,05$) (Figura 20).

A las 4 h tras el *scratch* (T4), las muestras expuestas a la IL-6 tenían una anchura de herida significativamente menor que la anchura media total. Comparando los datos dos a dos, la anchura media de la herida de células expuestas a la IL-6 fue significativamente menor que la de las células en todas las demás condiciones. Tanto a T0 como a T4, las heridas de las células expuestas a la IL-10 o a la combinación de IL-6 + IL-10 no experimentaron variación significativa respecto a las heridas del control.

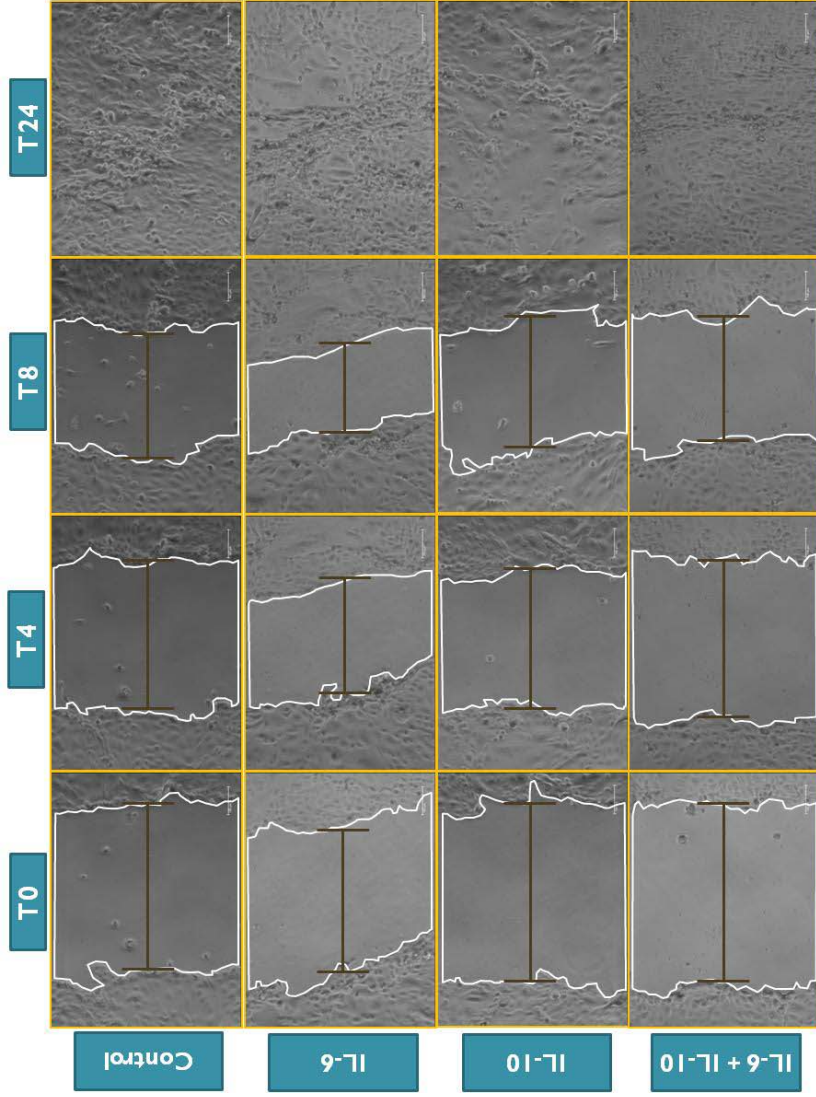


FIGURA 19. Disminución de la anchura de las heridas en función del tiempo en el modelo de herida corneal. Se muestra una imagen representativa para cada condición, a cada tiempo de estudio. La barra blanca en la esquina inferior derecha de las imágenes representa 100 μm .

RESULTADOS

A las 8 h tras el *scratch* (T8), tanto las células expuestas a la IL-6 como las expuestas a la IL-10 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control, aunque ninguna de las dos fue significativamente diferente de la media total. Sin embargo, la combinación de IL-6 + IL-10 no incrementó la velocidad de cicatrización de la herida, pues no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la anchura de la herida en las células control y las expuestas a la combinación de IL-6 + IL-10 a ningún tiempo de estudio.

Todas las heridas, independientemente de la condición a la que estuvieran expuestas, habían cerrado completamente a las 24 h.

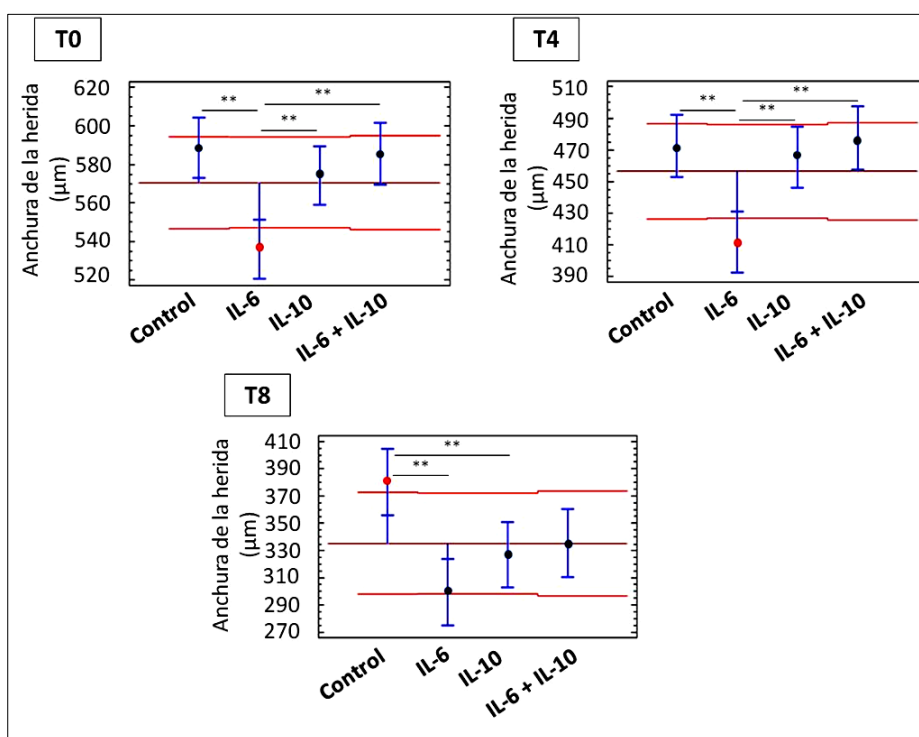


FIGURA 20. Anchura media de las heridas \pm SEM a diferentes tiempos. En cada gráfico se representa la media de la anchura de las heridas para cada condición y se compara con la media total de todas las condiciones (representada por la línea horizontal). Los límites de significación al 95% están representados como líneas rojas por encima y por debajo de esta media. Los valores de las medias que quedan por encima o por debajo de estas líneas son estadísticamente significativos respecto a la media total ($p \leq 0,05$). Las diferencias entre grupos se señalan con ** ($p \leq 0,01$).

Expresión de mediadores de la vía de señalización de la IL-6

Se recogieron alícuotas de los sobrenadantes de los cultivos del modelo de herida corneal expuestos a las diferentes condiciones, para analizar la expresión de mediadores de la vía de señalización de la IL-6 mediante la técnica de ELISA.

Se observó que tanto la secreción del sIL-6R como la de la sGP130 fueron dependientes del tiempo, ya que su concentración en el medio fue mayor a medida que aumentaba el tiempo de incubación, independientemente de la condición a la cual estuvieran expuestas las células (Figura 21). No se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las condiciones y el control para ninguna de las dos moléculas.

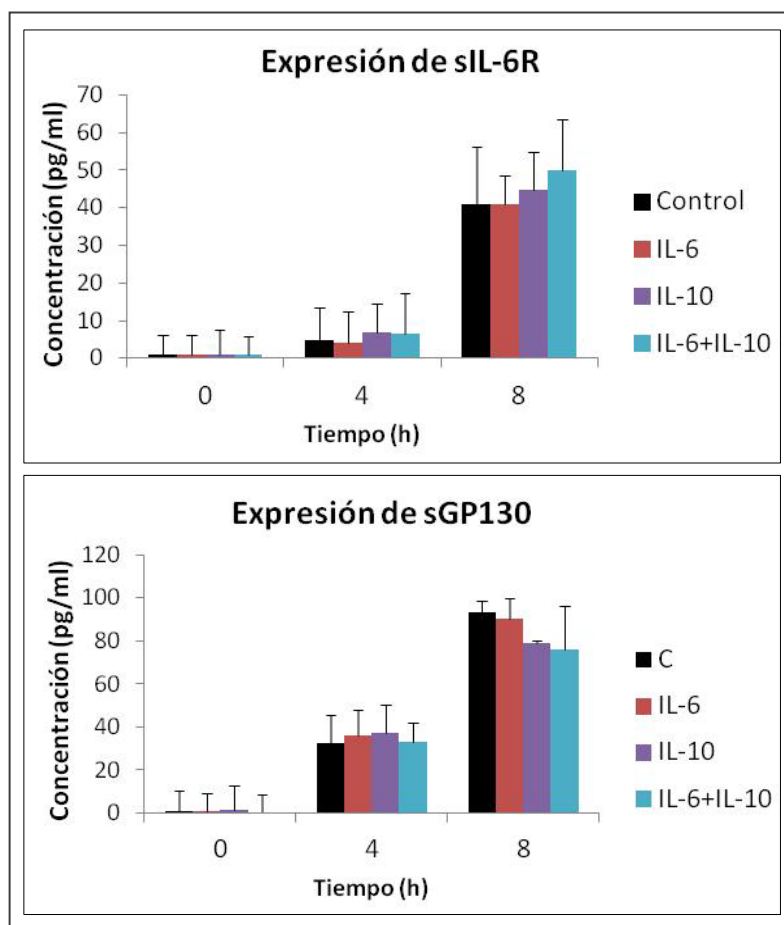


FIGURA 21. Expresión del sIL-6R y la sGP130 en sobrenadantes de células HCE sometidas al modelo de herida corneal, bajo diferentes condiciones de estimulación.

Velocidad de cicatrización en condiciones de inhibición de la proliferación

Con el fin de determinar el efecto de la proliferación celular sobre la cicatrización de la herida en las células epiteliales corneales, se trataron las células con el agente alquilante de ADN mitomicina C (MMC). Se muestran a continuación los resultados de la cicatrización en células tratadas con MMC en condiciones control y en las células expuestas a la IL-6, ya que fueron las que más diferencias experimentaron en el ensayo anterior.

La anchura inicial de las heridas, calculada como la media de las medidas tomadas en las distintas condiciones de estimulación, fue de $559,8 \pm 4,74 \mu\text{m}$. La velocidad del cierre de la herida varió en función de las condiciones a las cuales se expusieron las células, del tiempo considerado y de que las células hubieran sido previamente tratadas o no con MMC (Figura 22).

La observación al microscopio de las muestras reveló que el número de células muertas era elevado en las que habían sido tratadas con MMC, desde el T8. Estas células muertas se identificaron mediante contraste de fases por ser redondas y estar rodeadas de un halo brillante. La mayoría de células muertas se encontraban en el hueco libre de células en monocapa marcado por la herida. La presencia de numerosas células muertas a T24 hizo imposible la toma de una micrografía clara, por lo que se lavaron los pocillos con medio de cultivo sin suplementos, con el fin de arrastrar las células muertas (despegadas), antes de hacer la fotografía. Por este motivo, en las imágenes a T24 aparece un menor número de células en el hueco de la herida que a T8.

Comparando cada una de las muestras de herida tratadas con MMC con las muestras correspondientes sin MMC, no se encontraron diferencias significativas a T0 entre ambas. Curiosamente, las heridas en el control sin MMC tuvieron una anchura mayor que en las demás condiciones (Figura 23).

A T4, las muestras expuestas a IL-6 + MMC tuvieron una anchura de herida mayor que la anchura de la herida del control y que la anchura de la herida del control tratado con MMC. Además, se encontró una diferencia significativa estadísticamente entre las muestras estimuladas con IL-6 y pretratadas con MMC y las muestras solamente expuestas a la IL-6 ($p \leq 0,001$). Las muestras del control y del control pretratadas con MMC mostraron una anchura de herida similar.

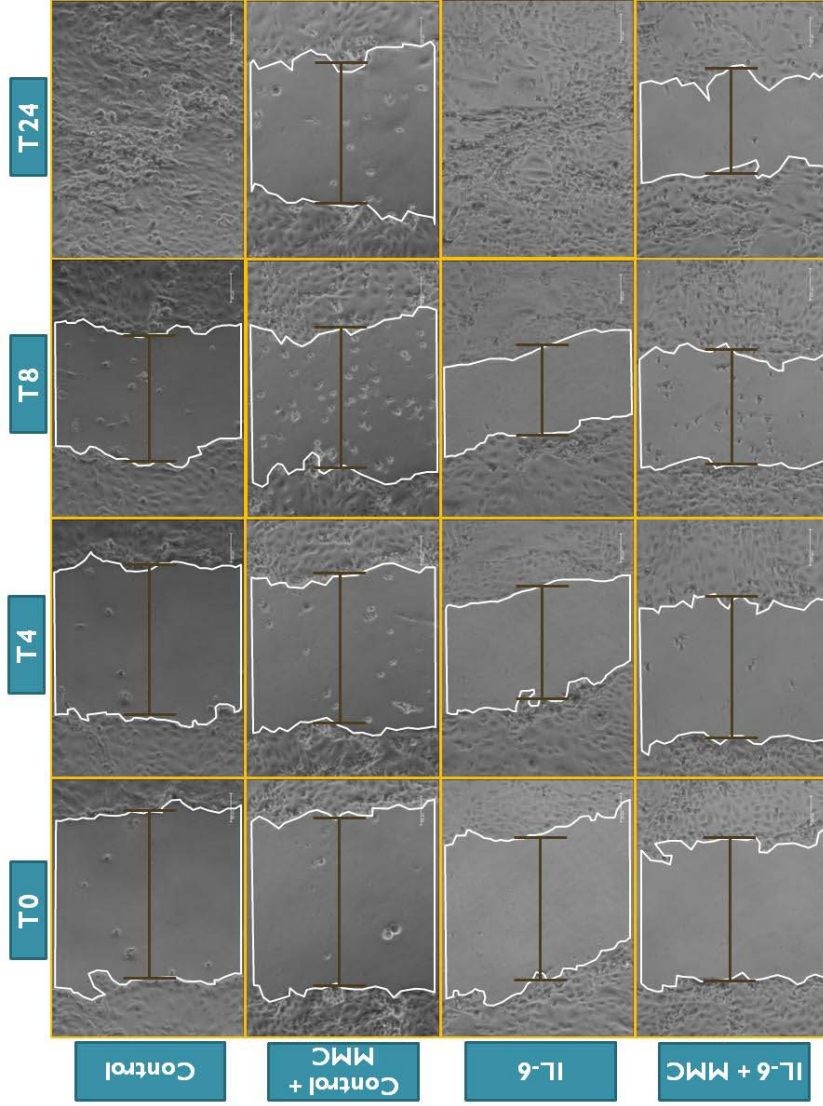


FIGURA 22. Efecto de la MMC en la cicatrización en el modelo de herida corneal. Se muestra una imagen representativa para cada condición, a cada tiempo de estudio. La barra blanca en la esquina inferior derecha de las imágenes representa 100 μm .

RESULTADOS

A T8, la anchura de las heridas de las células tratadas con MMC fue mayor que la anchura de las heridas de las células sin tratar, expuestas a las mismas condiciones, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en ambos casos ($p \leq 0,001$).

La mayor diferencia encontrada entre las células tratadas con MMC y las que no estaban tratadas, fue que a las 24 h tras el *scratch* (T24), las heridas de las células pre-tratadas con MMC no se habían cerrado. Se hizo un seguimiento de estas muestras hasta las 48 h, pero transcurrido ese tiempo las heridas aún no habían cicatrizado por completo.

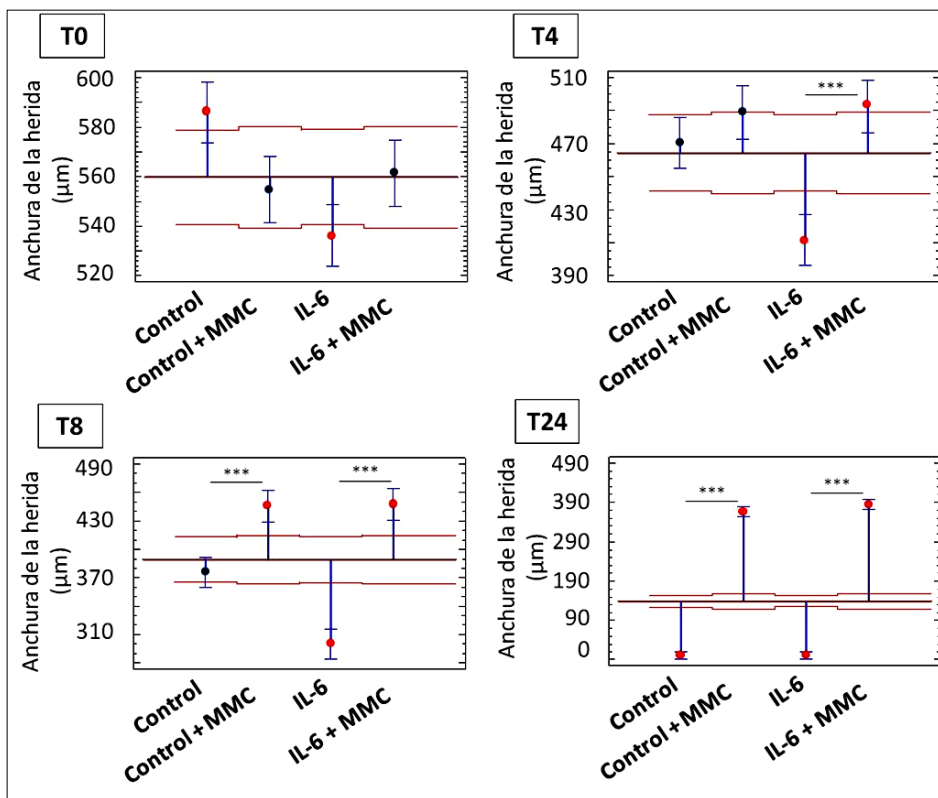


FIGURA 23. Anchura media de las heridas \pm SEM a diferentes tiempos. Las medias situadas por encima o por debajo de los límites de significación (en rojo) son estadísticamente diferentes de la media total ($p \leq 0,05$). Las diferencias entre grupos contrastados dos a dos se indican mediante ***($p \leq 0,001$).

Identificación de células proliferativas en los bordes y en zonas distantes de la herida

Se incubaron las células a las que se había realizado el *scratch* con el análogo de timina EdU con el fin de visualizar las células proliferativas, que eran las que incorporaban la EdU en su ADN de nueva síntesis. Se comparó el porcentaje de células proliferativas en los bordes de la herida con las que se encontraban en zonas más alejadas de ella, en monocapa celular, para cada tiempo, en las condiciones estudiadas (Figura 24).

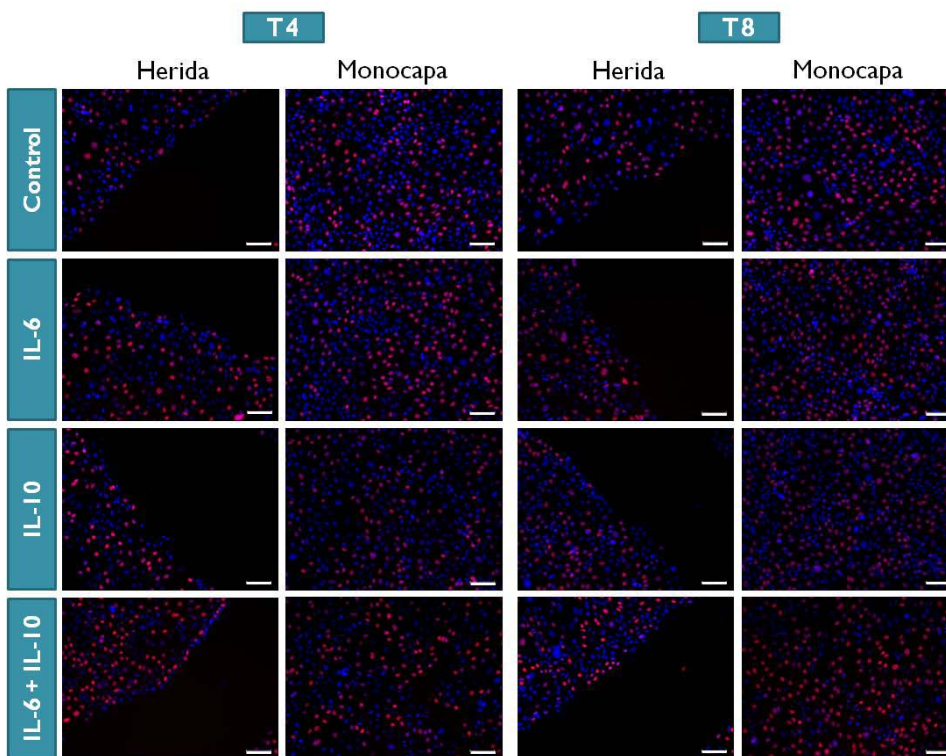


FIGURA 24. Comparación de la cantidad de células proliferativas marcadas con EdU en los bordes de la herida y en zonas de la monocapa distantes de ella. Se muestra una imagen representativa para cada condición. Las imágenes correspondientes a T1 no se muestran debido a las altas condiciones de exposición a las que se tuvieron que someter para poder visualizar el marcaje por EdU. La barra en la esquina inferior derecha de las imágenes representa 100 μm .

RESULTADOS

El número de células proliferativas aumentó en función del tiempo, pero no se encontró una relación con las distintas condiciones de estimulación, excepto en un caso. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la estimulación con IL-6 + IL-10 a T8 en la zona de la monocapa, de tal forma que la proliferación de las células estimuladas con IL-6 + IL-10 fue un 8% superior a la proliferación de las células control ($p \leq 0,001$) y un 6% y un 7% superior a la proliferación de las células estimuladas con IL-6 y con IL-10, respectivamente ($p \leq 0,01$). La estimulación con IL-6 + IL-10 no produjo este mismo efecto en los bordes de la herida (Figura 25).

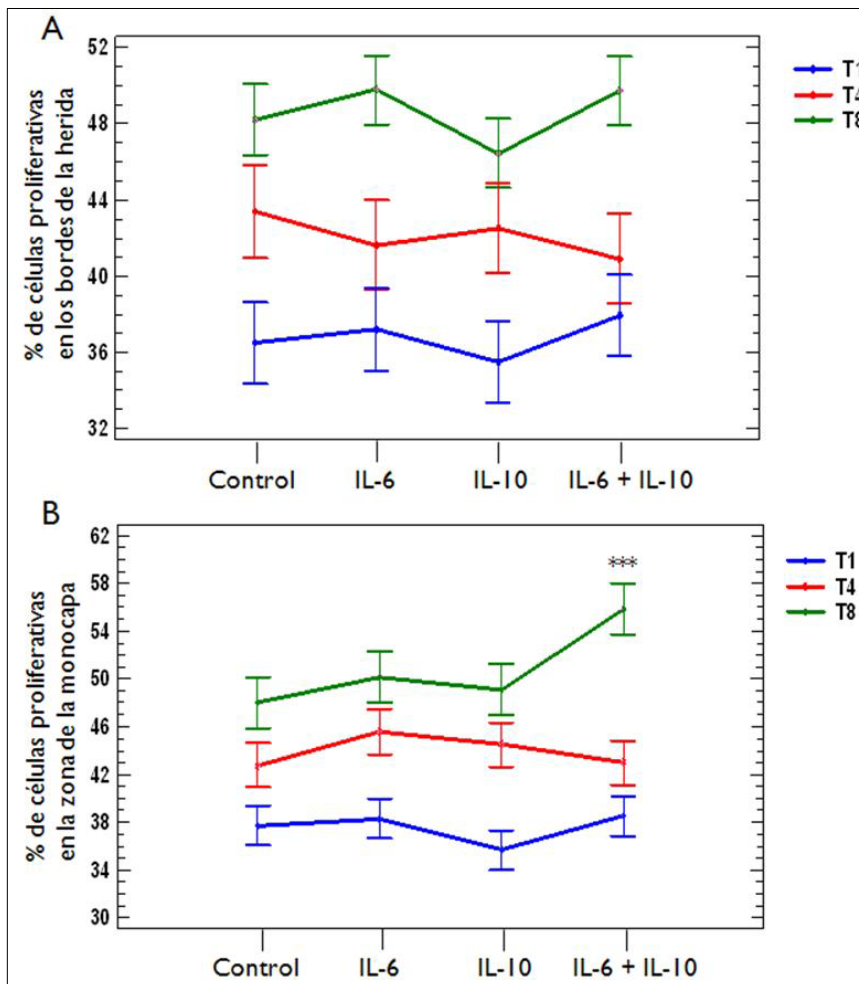


FIGURA 25. Comparación del porcentaje de células proliferativas para cada condición de estimulación, en (A) los bordes de la herida o (B) en zonas de la monocapa distantes de ella. Las diferencias estadísticamente significativas respecto al control se representan mediante *** ($p \leq 0,001$).

Por otra parte, considerando solamente el factor del tiempo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje medio de células proliferativas en la monocapa y en los bordes de la herida a los tiempos T1 y T4 (alrededor de 37% a T1 y de 43% a T4). Sin embargo, a T8, el porcentaje de células proliferativas en la monocapa fue un 2,3% significativamente superior ($p \leq 0,05$) al porcentaje de células proliferativas en los bordes de la herida (50,8% y 48,5% de proliferación, respectivamente). No se estudió el porcentaje de células proliferativas a las 24 h por estar las heridas completamente cicatrizadas.

El porcentaje total de células proliferativas aumentaba en función del tiempo. Se obtuvo, entre T1 y T4, un aumento del 6,4% de células proliferativas ($p \leq 0,001$) y entre T4 y T8 un aumento del 6,8% de células proliferativas ($p \leq 0,001$) en la monocapa celular. Mientras tanto, en los bordes de la herida, el aumento de células proliferativas entre T1 y T4 fue de 5,3% ($p \leq 0,001$) y entre T4 y T8 de 6,4% ($p \leq 0,001$). Estos resultados se recogen en la Tabla 7.

TABLA 7. Comparación de la proliferación en los diferentes tiempos, contrastados dos a dos, para las células situadas en las dos zonas consideradas.

Zona	Contraste de medias	Significación	Diferencia (%)
Monocapa	T1-T4	***	6,39
	T4-T8	***	6,83
	T1-T8	***	13,22
Bordes de la herida	T1-T4	***	5,30
	T4-T8	***	6,45
	T1-T8	***	11,75

La significación estadística se indica mediante ***($p \leq 0,001$). Una diferencia positiva indica que la proliferación es mayor en el segundo tiempo indicado.

Además, en la Tabla 8, se acompañan los resultados referentes a los incrementos en el porcentaje de células proliferativas en los tramos de tiempo estudiados para cada condición de estimulación, tanto en la zona de los bordes de la herida como en la de la monocapa distante de ella.

TABLA 8. Comparación de la proliferación en los diferentes tiempos, contrastados dos a dos, para las células control y las estimuladas con IL-6, IL-10 y la combinación de ambas.

Condición de estimulación	Contraste de medias	Significación	Diferencia
Control	T1-T4	***	5,72
	T4-T8	***	5,09
	T1-T8	***	10,81
IL-6	T1-T4	***	6,18
	T4-T8	***	5,96
	T1-T8	***	12,13
IL-10	T1-T4	***	8,13
	T4-T8	***	4,34
	T1-T8	***	12,47
IL-6 +IL-10	T1-T4	*	3,88
	T4-T8	***	11,32
	T1-T8	***	15,20

La significación estadística se indica mediante *($p \leq 0,05$) ó *** ($p \leq 0,001$). Una diferencia positiva indica que la proliferación es mayor en el segundo tiempo indicado.

Valoración del componente de migración celular en el cierre de la herida corneal *in vitro*

Se realizó un estudio para valorar la contribución de la migración celular al cierre de la herida en el modelo de herida corneal mediante el marcaje del citoesqueleto con un anticuerpo anti α -actinina y con faloidina, una toxina que marca los filamentos de actina (Figura 26). Se realizó el marcaje del citoesqueleto en muestras fijadas a los mismos tiempos que en el estudio anterior: T1, T4 y T8. Por limitaciones de la técnica, el marcaje simultáneo con la EdU y la faloidina era imposible, por eso se empleó el marcaje de α -actinina para la detección simultánea de proliferación y migración (Figura 27).

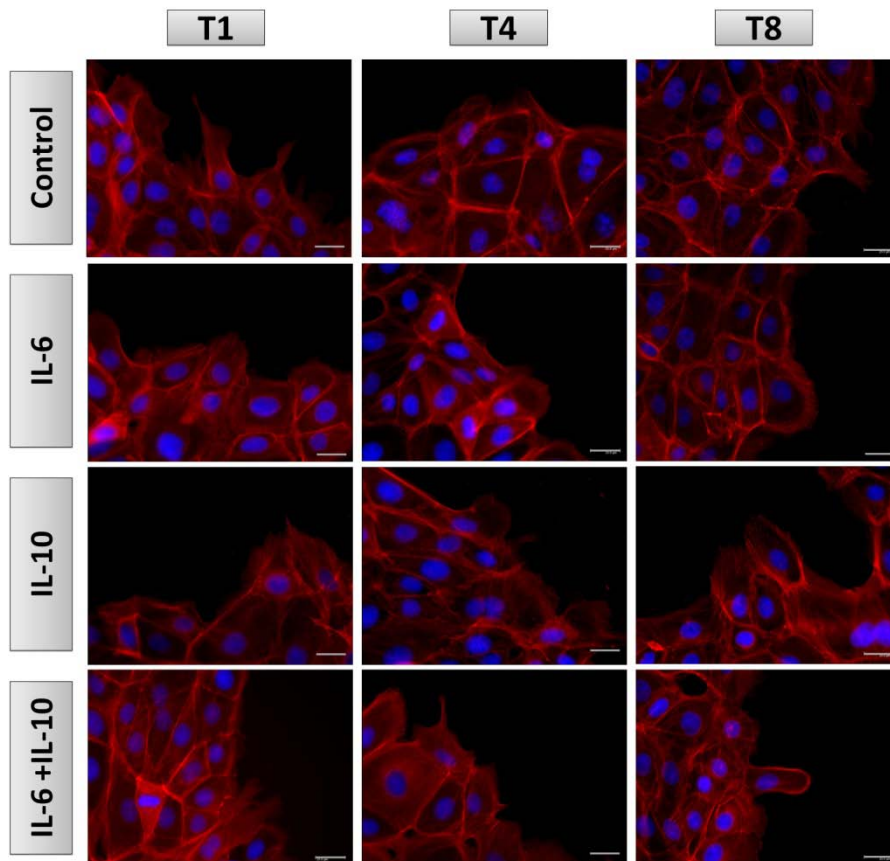


FIGURA 26. Marcaje de los filamentos de actina mediante faloidina en los bordes de la herida de células HCE expuestas a diferentes condiciones de estimulación, a diferentes tiempos. La barra de la esquina inferior derecha de las imágenes representa 25 μm .

Se observó que a T1 los filamentos de actina de algunas células estaban dirigidos hacia el hueco provocado por la herida. Lo mismo ocurría a T4 y a T8, observándose un número de células progresivamente mayor. Al observar el marcaje simultáneo por la EdU y por el anticuerpo anti α -actinina, se vio que a T1 fueron exclusivamente las células sin marcaje por EdU las que dirigían los filamentos de su citoesqueleto hacia la herida (no se muestran fotografías a este tiempo, por ser de mala calidad, debido a la alta exposición empleada para detectar la poca cantidad de EdU internalizada). A T4, se observó mayoritariamente el mismo fenómeno: las células con filamentos de actina dirigidos hacia la herida fueron las que no presentaron marcaje por EdU. Sin embargo, a T8 se observó que este proceso era independiente de la ausencia de marcaje con EdU. No se encontraron diferencias entre las células expuestas a las diferentes citoquinas del estudio.

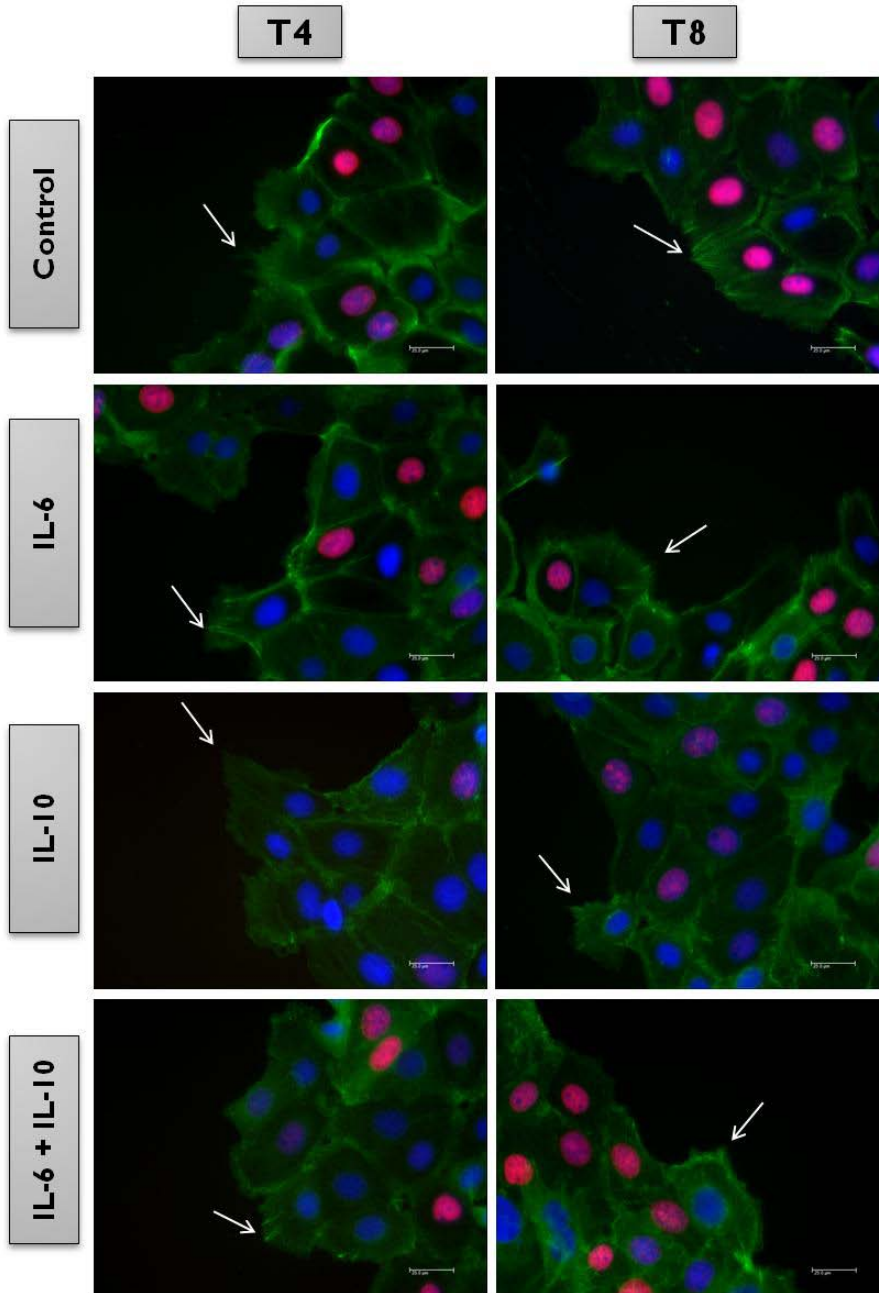


FIGURA 27. Imágenes representativas de la inmunodetección de α -actinina (verde) y del marcaje con EdU (rojo) y Hoechst (azul). La superposición del rojo con el azul da una tonalidad rosa-morada, señal de que la célula está proliferando. Las flechas señalan lugares en los que los filamentos de actina se dirigen hacia el hueco libre de células dejado por la herida, indicadores de que se está produciendo una migración. La barra de la esquina inferior derecha de las imágenes representa 25 μ m.

Modelo de inflamación corneal inducida por exposición a sobrenadantes bacterianos

Para ajustarnos a los requisitos de las tesis doctorales con Mención Internacional, este apartado, correspondiente a la parte experimental realizada en las estancias en el extranjero, se presenta en inglés. Los resultados recogidos en este apartado han dado lugar a la publicación que se encuentra como Anexo I en la página 191).

This section is written in English to meet the requirements for the International-awarded Doctorate Degree. The experimental part was performed during the stays in the Department of Anatomy of the University of Halle-Wittenberg, and the University of Erlangen-Nuremberg, under the supervision of Dr. Bernd Fischer, and Dr. Friedrich Paulsen, respectively. These results have been already published in Molecular Vision (please see Annex I in page 191).

***In vitro* bacterial inflammation model**

IL-6, sIL-6R and sGP130 expression

Potential inflammatory responses were evaluated in SA- and PA-stimulated HCE cells by analyzing changes in the expression of IL-6 and the principal molecules in the signaling pathway, such as sIL-6R and sGP130. Control unstimulated HCE cells secreted IL-6, sIL-6R, and sGP130 in a time-dependent manner.

- IL-6 secretion

In cells exposed to SA supernatants, the IL-6 levels were significantly increased for both dilutions when compared to control cells at every time of study, reaching 21-, 7-, and 4- fold increases for the 1:50 dilution at 6, 24, and 72 h, respectively ($p \leq 0.0005$, $p \leq 0.005$, and $p \leq 0.0005$). There were no differences in IL-6 secretion between PA-stimulated and control unstimulated cells at any time of study (Figure 28).

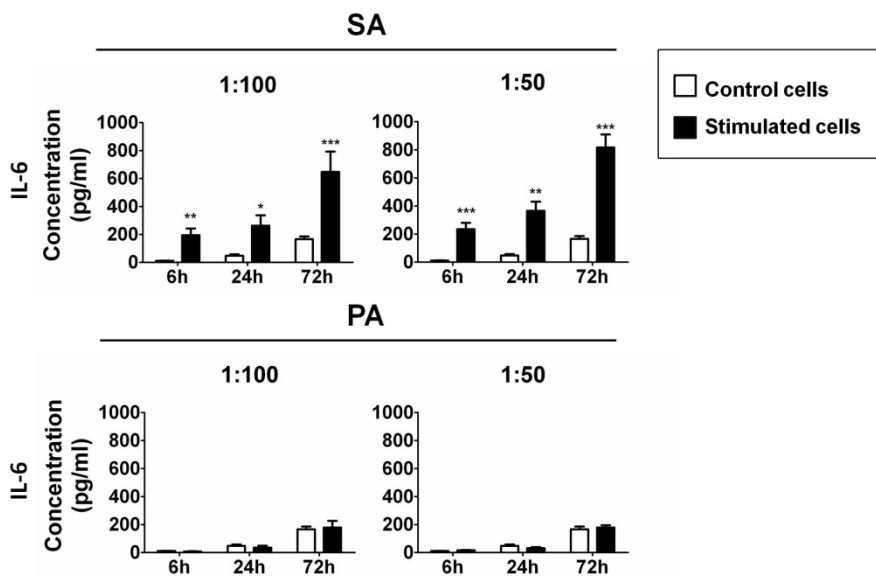


FIGURE 28. IL-6 secretion by HCE cells exposed to SA and PA supernatants. Values are expressed as mean \pm SEM, and statistical significance, when compared to control unstimulated cells, is indicated with asterisks (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0005$).

- IL-6 mRNA expression

IL-6 mRNA expression in control cells unexposed to bacterial supernatants remained constant at 6 and 24 h, and decreased at 72 h ($p \leq 0.0005$). In SA-stimulated cells, IL-6 mRNA expression tended to increase at earlier times and then drop to the control mRNA levels at 72 h of stimulation. However, in PA-stimulated cells, IL-6 mRNA expression was significantly decreased at 6 and 24 h, but by 72 h, the expression was similar to the control levels (Figure 29).

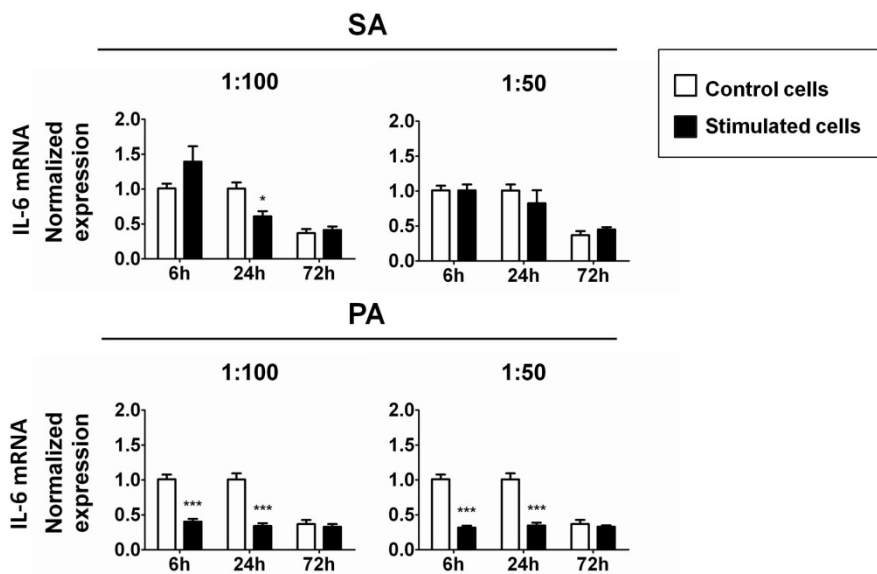


FIGURE 29. IL-6 mRNA relative expression in HCE cells exposed to SA and PA supernatants. Values are expressed as mean \pm SEM, and statistical significance, when compared to control unstimulated cells, is indicated with asterisks (* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.0005$).

- sIL-6R and sGP130 secretion

There were no differences in sIL-6R levels between the control and stimulated cells, in any condition (Figure 30). However, sGP130 levels in response to both dilutions of SA and PA were significantly increased relative to the control cells at 6 h, were significantly decreased at 24 h, and were not different from the control cells at 72 h (Figure 31).

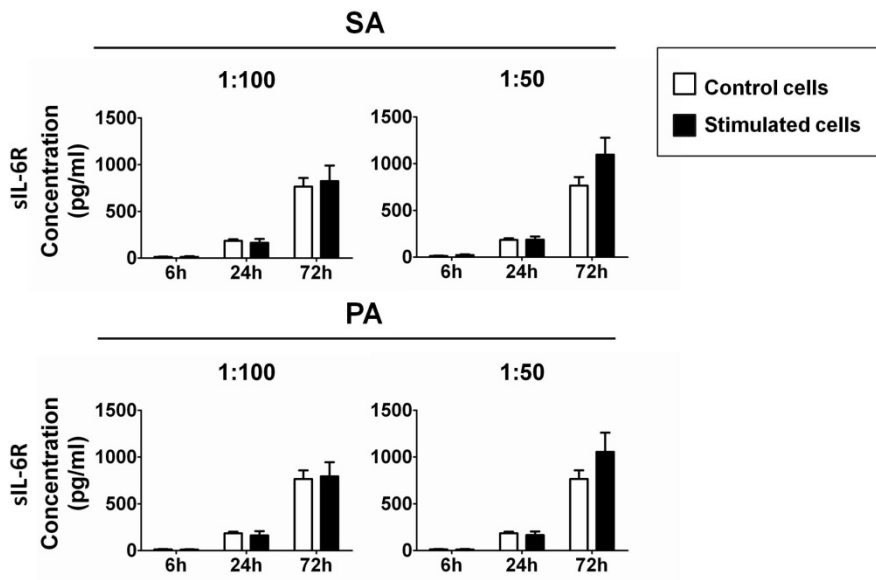


FIGURE 30. sIL-6R secretion by HCE cells exposed to SA and PA supernatants. Values are expressed as mean \pm SEM.

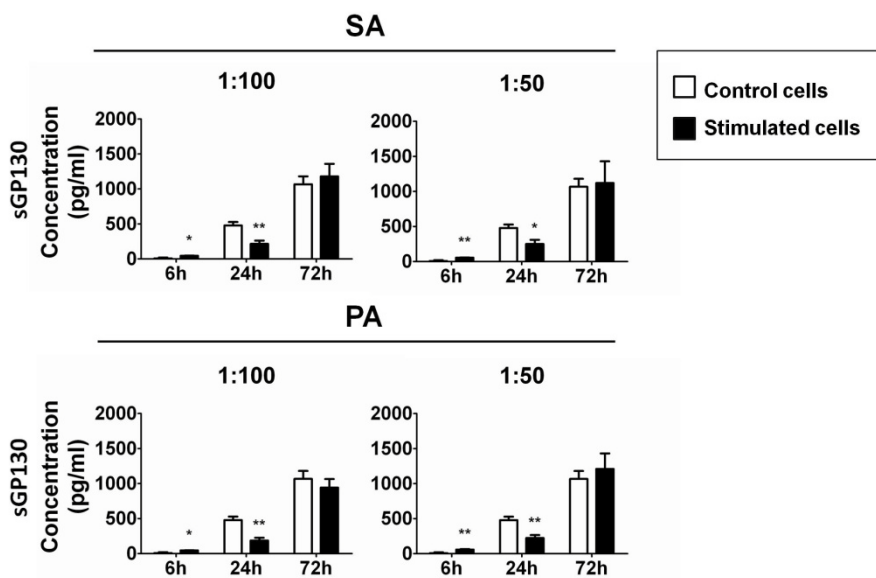


FIGURE 31. IL-6 secretion by HCE cells exposed to SA and PA supernatants. Values are expressed as mean \pm SEM, and statistical significance, when compared to control unstimulated cells, is indicated with asterisks (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$).

IL-17A and IL-17RA expression

We determined whether HCE cells were involved in the Th17 response when stimulated with SA and PA supernatants by measuring IL-17A and IL-17RA protein and mRNA expression.

- IL-17A secretion

Control unstimulated HCE cells secreted IL-17A to the culture medium in a time-dependent manner (Figure 32). There were no differences in IL-17A secretion between the SA-stimulated and the control unstimulated cells at any time of study. In the cells exposed to the PA supernatants, there was a significant decrease in secreted IL-17A levels for both dilutions when compared to the control cells at 72 h ($p \leq 0.05$).

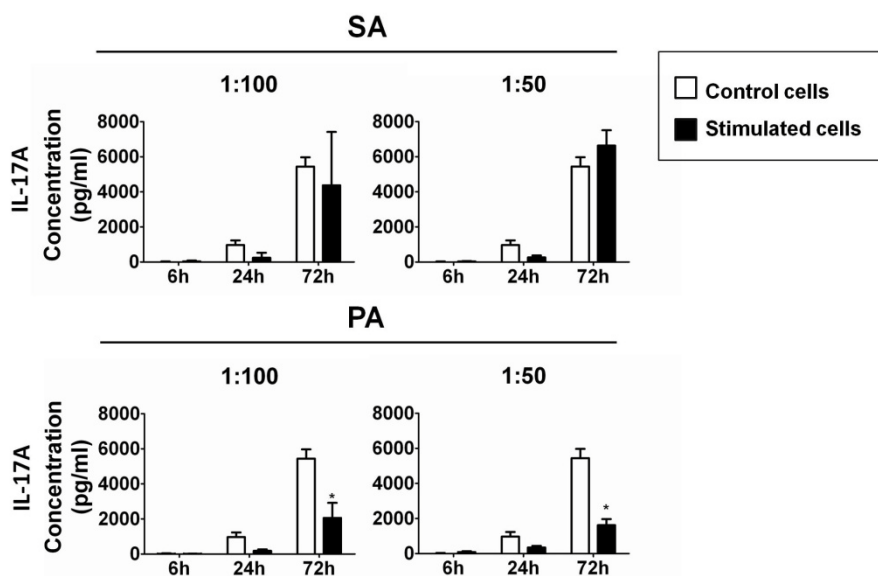


FIGURE 32. IL-17A secretion by HCE cells exposed to SA and PA supernatants. Values are expressed as mean \pm SEM, and statistical significance, when compared to control unstimulated cells, is indicated with * ($p \leq 0.05$).

- IL-17A mRNA expression

IL-17A mRNA expression in control cells unexposed to bacterial supernatants remained constant over time (Figure 33). Exposure to bacterial supernatants tended to decrease IL-17A mRNA expression; however, this was significant only at 6 h ($p \leq 0.05$).

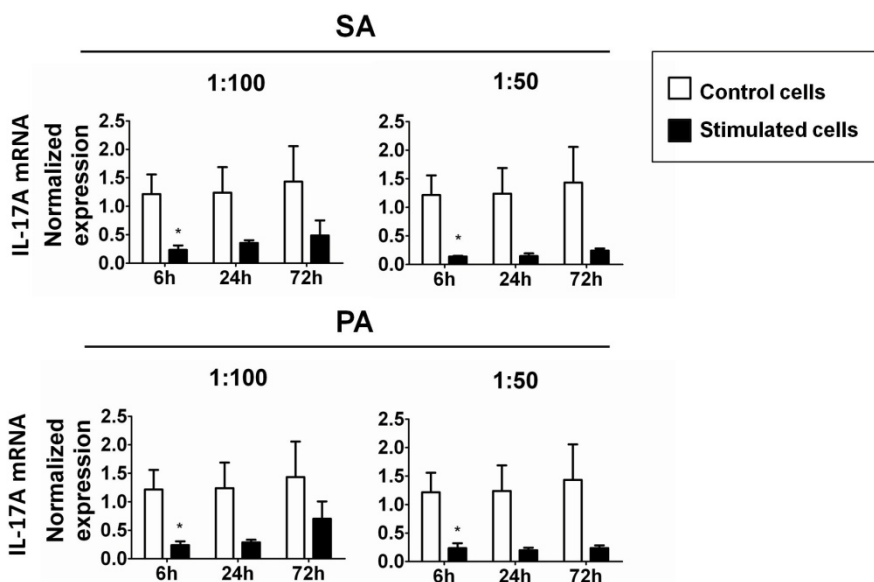


FIGURE 33. IL-17A mRNA relative expression in HCE cells exposed to SA and PA supernatants. Values are expressed as mean \pm SEM, and statistical significance, when compared to control unstimulated cells, is indicated with * ($p \leq 0.05$).

- IL-17RA protein and mRNA expression

Western blot analyses were performed to quantify IL-17RA expression. An 85 kDa immunoreactive band was found in the control K562 cell lysates, unstimulated HCE cells, and bacterial supernatant-stimulated HCE cells (Figure 34A). IL-17RA expression in control cells was unchanged over time, and there were no differences between the control and stimulating conditions at any time of study (Figure 34B). Moreover, there were no significant variations in IL-17RA mRNA expression in all control and stimulating conditions (Figure 35).

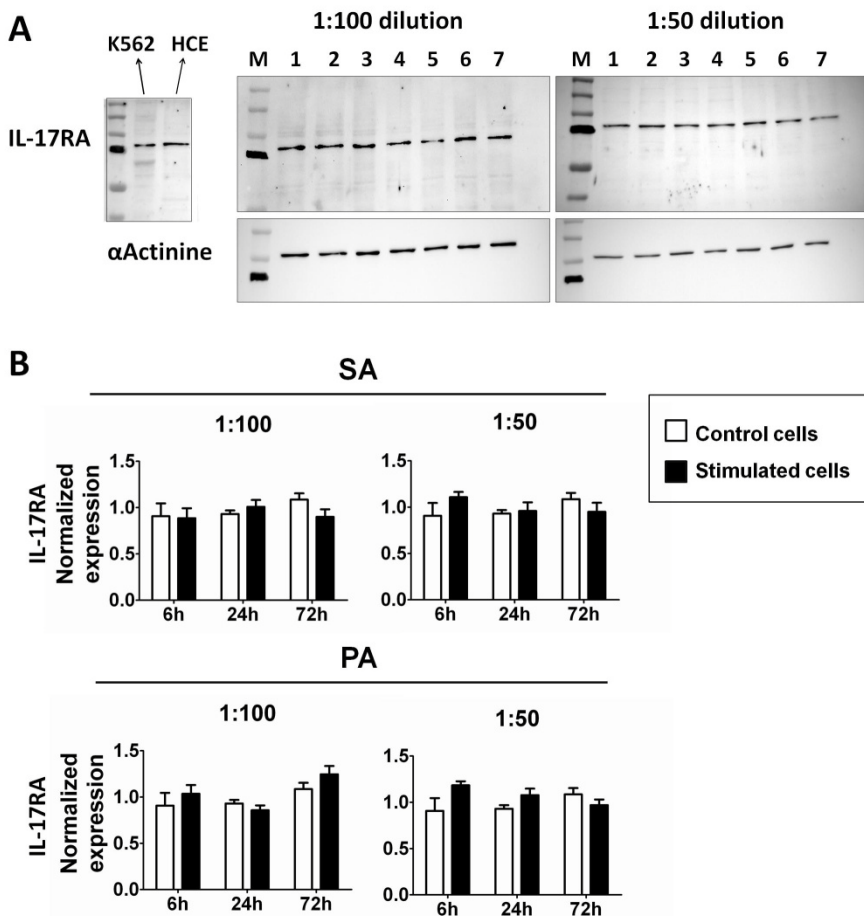


FIGURE 34. IL-17RA expression in HCE cells exposed to SA and PA supernatants. **A:** Internal control for specific band determination: K562 and HCE protein lysates, and representative Western blot images for each condition: M- Molecular weight markers; 1- SA, 6 h; 2- PA, 6 h; 3- SA, 24 h; 4- PA, 24 h; 5- SA, 72 h; 6- PA, 72 h; 7- C, 72 h. **B:** Values are expressed as mean \pm SEM, and statistical significance, when compared to control unstimulated cells, is indicated with * ($p \leq 0.05$).

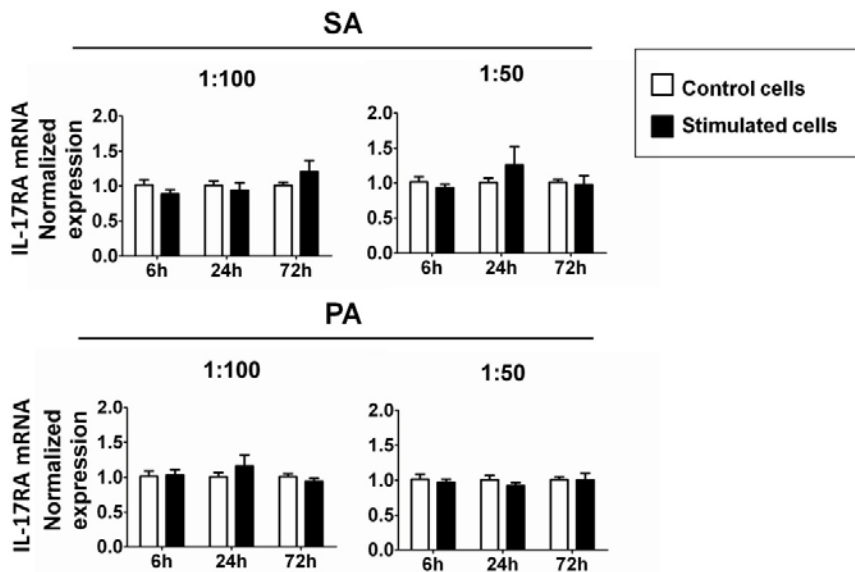


FIGURE 35. IL-17RA mRNA relative expression in HCE cells exposed to SA and PA supernatants. Values are expressed as mean ± SEM.

Results summary

The summary of results obtained in this section is shown in Table 9.

TABLE 9. Summary of results of the bacterial supernatants inflammation model.

		SA		PA	
		Protein	mRNA	Protein	mRNA
Analyzed molecules	IL-6	↑ at 6, 24, and 72h	↓ at 24h		↓ at 6, 24, and 72h
	sIL-6R		-		-
	sGPI30	↑ at 6h ↓ at 24h	-	↑ at 6h ↓ at 24h	-
	IL-17A		↓ at 6h	↓ at 72h	↓ at 6h
	IL-17RA				

Each column shows protein or mRNA expression in response to either SA or PA stimulation. Each row shows the studied molecules. Blue arrows, statistically significant increases compared to controls ($p \leq 0.05$); red arrows, statistically significant decreases compared to controls ($p \leq 0.05$). Empty boxes, absence of statistically significant differences. Dashes, assay was not done.

IL-17RA immunolocalization

IL-17RA was also identified in control HCE cells with immunofluorescence microscopy (Figure 36). HCE cells expressed IL-17RA throughout the culture period, showing vesicular reactivity close to the nucleus and a homogeneous reactivity in the cytosol and at the cell surfaces. At longer times of study, the reaction intensity seemed to slightly decrease.

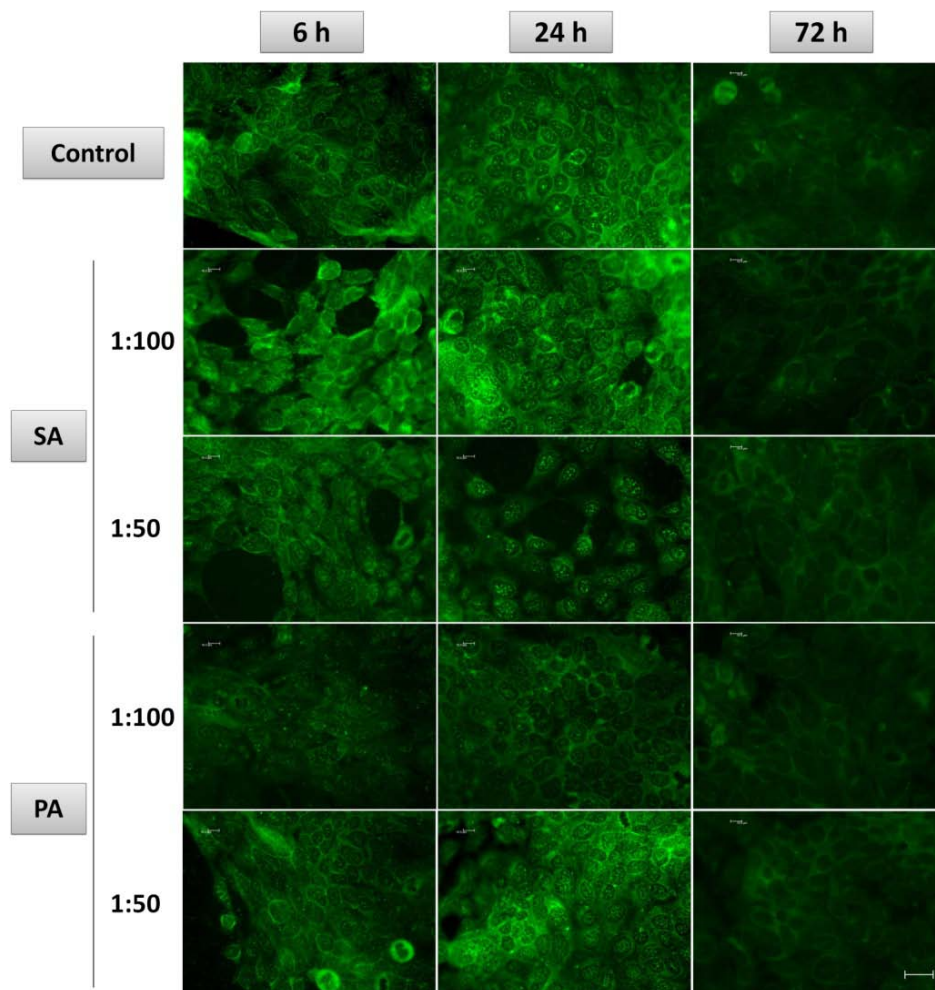


FIGURE 36. IL-17RA immunofluorescence detection in HCE cells exposed to SA and PA supernatants. A representative image of each condition is shown. Bar in the bottom right corner represents 25 μm .

Fluorescence signal was also present in SA- and PA-stimulated cells, regardless of the stimulation dilution or time. Stimulation with bacterial supernatants did not modify the pattern or the signal intensity in any case, although fluorescence slightly decreased over time, particularly in the areas close to the nucleus.

IL-17RA expression in cells exposed to IL-17A

Possible changes in IL-17RA were evaluated in HCE cells exposed to IL-17A. Western blot analyses were performed to quantify IL-17RA expression in IL-17A-stimulated HCE cells. An 85 kDa immunoreactive band was present in both control and IL-17A-exposed cells. IL-17RA expression in IL-17A-exposed cells tended to slightly increase over time, but the differences were not statistically significant. Additionally, IL-17RA mRNA expression did not vary significantly among all control and exposure conditions.

On the other hand, IL-17RA was visualized with immunocytochemistry and immunogold-labeling electron microscopy in unexposed and exposed cultured HCE cells (Figure 37). Control unexposed cells expressed IL-17RA in the cytosol. In IL-17A-exposed cells, immunogold labeled IL-17RA was present in the nucleus in addition to the cytosol. After exposure to recombinant IL-17A, more gold particles were visible than without exposure.

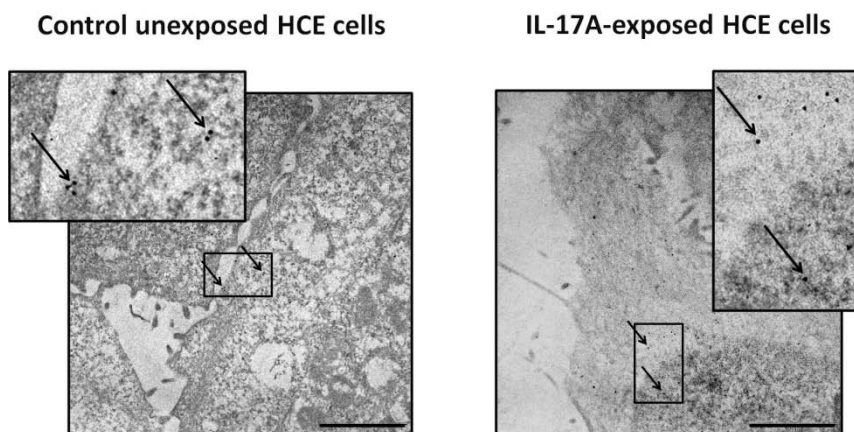


FIGURE 37. IL-17RA immunogold-labeled detection in IL-17A-stimulated HCE cells by electron microscopy. Bar in the bottom right corner represents 2 μm . Insets show higher magnification of gold-labeled antibody.

IL-17RA functionality assay

To determine whether IL-17RA was a functional receptor, we measured the MIP3 α levels in the cell culture supernatants from the control unexposed and the IL-17A-exposed HCE cells (Figure 38). HCE cells secreted MIP3 α in a time-dependent manner, and the expression was significantly enhanced by IL-17A exposure after 72 h ($p \leq 0.001$).

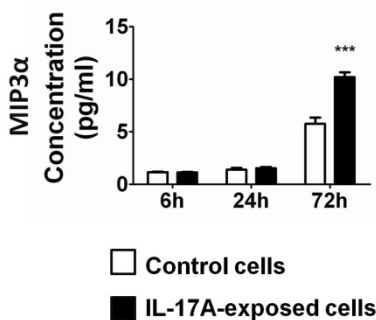


FIGURE 38. MIP3 α secretion by HCE cells stimulated by IL-17A (solid bars) and control cells (open bars). Values are expressed as mean \pm SEM, and statistical significance is indicated with an asterisk ($p \leq 0.001$).

Interleukin-17RA expression in human ocular tissues

To our knowledge, IL-17RA has not been previously identified in epithelial cells from human ocular surface tissues, so we used immunohistochemistry to describe the distribution of IL-17RA in corneal, limbal, and conjunctival epithelium sections from cadaveric donors (Figure 39).

The corneal epithelium had a granular perinuclear cytoplasmic reactivity in all epithelial layers, but it was more obvious in the superficial cell layer. At the limbus, the superficial epithelial cells also reacted strongly with the antibody. Deeper epithelial layers demonstrated reactivity only weakly at the cell surfaces. The basal cell layer showed no reactivity. The cytoplasm of conjunctival epithelial cells, but not goblet cells, was also positive for IL-17RA.

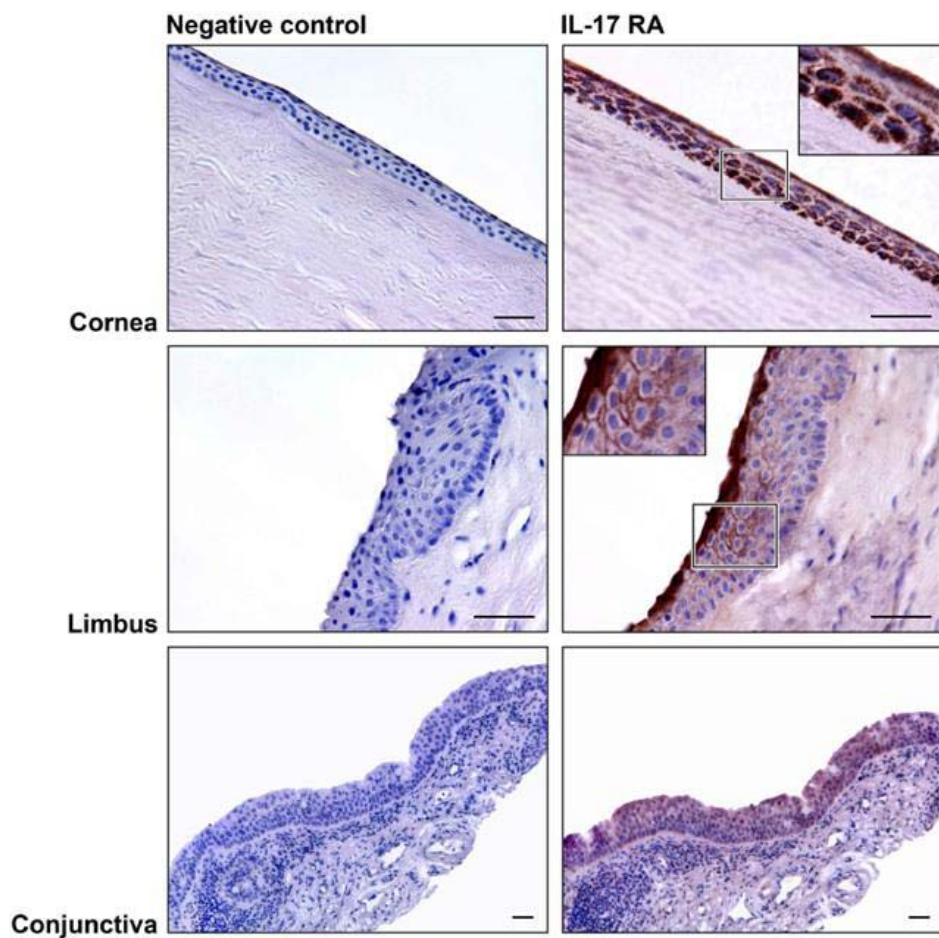


FIGURE 39. IL-17RA expression in human ocular surface tissues. Ocular surface tissues (cornea, limbus, and conjunctiva) expressed histochemically detectable IL-17RA as seen in these representative micrographs. Bar in the bottom right corner represents 40 μ m. Insets show higher magnification of staining distribution.

Estudio del silenciamiento *in vitro* de la IL-6 usando NPs de CG

Este estudio se hizo en colaboración con varios miembros del grupo NANOBIOFAR de la Universidad de Santiago de Compostela (Dres. Alejandro Sánchez y Begoña Seijo y Jenny E. Párraga Meneses).

Puesta a punto del silenciamiento en las células HCE

Con el fin de determinar si el silenciamiento génico era posible en las células HCE, se empleó una secuencia validada de siRNA dirigida contra la enzima GAPDH, molécula empleada habitualmente como control interno de referencia. Se probaron dos tipos diferentes de agentes de transfección comerciales, para comparar su eficacia en esta línea celular: Lipofectamina2000 y JetPEI. Se analizó la expresión remanente de GAPDH en lisados celulares por electroforesis y *Western blot* y a partir de estos datos se calculó el silenciamiento obtenido.

Se observó que el agente de transfección Lipofectamina proporcionaba unos resultados de silenciamiento superiores al 60% en las dos concentraciones de siRNA empleadas en el estudio (20 y 40 nM), según los análisis de las bandas obtenidas. El agente de transfección JetPEI no silenciaba GAPDH en las células HCE (Figura 40).

El análisis a nivel del ARNm de las muestras transfectadas en esas mismas condiciones, cuantificado por qPCR, proporcionó unos datos de silenciamiento similares: alrededor del 70% para el agente de transfección Lipofectamina y casi nulo para el agente de transfección JetPEI (inferior al 5%).

Para seleccionar la concentración de siRNA que proporcionase los mejores resultados de silenciamiento de la IL-6, se llevó a cabo la transfección de las células HCE en las mismas condiciones, empleando Lipofectamina como agente de transfección y las dos secuencias validadas de siRNA para la IL-6 (siIL-6_a y siIL-6_c). Se evaluaron los efectos de las siguientes concentraciones de siRNA: 20, 40, 80, 160, 200 y 250 nM.

Se observó que las concentraciones más bajas de siRNA (20 y 40 nM), que eran las que se habían utilizado para GAPDH, proporcionaban un nivel de silenciamiento de la IL-6 inferior al 10%. El nivel de silenciamiento de IL-6 más

elevado se obtuvo con una concentración de siIL-6 de 160 nM. Empleando esta concentración, la secuencia de siIL-6_a proporcionó un 37% de silenciamiento de la IL-6, mientras que la secuencia de siIL-6_c proporcionó un 13% de silenciamiento de la IL-6.

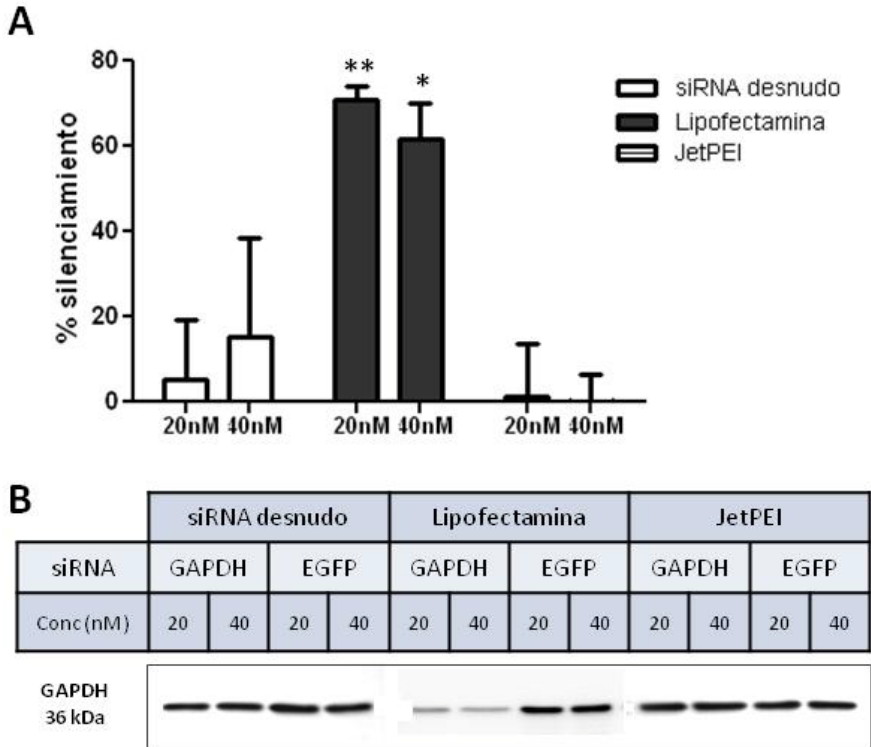


FIGURA 40. Evaluación del porcentaje de silenciamiento obtenido para GAPDH usando la Lipofectamina2000 y el JetPEI como agentes de transfección comerciales como vehículos para internalizar el siRNA específico en las dos concentraciones empleadas: 20 y 40 nM. **A.** Cuantificación del silenciamiento obtenido a nivel de proteína para cada condición estudiada, expresada como la media \pm SEM. Las diferencias estadísticamente significativas obtenidas comparando el silenciamiento obtenido con cada agente de transfección respecto al control sin agente de transfección (siRNA desnudo), a cada concentración, se indican mediante * ($p \leq 0,05$) y ** ($p \leq 0,01$). **B.** Imagen representativa de *Western blot* de GAPDH, para las diferentes muestras transfectadas con el siRNA específico (contra GAPDH) y el siRNA inespecífico (contra EGFP), en dos concentraciones distintas (20 y 40 nM); sin agente de transfección (siRNA desnudo) o utilizando Lipofectamina2000 o JetPEI como agentes de transfección.

Caracterización de las NPs

Se pretendía silenciar la IL-6 en las células HCE partiendo de la base de un mayor éxito en el silenciamiento si se empleaban nanopartículas (NPs) poliméricas como vehículo para el siRNA. Para intentar demostrarlo, se emplearon tres tipos de NPs, cuyas características físico-químicas fueron estudiadas por el equipo de la Universidad de Santiago de Compostela. Esas características se resumen en la Tabla 10. Los tres tipos de NPs que se estudiaron estaban compuestas por gelatina cationizada con espermina, espermidina o etilendiamina y condroitín sulfato o ácido hialurónico, empleando además la espermidina como agente reticulante, según se ha descrito en la Tabla 3, (página 94).

TABLA 10. Principales características físico-químicas de las NPs empleadas.

NP	Composición	Prot+:Glic-:Retic	siRNA	Tamaño (nm)	PdI	Potencial ζ (mV)
X	CG _{sp} :CS:SPD	6:1:0.4	5%	250 ±30	0.19	+20± 3
Y	CG _{spd} :HA:SPD	6:0.7:0.2	5%	270 ±25	0.19	+21± 2
Z	CG _{et} :CS:SPD	6:1:0.6	5%	280 ±24	0,12	+21± 3

En la tabla se indican los diferentes componentes de las NPs y la relación existente entre ellos. Prot+: Proteína cationizada, siendo ésta la gelatina (CG), cationizada por espermina (sp), espermidina (spd) o etilendiamina (et). Glic-: Glicosaminoglicano de carga negativa, siendo este el condroitín sulfato (CS) o el ácido hialurónico (HA). Retic: Agente reticulante empleado en todos los casos: espermidina (SPD). Pdl es el índice de polidispersión de las partículas. El potencial zeta (ζ) determina la carga superficial de la NP y es una medida de la estabilidad o agregación de las NPs en suspensión.

Silenciamiento de la IL-6

Se evaluó el silenciamiento de la IL-6 obtenido mediante dos secuencias específicas y validadas de siRNA, en concentración 160 nM, con los tres tipos de NPs. Se midió la expresión de la IL-6 secretada en los sobrenadantes de las células transfectadas con las NPs y los siRNA, además de la expresión remanente de ARNm en los lisados celulares. A partir de esos datos se calculó el silenciamiento obtenido. Como control positivo de silenciamiento se utilizó el agente comercial de transfección Lipofectamina.

A nivel de proteína, el porcentaje de silenciamiento más elevado se obtuvo con la NP X para la secuencia de siIL-6_a (26,6% de silenciamiento), pero el

error encontrado para esta muestra era bastante elevado. A nivel de ARNm, el valor más elevado de silenciamiento correspondía a las células transfectadas con la NP Z, para ambas secuencias (16% de silenciamiento), seguido por el de las células transfectadas con la secuencia a en la NP X (14,3% de silenciamiento). Sin embargo, en ninguno de los casos, el porcentaje de silenciamiento mejoraba el obtenido con el agente de transfección control, Lipofectamina, que alcanzaba un máximo de 37% a nivel de proteína y un 55,5% a nivel de ARNm (Figura 41).

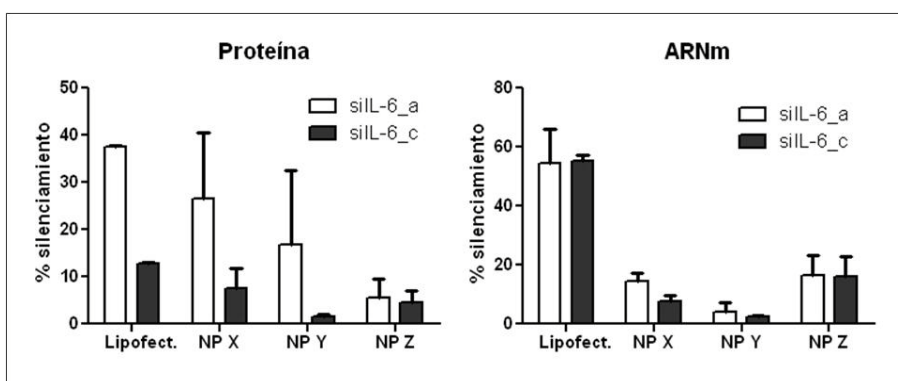


FIGURA 41. Comparación del porcentaje de silenciamiento de la IL-6 obtenido mediante dos secuencias de siRNA diferentes (siL-6_a y siL-6_c) vehiculizadas al interior celular con tres tipos de NPs (X, Y y Z), a nivel de proteína (cuantificado por ELISA) y a nivel de ARNm (cuantificado por qPCR).

Internalización

Con el fin de determinar si el bajo porcentaje de silenciamiento obtenido era a causa de una baja eficiencia de internalización de las NPs, se estudió el porcentaje de internalización de las NPs tipo X por citometría de flujo. El estudio se llevó a cabo solamente en este tipo de NPs por ser las que mejores resultados globales habían proporcionado en la cuantificación del silenciamiento.

En primer lugar, se evaluó si un aumento en el tiempo de contacto de las NPs al transfectar las células incrementaba la tasa de internalización. Se observó que tras 3 h de exposición a las NPs, que era el tiempo que se había empleado para evaluar el silenciamiento, se alcanzaba un máximo de internalización (superior al 50%), sin comprometer la viabilidad celular, que era superior al 85% (Figura 42).

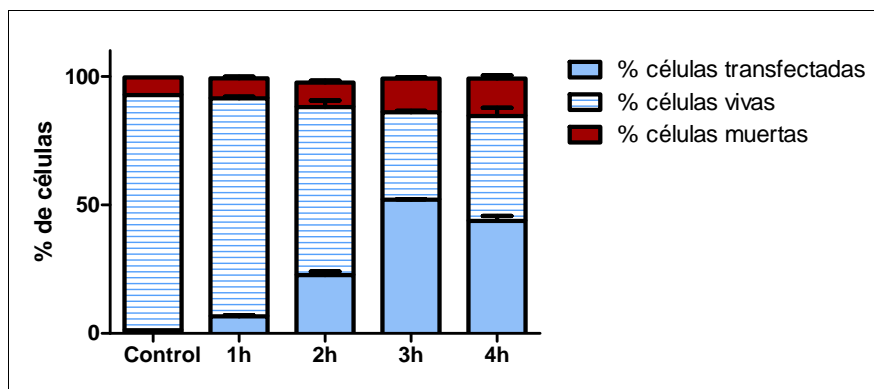


FIGURA 42. Estudio del tiempo óptimo de internalización de las NPs tipo X en las células HCE. Las muestras control consistieron en células no expuestas a las NPs ni al siRNA. Se encontró un máximo de internalización tras 3 h de contacto de las NPs, sin comprometer la viabilidad celular.

En segundo lugar, se estudió la influencia de la concentración de siRNA sobre el porcentaje de transfección de las NPs. Se observó que con una concentración de siRNA 160 nM se alcanzaba un máximo de internalización (58%), sin comprometer la viabilidad celular, que era superior al 90% (Figura 43). No se muestran los resultados de internalización obtenidos a mayores concentraciones, por no superar este valor.

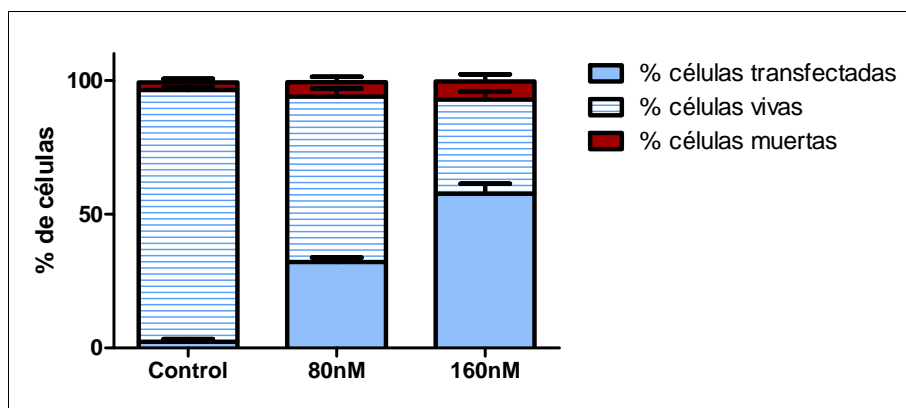


FIGURA 43. Porcentaje de transfección de las NPs tipo X en las células HCE, en función de la concentración de siRNA incorporado. Las muestras control consistieron en células no expuestas a las NPs ni al siRNA. Se encontró un máximo de internalización con una concentración de siRNA de 160 nM.



DISCUSIÓN

**“¿La diferencia entre ficción y realidad?
La ficción debe tener sentido.”**

(T. Clancy)

*“The difference between fiction and reality?
Fiction has to make sense.”*



En este trabajo se han empleado diferentes modelos de inflamación corneal *in vitro* desarrollados sobre cultivos de células epiteliales corneales. En cada caso se ha estudiado la influencia de los diferentes procesos inflamatorios sobre la expresión de diversos mediadores de la vía de señalización de la IL-6, o de la vía de diferenciación Th17. Además, se ha realizado un estudio preliminar de silenciamiento de la IL-6, como potencial agente terapéutico. La discusión de cada una de las partes en que se ha dividido el trabajo se presenta por separado.

Modelo de inflamación corneal inducida por exposición a citoquinas

En una primera parte, se ha empleado un modelo de inflamación de células epiteliales corneales humanas mediante la estimulación con citoquinas, basado en un trabajo publicado por nuestro grupo de investigación (Enriquez-de-Salamanca y cols., 2008). En esa publicación, se describe un modelo de inflamación *in vitro* por exposición de una línea celular de epitelio conjuntival a diferentes moléculas proinflamatorias. La sobreexpresión de factores proinflamatorios en la lágrima o en la superficie ocular (SO) ha sido relacionada con la base de enfermedades crónicas inflamatorias y/o autoinmunes (Leonardi y cols., 2008; Romagnani y Crescioli, 2012; Mochizuki y cols., 2013). La importancia de estas enfermedades, en cuanto a la degradación de la calidad de vida de los pacientes, hace necesaria la comprensión en profundidad de los procesos moleculares que están ocurriendo durante este tipo de procesos de inflamación.

Las citoquinas escogidas para llevar a cabo este modelo han sido la IL-6, conocida citoquina proinflamatoria; la IL-17, principal molécula efectora de la respuesta inmune tipo Th17; y la IL-10, molécula potencialmente reguladora, aislada o en combinación con las dos primeras citoquinas. Para determinar los efectos de las citoquinas mencionadas, se analizó la expresión a nivel de proteína y de ARNm del receptor de la IL-6 (IL-6R) y su fracción soluble, de la glicoproteína 130 (GP130) y su fracción soluble y del factor transductor de señal y activador de transcripción 3, tanto en su forma inactivada (STAT3) como en la activada (pSTAT3).

Lo primero que llamó la atención es que los niveles de proteína secretada no variaban significativamente en ninguna de las condiciones estudiadas. Sin

embargo, se observó que en células estimuladas con IL-17 o con la combinación de IL-17 + IL-10, la expresión de sIL-6R tendía a disminuir a las 72 h. Observando la expresión del IL-6R transmembrana, se vio una disminución que sí que era significativa a las 72 h en las muestras estimuladas por la misma combinación de IL-17 + IL-10. Se observó, además, un aumento significativo en la expresión del IL-6R a las 6 h, en las células estimuladas solo con IL-17. El hecho de que las diferencias en la expresión de la fracción soluble no fueran significativas podía ser debido al elevado error estándar que mostraron los resultados, el cual pensamos que podría ser más pequeño al aumentar el tamaño de la muestra.

El incremento en la expresión del IL-6R producido por la IL-17 puede significar la existencia de una retroalimentación positiva de la respuesta Th17 a tiempos cortos: la presencia de IL-17 estimularía la producción del IL-6R por parte de las células epiteliales, lo que permitiría la recepción de más señales de IL-6 desencadenando, a su vez, las señales necesarias para la diferenciación y la expansión clonal de las células Th17. Mientras que, a tiempos más largos, ya no se encontraría este incremento en la expresión del IL-6R. Por el contrario, la disminución de la expresión del IL-6R a las 72 h por la combinación de IL-17 con IL-10, reafirmaría el papel potencialmente regulador de la IL-10 en la respuesta Th17. Se ha relacionado el aumento del IL-6R en las células T CD4+ con un aumento de las células Th17 en pacientes de hepatitis B crónica (Zhang y cols., 2011), pero nunca hasta ahora se había documentado que la estimulación con IL-17 provocara un aumento en la expresión del IL-6R en células no inmunes.

En cuanto a la expresión de la GP130, la estimulación con IL-6 producía un incremento a tiempos cortos. La estimulación con IL-10 producía también un incremento, un poco más retardado en el tiempo. La estimulación con la combinación de ambas, producía un incremento que era similar a la suma de los incrementos obtenidos mediante los efectos individuales. En cuanto a las células expuestas a la IL-17, incrementaron la expresión de GP130 desde tiempos cortos y mantuvieron este incremento en el tiempo (Figura 44).

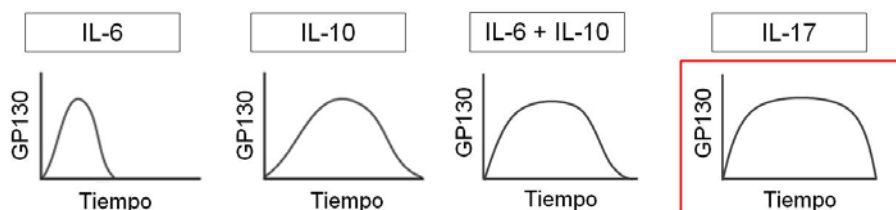


FIGURA 44. Expresión cualitativa de la GP130 en función del tiempo y del estímulo.

El papel de la IL-10 como regulador positivo de la GP130 vía STAT3 ha sido previamente descrito en mastocitos de ratón (Traum y cols., 2012). La señalización de la IL-10 a través de sus receptores, pasa por la activación de STAT3, al igual que la señalización de la IL-6. Sin embargo, la de la IL-10 es independiente de la GP130. A pesar de esto, el aumento de STAT3 activado por estimulación con IL-10 provocaría una regulación positiva en la expresión de la GP130, tanto en los mencionados mastocitos de ratón (Traum y cols., 2012), como en las células epiteliales de córnea humana en el modelo *in vitro* de este estudio.

Si se observaban en conjunto los datos a nivel de proteína y los resultados obtenidos a nivel de ARNm, no se encontraban las mismas diferencias ni los mismos patrones. Estas aparentes discrepancias en la expresión relativa de ARNm determinados por qPCR y los niveles de expresión de proteína detectados por *Western blot*, se podrían explicar por el hecho de que ambos datos de ARNm y de proteína madura, proporcionan información sobre extremos opuestos del espectro de transcripción/traducción. A pesar de que los datos puedan parecer discrepantes, comparando nuestros resultados de expresión de proteína con los datos de la expresión a nivel de ARNm, se observó que, a las 24 h, la expresión del ARNm de la GP130 disminuía significativamente en las muestras estimuladas por IL-6, confirmando del siguiente modo los datos de proteína: la IL-6 producía una disminución en la expresión del ARNm de la GP130 y, por lo tanto, la expresión a nivel de proteína no se veía aumentada, como ocurría con las muestras expuestas a las otras citoquinas, que mantenían, a su vez, unos niveles de ARNm de la GP130 estables.

Se sabe que la regulación de la expresión de la GP130 está mediada por el supresor de la señalización de citoquinas (SOCS)3 que ejerce una acción inhibitoria de la vía de señalización de citoquinas que utilizan GP130 y JAK/STAT como mediadores (Silver y Hunter, 2010). Si se comparaban los resultados mencionados previamente con los datos obtenidos para la sGP130, que era una molécula antagonista de la IL-6, se observaba que, a pesar de que no había diferencias significativas, sí había una tendencia por parte de las muestras estimuladas con IL-6, IL-17 y la combinación de IL-17 + IL-10 a disminuir la expresión de la sGP130 a las 72 h. Por lo tanto, se puede establecer que la IL-6 produce una disminución tanto en la expresión de la GP130 como en la de su antagonista, la sGP130, relegando en este caso su regulación a otro tipo de

moléculas, como podría ser SOCS3. Por otro lado, la IL-17 producía un incremento en la expresión de la GP130 y una disminución de su antagonista, la sGP130, pudiendo considerarse esto como una doble regulación positiva por parte de la IL-17 en la vía de señalización de la IL-6.

La estimulación con IL-17 exógena ha sido relacionada con el aumento y la activación del STAT3, en células tumorales, mediada por un aumento en la expresión de IL-6 (Wang y cols., 2009; Gu y cols., 2011). Sin embargo, el papel de la IL-17 en la regulación de la GP130 o de su fracción soluble no ha sido establecido hasta el momento. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en células tumorales, el incremento de la GP130 tras la estimulación con IL-17 podría estar provocado por un aumento en la expresión de la IL-6. Sin embargo, en este trabajo, la estimulación con IL-17 provocaba un incremento de GP130 más sostenido en el tiempo que la estimulación con IL-6, con IL-10 o con la combinación de ambas. Nuestros resultados sugieren, por lo tanto, la participación de la GP130 en una vía de señalización diferente no descrita hasta el momento, relacionada con la respuesta inmune tipo Th17 (Figura 45). Además, estos datos pueden ser relacionados con los resultados obtenidos para el IL-6R, ya que la IL-17 incrementaba tanto la expresión del IL-6R como la de la GP130 en las células epiteliales corneales. Este incremento permitiría la recepción de más señales de IL-6 y desencadenaría un mayor número de señales necesarias para la diferenciación y expansión clonal de las células Th17.

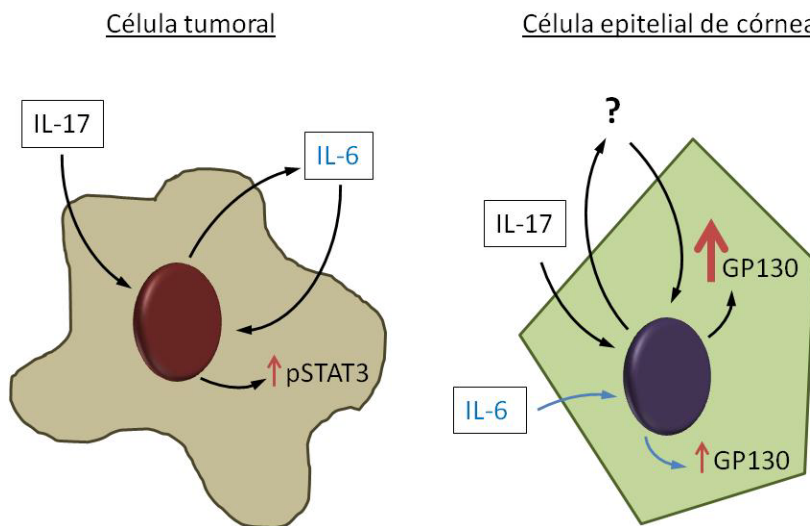


FIGURA 45. Comparación entre la respuesta de una célula tumoral y de una célula epitelial de córnea frente al estímulo con IL-17.

En cuanto a la producción de STAT3, que es un mediador en la vía de señalización de la IL-6, solo se observaron cambios estadísticamente significativos en las muestras estimuladas con IL-6, a las 72 h. Mientras tanto, la producción de la forma activada de STAT3, es decir, la forma fosforilada pSTAT3, aumentaba a tiempos cortos y a tiempos intermedios cuando se estimulaba con IL-6. La estimulación con IL-10 provocaba el aumento significativo de pSTAT3 a tiempos intermedios, es decir a las 24 h. La combinación de IL-6 + IL-10 superaba los efectos aislados de ambas citoquinas: producía un aumento significativo de pSTAT3 a tiempos cortos e intermedios, como las acciones individuales de ambas, pero además, aumentaba su expresión a tiempos largos (Figura 46).

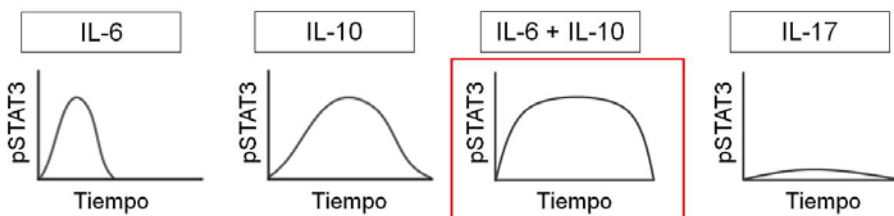


FIGURA 46. Expresión cualitativa del pSTAT3 en función del tiempo y del estímulo.

Se trata, por lo tanto, de un efecto sinérgico de la IL-6 y la IL-10 en lo que a la producción de pSTAT3 se refiere. La estimulación con IL-17 no producía aumento de pSTAT3 en las células epiteliales de la córnea, contrariamente a lo que ocurría en las células tumorales comentado previamente.

Los datos más relevantes que podemos extraer de este apartado son los siguientes:

1. La estimulación con IL-6 produce un aumento en la expresión de mediadores de su vía de señalización, produciendo una autorregulación positiva.
2. La estimulación con IL-17 produce un aumento en la expresión del IL-6R a tiempos cortos y de la GP130 sostenida en el tiempo.
3. La estimulación con la combinación de IL-6 + IL-10 produce un aumento en la expresión de pSTAT3, resultado sinérgico de los efectos individuales de la IL-6 y la IL-10.

Modelo de herida corneal

El segundo modelo de inflamación propuesto, el modelo de herida corneal, está basado en el ensayo de *scratch* descrito por Liang y cols. (2007). Es un modelo que permite evaluar la cicatrización en una línea celular, epitelial en este caso, mediante la creación de una zona libre de células o “herida”, que se denomina *scratch* en la literatura, y medir la velocidad de cicatrización en diferentes condiciones. Las heridas corneales pueden tener varias causas, entre ellas, quirúrgicas o accidentales. La cicatrización corneal suele ocurrir de manera rápida y ordenada con el fin de preservar la visión, pero una complicación producida por una infección u otro tipo de proceso inflamatorio, puede llevar a un fracaso de la cirugía y, en el peor de los casos, a un compromiso de la función visual. En concreto, unos niveles elevados de IL-6 han sido relacionados con la opacificación de la cápsula posterior tras la cirugía de cataratas (Lewis, 2013), una de las cirugías más comunes en el ámbito ocular.

Con estas ideas en mente, se decidió combinar el modelo de *scratch* descrito por Liang y cols., con la exposición de las células a diferentes citoquinas. Las condiciones de estimulación elegidas para este trabajo fueron la exposición a la IL-6, a la IL-10 y a la combinación de ambas. La elección de estas citoquinas, y no de la IL-17, se debe a que ambas han sido caracterizadas en algún momento como protectoras de la barrera epitelial o como favorecedoras de la cicatrización (Nakamura y Nishida, 1999; Contreras-Ruiz y cols., 2012a).

En este trabajo, la medida media de la anchura de las heridas era de alrededor de 570 μm . Esto suponía una limitación a la hora de analizar los resultados, ya que estas heridas, en condiciones normales de incubación, cerraban en un tiempo inferior a 24 h. Sin embargo, las heridas que se pueden ocasionar por accidentes o por cirugía suelen exceder ese tamaño y tener una anchura de alrededor de 2 mm (Allen y cols., 2012). Debido a las limitaciones de los objetivos del microscopio, no se podían visualizar heridas con un tamaño mayor que el presentado en este estudio, de ahí que se haya seleccionado ese rango de trabajo.

Se observó que la estimulación con IL-6 producía una rápida cicatrización, lo cual estaba en concordancia con los datos que obtuvieron Nakamura y Nishida (1999) en su estudio en células de conejo. Por otra parte, la estimulación con la IL-10 ofrecía una respuesta más tardía que la IL-6 pero, a las 8 h, la herida era significativamente menor en las células tratadas con IL-10 que en las células

control. Como habíamos visto en el modelo de inflamación inducida por citoquinas, al estimular las células HCE con IL-10, se producía un aumento de la expresión de la GP130 y del pSTAT3 a las 24h tras la estimulación. Estas moléculas forman parte de la cascada de señalización de la IL-6, por lo que cabe suponer un efecto de la IL-10 que emule el de la IL-6 pero un poco más retardado, en ausencia de un aporte externo de esta última.

Estudios recientes sobre la cicatrización en tejido fetal humano sugieren que una rápida cicatrización concluye con ausencia de cicatriz (Coolen y cols., 2010), gracias al rápido reclutamiento de fibroblastos. Una cicatrización más lenta daría lugar a la deposición de grandes cantidades de matriz extracelular y a la conversión de fibroblastos a miofibroblastos, pudiendo llegar a provocar fibrosis (Eckes y cols., 2000; Micera y cols., 2006). Este tipo patológico de cicatrización, junto con la inflamación local y la neovascularización, puede provocar fallos en la recuperación funcional de la SO cuando ha ocurrido un daño epitelial, comprometiendo en algunos casos la visión (Ferrari y cols., 2013). Por lo tanto, de acuerdo con los resultados de este trabajo, la presencia de la IL-6 ayudaría a no dejar cicatriz en la SO, previniendo la inflamación y la fibrosis, mientras que la presencia de la IL-10, al provocar una cicatrización más lenta que la de la IL-6, daría lugar a una cicatrización más desordenada.

Sin embargo, el papel de la IL-10 como protector del proceso de cicatrización ordenado ha sido estudiado en un modelo de ratón (Shi y cols., 2013). En el modelo *in vitro* empleado no se puede evaluar la participación de los fibroblastos en el proceso mencionado. El desarrollo de modelos tridimensionales de co-cultivo de células epiteliales y fibroblastos, para estudios de cicatrización, se hace, por lo tanto, necesario. En estos modelos, se podría analizar la expresión de diferentes moléculas de la matriz extracelular, como diferentes tipos de colágeno, de metaloproteinasas, etc, para evaluar el componente patológico de la cicatrización. Además, se podría determinar si tiene lugar la transición de fibroblastos a miofibroblastos y la contribución exacta de las moléculas de estudio a este proceso patogénico.

Por otra parte, al analizar los datos de estimulación con la combinación de IL-6 + IL-10, se observó que el efecto conjunto de la incubación con ambas moléculas no era ni una suma de los efectos individuales, ni una mejora respecto a los resultados de ambas por separado. Contrariamente a lo que ocurría con la expresión de pSTAT3 en el modelo anterior, no se observó ningún efecto sinérgico: la herida en las células estimuladas con IL-6 + IL-10 no era

significativamente diferente de la herida en las células control. Sin embargo, la activación de STAT3 ha sido relacionada con el proceso de cicatrización (Ekblad y cols., 2013) y cabría esperar una mayor tasa de cicatrización en presencia de mayor cantidad de pSTAT3. Pero en este modelo se observó el efecto contrario. Es posible que la IL-10, que es inmunomoduladora, al estar en presencia de la IL-6, actuara como citoquina antiinflamatoria, desencadenando otro tipo de señales extracelulares que inhibieran los efectos de la IL-6 o la IL-10 cuando se encuentran por separado.

Existen datos que indican que la proliferación celular es responsable de la cicatrización *in vitro*. En un trabajo con células epiteliales de córnea humana, en un modelo de herida *in vitro* (Liang y cols., 2012), los autores relacionan la mayor tasa de cicatrización con un mayor número de células positivas para Ki67, es decir, de células proliferativas. Se decidió por ello evaluar la cicatrización en el modelo utilizado en este estudio, en condiciones de inhibición de la proliferación, pretratando las células con mitomicina C (MMC), un agente alquilante del ADN que inhibe la proliferación celular. En los momentos iniciales, el tratamiento con MMC no tenía un efecto importante. Sin embargo, provocaba una ralentización de la cicatrización a partir de las 8 h (y más temprano aún en las células estimuladas con IL-6) y finalmente impedía el cierre total de las heridas. Estos resultados indican que la proliferación celular tenía una alta contribución en la cicatrización en el modelo empleado.

Con el fin de cuantificar estos resultados, se trató de evaluar la proliferación celular mediante el marcaje de Ki67, al igual que los autores del trabajo mencionado más arriba. Pero al emplear una línea celular en nuestro modelo, todas las células resultaron ser positivas para este marcador de la proliferación. La alternativa propuesta, la utilización de EdU como marcador de la proliferación, es más sensible a tiempos cortos. Al añadir este análogo de timina al medio de cultivo, las células que estuvieran proliferando lo incorporaban en el ADN de nueva síntesis, permitiendo su posterior detección. Con el fin de permitir a las células incorporar la EdU, se optó por modificar el primer tiempo de estudio: en vez de analizar los resultados inmediatamente tras el *scratch*, se dejaron las células incubando con EdU durante 1 h. Aún así, las células habían incorporado poca cantidad de EdU en sus núcleos tras este periodo, lo cual impidió tomar fotografías de calidad, aunque sí fue tiempo suficiente para su cuantificación.

Contrariamente a lo esperado, el recuento de células proliferativas en los bordes de la herida y en zonas de la monocapa distantes de ella no reveló diferencias estadísticamente significativas tras 1 ó 4 h tras el *scratch*. Tras 8 h se observó que, curiosamente, las células lejanas del borde de la herida tenían una tasa de proliferación mayor que las células situadas en los bordes de ésta. A pesar de esta falta de incremento de la proliferación en sus bordes, la herida cicatrizaba en todas las condiciones en menos de 24 h. Por lo tanto, si la tasa de proliferación era la misma o incluso inferior, en los bordes de la herida que en la zona de la monocapa, quiere decir que había otro mecanismo implicado en la cicatrización: posiblemente la migración celular.

La mayoría de autores consultados suponen, en una primera aproximación, que las células migran para cerrar las heridas en el modelo de *scratch* (Ramaesh y cols., 2012; Seet y cols., 2012). Con el fin de visualizar las células que podían estar migrando en los bordes de la herida en nuestro modelo, se marcó el citoesqueleto de dos maneras: con faloidina y con un anticuerpo anti α -actinina. A pesar de que la faloidina permitía un marcaje más fino y preciso de los filamentos de actina, la incubación con este marcador era incompatible con la detección de la EdU, según las indicaciones del fabricante. La α -actinina es una molécula de unión de los filamentos de actina y su marcaje permite también la visualización de estos filamentos. Mediante la co-incubación con la EdU y con el anticuerpo anti α -actinina, se pudieron observar simultáneamente las células proliferativas y la dirección de los filamentos de actina, indicadores de la migración en las células del borde de la herida. Gracias a este doble marcaje, se pudo determinar que, en los momentos iniciales del proceso de cicatrización, las células “eligen” entre migración o proliferación. Es decir, que una célula que migra para cerrar el espacio abierto por la herida no está proliferando mientras realiza este movimiento de migración; y la célula que está duplicándose no establece un proceso de migración.

Tomando en cuenta estos datos y los datos de la anchura de la herida para las distintas estimaciones con citoquinas, se puede proponer que la migración celular es el mecanismo que explicaría que las células estimuladas con IL-6 cicatrizaran más rápidamente que el resto, ya que la proliferación celular no presentaba diferencias respecto al control. Sin embargo, para poder afirmar que es la migración la que provoca el cierre rápido de la herida en esta condición, habría que realizar un estudio de migración más en profundidad. Aunque, desde nuestro punto de vista, hay un hecho que apoya la teoría de la

migración como principal mecanismo de cicatrización. A las 8 h tras el *scratch* se observó un número elevado de células muertas en el hueco libre de células dejado por la herida en las muestras pre-tratadas con MMC, mientras que, en las muestras no tratadas, no se encontraron células muertas. Tras 24 h, el número de células muertas era tan elevado en las muestras pre-tratadas con MMC que, para poder visualizar la zona de la herida, hubo que lavar los pocillos antes de tomar las fotografías. La explicación que se propone para esto es que estas células muertas eran células que habían migrado para ir cerrando la herida pero, al estar inhibida su proliferación, murieron al quedarse aisladas en ese entorno.

Por otra parte, las células estimuladas con IL-6 + IL-10 eran las que presentaron mayor tasa de proliferación tras 8 h en la monocapa, pero no así en los bordes de la herida. Estas condiciones eran, a su vez, las que producían el cierre más lento de la herida. Si, como se mencionó previamente, un cierre más lento es más susceptible de dejar cicatriz, este aumento en la proliferación contribuiría a la secreción de una mayor cantidad de matriz extracelular, que se depositaría en la herida favoreciendo la formación de la cicatriz. Esta teoría no puede ser demostrada con las técnicas de las que disponemos *in vitro*, ya que la presencia de cicatriz una vez cerrada la herida solo podía evaluarse mediante observación al microscopio, sin llegar a ningún resultado concluyente. El desarrollo de un modelo tridimensional *in vitro* de cicatrización, que pusiera en juego tanto células epiteliales como queratinocitos, o el empleo de un modelo animal de herida corneal, podría ayudar a aclarar esta hipótesis y a esclarecer si la IL-6 cumple un papel protector en la cicatrización corneal.

Los datos más relevantes que se extraen de este apartado son los siguientes:

1. La estimulación con IL-6 favorece una rápida cicatrización en el modelo *in vitro* de herida corneal; ese efecto es inhibido por la coestimulación con IL-10, aumentando la tasa de proliferación.

2. No existen grandes diferencias entre el porcentaje de células proliferativas en los bordes de la herida y en zonas distantes en la monocapa, pero al inhibir la proliferación las heridas no cicatrizan por completo.

3. Los procesos de migración y proliferación son, ambos, importantes en la cicatrización de las heridas en este modelo.

Modelo de inflamación corneal inducida por exposición a sobrenadantes bacterianos

El tercer modelo de inflamación utilizado se centraba en la estimulación de las células epiteliales corneales con sobrenadantes bacterianos. Este modelo estaba basado en el modelo descrito por Paulsen y cols. (2008) que simula la reacción inflamatoria que sucede en la córnea tras una infección bacteriana. Entre los diferentes patógenos que pueden afectar a la SO, *Staphylococcus aureus* (SA) y *Pseudomonas aeruginosa* (PA) son causas frecuentes de queratitis bacterianas, procesos inflamatorios que pueden provocar un severo daño corneal (Barequet y cols., 2008) y que pueden tener lugar tras cualquier intervención en la SO (excisión de pterygium, trasplantes de córnea, cirugía de cataratas, etc).

En este modelo, se emplearon los sobrenadantes bacterianos de los cultivos de dos cepas bacterianas, en lugar de emplear el patógeno en sí. De esta manera, se evitaban problemas por contaminación de otros cultivos celulares que se llevaban a cabo simultáneamente, independientes de este estudio. Los sobrenadantes bacterianos contienen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) cuya interacción con las células eucariotas simula *in vitro* las condiciones de la infección. En cuanto a las moléculas analizadas en este modelo, además de las moléculas implicadas en la vía de señalización de la IL-6, se evaluó el efecto de estos sobrenadantes sobre la expresión de la IL-17 (principal molécula efectora de la respuesta inmune tipo Th17) y de su receptor, el IL-17RA.

Durante los procesos inflamatorios infecciosos, el tipo de respuesta del sistema inmune (Th1, Th2 o Th17) es determinado dependiendo de una amplia variedad de factores genéticos y ambientales. Entre estos factores se incluye el tipo de citoquinas secretadas por las células infectadas o las células inmunes presentes en el lugar de la infección. La respuesta Th17 se activa generalmente durante las infecciones con bacterias extracelulares a través de la presencia de citoquinas, como la IL-6 y el TGF β (Hume y cols., 2005). Se ha demostrado que las células vasculares endoteliales pueden iniciar y mantener una respuesta inflamatoria en respuesta a microorganismos patógenos (Tekstra y cols., 1999), pero hasta el momento no se ha determinado si las células epiteliales comparten esta facultad.

En el modelo empleado, las células epiteliales corneales secretaban IL-6 de manera basal, incrementando sus valores con el tiempo. Los sobrenadantes de SA, pero no los de PA, incrementaban significativamente la expresión de IL-6. Este dato demuestra que estas células son capaces de reaccionar rápidamente frente a la presencia de PAMPs, mediante el incremento de esta citoquina proinflamatoria. Esta respuesta tan rápida es normal en citoquinas y ocurre a través de un proceso de estabilización del ARNm, que se basa en una traducción casi inmediata tras el estímulo del ARNm estabilizado presente en el citoplasma, como explican Liton y cols. (2009).

Además, Lutter y cols. (2000) exponen que los agentes bacterianos restringen la síntesis de proteínas eucariotas. Para la IL-6, eso se traduciría en una inhibición de la degradación de su ARNm por parte de la célula eucariota. Por eso, en el modelo empleado, a pesar de no observar un incremento en los niveles de ARNm, la secreción de IL-6 sí se vio aumentada. A las 72 h tras el estímulo, los niveles de ARNm disminuyeron, mientras la concentración de proteína secretada seguía aumentando. La disminución de los niveles del ARNm de la IL-6 sugiere un efecto transitorio de la estimulación *in vitro* con los PAMPs de SA. Por otra parte, la estimulación con PA no provocó ningún efecto en los niveles de IL-6 secretada, pero a las 72 h su ARNm disminuía respecto al control, pudiendo significar una regulación por parte de las células epiteliales, que inhibirían la secreción de IL-6 para evitar un medio proinflamatorio en condiciones en las que la presencia de IL-6 no es indispensable. De todas maneras, en este trabajo se empleó una cepa de PA que puede no ser patogénica para la línea celular empleada, por lo que se necesitarían más estudios que determinarían si otras cepas de PA producirían una respuesta diferente.

En cuanto a la expresión de la IL-17 en la SO, se ha demostrado que diferentes situaciones inflamatorias de la SO provocan un aumento en sus niveles de expresión además de los de IL-6 (Maertzdorf y cols., 2002; De Paiva y cols., 2009). Pero, en este modelo, la IL-17A, que es la proteína característica de la respuesta tipo Th17, no incrementaba sus niveles de expresión tras la estimulación de las células epiteliales corneales con sobrenadantes bacterianos. Es más, se observó una disminución en los niveles de su ARNm tras 6 h de estimulación. Esto hace pensar que las células epiteliales corneales no son una fuente fundamental de IL-17 durante la inflamación bacteriana, pero son, sin embargo, capaces de ejercer una regulación negativa a nivel del ARNm.

No obstante, estas células sí que pueden considerarse productoras activas de IL-6, la cual es responsable de la diferenciación de los linfocitos que migren al sitio de la infección a células Th17 (Hohki y cols., 2010). La presencia de estas células inmunes explicaría el incremento en los niveles de IL-17 en la SO observados en los trabajos previamente mencionados. Esta IL-17 presente podría actuar en las células epiteliales vía IL-17RA, que responderían mediante la expresión de factores quimiotácticos o péptidos antimicrobianos como MIP3 α , como se ha visto en el modelo empleado. Estos datos demuestran una función protectora de la IL-17 expresada en respuesta a la infección bacteriana; una función que difiere de su papel patogénico cuando es expresada por las células Th17 en enfermedades inflamatorias crónicas o autoinmunes (Gaffen, 2008).

Al analizar la expresión del sIL-6R, no se observó ningún cambio respecto al control, a pesar del incremento en los niveles de IL-6 secretada, experimentado por las mismas células. Seguramente sea otro tipo celular el encargado de aumentar los niveles de este receptor soluble, para asegurar la propagación de la señal incrementada de IL-6 mediante trans-señalización, y no las propias células epiteliales corneales. Por otra parte, la expresión de la sGP130 se vio incrementada a tiempos cortos, y su expresión disminuía a las 24 h, volviendo a los niveles basales tras 72 h. Teniendo en cuenta que la sGP130 es un antagonista de IL-6 (Heinrich y cols., 1998), estas variaciones podrían reflejar una respuesta reguladora al incremento de IL-6: primero se neutralizaría el potencial proinflamatorio de la IL-6, disminuyendo más tarde para dejar que la citoquina ejerciera su acción, sin provocar el daño derivado de un incremento incontrolado. Basándonos en los resultados de este trabajo, se propone que las mismas células que tienen una alta expresión de IL-6 en respuesta a un estímulo por PAMPs, están también regulando su acción mediante la secreción de un inhibidor, como es la sGP130 (Figura 47).

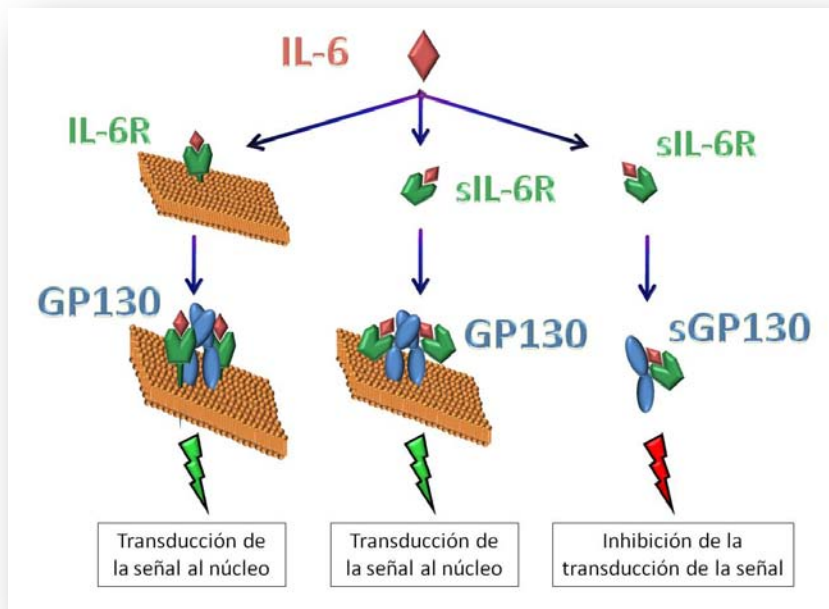


FIGURA 47. Regulación de la señalización y la trans-señalización de la IL-6 por la sGP130.

En este trabajo, además del modelo de inflamación propuesto para el estudio de la participación de las células epiteliales corneales en la respuesta Th17, se ha demostrado la expresión del receptor tipo A de la IL-17 (IL-17RA) en las células epiteliales de la SO. Previamente había sido demostrada la expresión de este receptor en fibroblastos corneales de ratón (Molesworth-Kenyon y cols., 2008) y se había detectado su ARNm en fibroblastos corneales humanos (Maertzdorf y cols., 2002). Pero hasta el momento, no se había identificado su expresión en las células epiteliales de la córnea, del limbo y de la conjuntiva humanas. El patrón que se encontró era diferente para cada uno de estos tejidos. Así, las secciones de córnea y de limbo presentaban una mayor reactividad en las capas más superficiales, mientras que el epitelio conjuntival presentaba una reactividad más homogénea en todas las capas, incluidas las células estromales. Las células en contacto con el exterior, las de las capas más superficiales, son las más expuestas a patógenos y esto coincide con el hecho de que expresen constitutivamente mayor cantidad de receptores IL-17RA, sobre todo las de córnea y limbo, ya que la conjuntiva no es un epitelio implicado directamente en el proceso de la visión.

También se encontraron diferencias relativas a la distribución intracelular del marcaje. En células corneales se encontraba como vesículas perinucleares en el citoplasma, coincidiendo con los resultados *in vitro* de las pruebas de inmunofluorescencia. En las células del limbo, se marcaron preferentemente las regiones de contacto célula-célula, indicando una región activa y una señalización paracrina de la cascada de la IL-17. En las células conjuntivales se encontró un marcaje homogéneo. La presencia del receptor en el citoplasma indica que se trata de un precursor que aguarda la señal adecuada para ser procesado y expresado en la superficie celular.

Se ha descrito la N-glicosilación en células T como un mecanismo de maduración de este receptor (O'Connor y cols., 2009). En pacientes con inflamación oral, el IL-17RA se describe como una proteína glicosilada de 110 kDa (Garley y Jablonska, 2008). Sin embargo, en este trabajo, independientemente de la condición de estudio, el IL-17RA se identificó por *Western blotting* como una banda de 85 kDa, que es un peso menor que el predicho según el análisis de su secuencia de amino-ácidos (96 kDa; [UniProt Knowledgebase](#)). Esto podría ser debido a que se estuviera detectando una forma inmadura de la proteína. Esa forma inmadura podría expresarse en las células epiteliales corneales y la estimulación con sobrenadantes bacterianos podría no ser suficiente para provocar su maduración. Pero al estimular las células con IL-17, el ligando natural de este receptor, se detectaron bandas de ese mismo peso molecular. Por otra parte, el incremento en la secreción de MIP3 α tras el estímulo con IL-17, indica que el receptor que se encontró en la línea celular empleada era funcional y que era capaz de transmitir la señal desencadenada por el ligando (Kao y cols., 2005).

Los datos más relevantes que extraemos de este apartado son los siguientes:

1. Las células epiteliales corneales son capaces de iniciar una respuesta inflamatoria como consecuencia de la exposición a PAMPs, mediante la secreción de IL-6.
2. Estas células no constituyen un aporte esencial de IL-17, pero sí participan en la regulación de la respuesta Th17.
3. El receptor IL-17RA se expresa en los epitelios de la superficie ocular y es un receptor funcional en las células de la línea celular HCE.

Estudio del silenciamiento *in vitro* de la IL-6 usando NPs de CG

En la última parte de este trabajo, se propuso una aproximación terapéutica *in vitro* para las enfermedades inflamatorias de la SO, basada en el silenciamiento génico. Muchas veces la causa de la patogénesis de las enfermedades inflamatorias en la SO, que conllevan daño epitelial y ponen en riesgo la calidad de la visión, es una cronificación del proceso inflamatorio. Silenciar la expresión de una de las citoquinas responsables de la inflamación es una aproximación terapéutica que se puede aplicar a cualquier proceso inflamatorio del cuerpo humano (McCarthy y cols., 2013). Sin embargo, no existen muchas referencias de estudios de este tipo llevados a cabo en el ojo y la mayoría de los trabajos publicados están encaminados a tratar enfermedades que afectan a la parte posterior del ojo, como el glaucoma (Liu y cols., 2012) o la degeneración macular asociada a la edad, con el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) como diana (Campa y Harding, 2011). En el planteamiento de este trabajo, se supuso que la eliminación o la disminución en la expresión de una citoquina como la IL-6 que, como se ha visto con los modelos empleados, está implicada en una gran variedad de procesos inflamatorios de la SO, podría ayudar a cortar el “círculo vicioso” de regulación positiva que la presencia de ésta ocasionaría.

El material genético escogido para la terapia génica fue el siRNA, por las ventajas que ofrece respecto al resto de moléculas efectoras, según se explicó en el apartado de Introducción. Un siRNA óptimo debe ser eficaz y no debe producir ni toxicidad, ni aumento en mediadores proinflamatorios. Aunque el siRNA es una molécula muy sensible a RNasas celulares (Khatri y cols., 2012), al ser este un mecanismo de defensa de las células contra ARNs patógenos (transposones y virus), éste es capaz de entrar a las células mediante endocitosis. La liberación del siRNA de doble cadena desde el endosoma al citoplasma se produce por disminución del pH. La fosforilación del extremos 5' de la cadena antisentido es esencial para que se produzca la unión al ARNm específico, bloqueando de manera efectiva la traducción a proteína (López-Fraga y cols., 2009). Sin embargo, existen estudios que demuestran que la efectividad de la terapia mediante la aplicación de siRNA desnudo al ojo se debe a la activación de los receptores “centinela” tipo Toll (TLR3), y no al propio mecanismo del ARNi (Rossi y cols., 2008; Kleinman y cols., 2012). Para evitar esta respuesta inespecífica, el siRNA debe ser administrado mediante el empleo

de vehículos que lo protejan, en primer lugar, de estos receptores TLR3 de la superficie celular y, una vez dentro de la célula, de las nucleasas celulares.

Por otra parte, se sabe que cuando se utiliza un tratamiento tópico para tratar enfermedades en la parte anterior del ojo, generalmente hacen falta altas cantidades de fármaco, porque la mayor parte se va a perder rápidamente antes de alcanzar las células de la SO, a causa del parpadeo y del drenaje de la lágrima (Baeyens y Gurny, 1997). Además, una cierta cantidad del fármaco va a perderse debido a la barrera que supone la película lagrimal y la barrera epitelial corneal. Por otro lado, la conjuntiva y la esclera, ambas extraordinariamente permeables, van a dar lugar a una absorción no productiva y a un acceso del fármaco a la circulación sistémica (Urtti, 2006). Por todo esto, una buena vía de entrada no invasiva para dianas situadas en la parte anterior del ojo sería, teóricamente, a través de las células corneales, que son las que se han empleado en este trabajo. Para lograr que el fármaco llegue a penetrar en la célula diana, es importante aumentar el tiempo de permanencia en contacto con la superficie celular. Esto se logra gracias al empleo de vehículos biocompatibles (mucoadherentes y de fácil biodegradación), que llevan incorporada la molécula activa y facilitan su liberación al interior celular (Kompella y cols., 2010).

Entre los posibles vehículos para la administración de material genético al globo ocular (liposomas, micropartículas, dendrímeros, agentes de transfección, etc.), las NPs ofrecen varias ventajas, como son: 1. la protección de las secuencias de oligonucleótidos de las nucleasas, 2. una alta biocompatibilidad y 3. una liberación controlada del material genético para una administración sostenida en el tiempo (Cruz y cols., 2012).

Además de esta necesidad fisiológica de asociar los siRNA a las NPs, en los experimentos preliminares de puesta a punto del silenciamiento, se había observado que la internalización del siRNA desnudo en células corneales epiteliales *in vitro* era muy baja, casi nula. El silenciamiento obtenido aumentaba hasta cerca de un 70% cuando el siRNA se administraba acompañado de un agente de transfección, como la Lipofectamina, cuyo uso no es apto para fines terapéuticos.

La molécula diana de los siRNA elegidos fue la IL-6, por las razones expuestas previamente. Se seleccionaron dos secuencias de siRNA comerciales, validadas, para comparar los resultados obtenidos con dos secuencias

complementarias a dos regiones diferentes de la secuencia de ARNm de la IL-6 y poder seleccionar la que mejores resultados proporcionara. Lo primero que llamó la atención es que las concentraciones de siGAPDH que proporcionaron buenos resultados de silenciamiento (20 y 40 nM), con el agente de transfección Lipofectamina, no eran suficientes para silenciar la IL-6. Por este motivo hubo que aumentar la concentración de siIL-6 hasta encontrar una que diera resultados aceptables (160 nM).

Los tres tipos de NPs diseñadas tenían un tamaño inferior a 280 nm en todos los casos y un potencial zeta de alrededor de los +20 mV. El porcentaje de internalización de estas NPs era superior al 50% tras 3 h de contacto, produciéndose menos de un 10% de muerte celular. En la SO, es difícil que un fármaco permanezca 3 h, por los motivos que se han explicado previamente. Sin embargo, el empleo de NPs aumenta la biodisponibilidad del fármaco y al estar formadas por biomateriales con capacidad mucoadherente, se incrementa el tiempo de permanencia de las mismas en la SO, antes de que el lagrimeo o el parpadeo las desplace por los conductos lagrimales (Alonso & Sánchez, 2004). Según el análisis de la influencia de la concentración del siRNA en el silenciamiento obtenido, un aumento de la concentración del siRNA al doble proporcionaba un incremento de la internalización hasta casi un 60%, sin comprometer la viabilidad celular.

A pesar de ser unas NPs prometedoras con unas características físico-químicas adecuadas para la liberación del siRNA al interior celular, al cuantificar la expresión de IL-6 tanto a nivel de proteína como a nivel de ARNm, los resultados estuvieron bastante alejados de lo esperado: no se superó el 30% de silenciamiento a nivel de proteína secretada ni el 20% de silenciamiento a nivel de ARNm. Se pueden dar tres posibles explicaciones a este hecho: la primera, que las secuencias de siRNA no fueran específicas; la segunda, que las NPs no proporcionaran una buena liberación del siRNA; y la tercera, que la diana terapéutica no fuera la adecuada.

El hecho de haber elegido dos secuencias de siRNA complementarias al ARNm de la IL-6 comerciales y validadas debería garantizar que las secuencias fueran específicas. Sin embargo, estas secuencias habían sido validadas en células HeLa, línea celular proveniente de carcinoma cervical. Al ser una línea de cáncer es posible que la secuencia del gen de la IL-6 haya sufrido alguna mutación y, por lo tanto, las secuencias que funcionan en esa línea celular no sean completamente adecuadas para la línea celular epitelial corneal con la que

se han hecho los estudios. No obstante, estas secuencias fueron elegidas en un principio por ser las que presentaban las características más adecuadas a los requerimientos de los ensayos llevados a cabo, respecto a las otras casas comerciales consultadas.

Por otra parte, las NPs basadas en CG demostraron tener una tasa de internalización bastante elevada, manteniendo una buena viabilidad celular. Los niveles de silenciamiento de la IL-6, más bajos de lo esperado, no pueden deberse, por lo tanto, a un efecto tóxico de las NPs. Sin embargo, la capacidad de liberación del siRNA de las NPs no ha sido comprobada. Podría ocurrir que el siRNA quedara atrapado en el entramado de la NP, sin llegar a ser liberado al citoplasma, incapaz de unirse al ARNm diana. No obstante, considerando la baja tasa de silenciamiento obtenida con el siIL-6 vehiculizado con Lipofectamina, posiblemente ésta no sea la razón del fracaso del silenciamiento en este modelo.

Las consideraciones expuestas llevan a pensar que, tal vez, elegir una citoquina como diana para el silenciamiento no sea lo más adecuado. El siRNA actúa a nivel del ARNm provocando su degradación por nucleasas. Sin embargo, desde hace tiempo es conocida la presencia de elementos ricos en adenosina/uridina en la región 3' terminal no transcrita del ARNm que juegan un papel fundamental en la estabilización del ARNm de citoquinas para protegerlo de la degradación mediada por ribonucleasas (Chen y Shyu, 1995). Esta protección del ARNm de citoquinas de las ribonucleasas puede ser la razón del fracaso del silenciamiento mediado por siRNA, cuando la diana terapéutica es la propia citoquina. A pesar de todo, algunos autores han conseguido resultados prometedores silenciando citoquinas, como el TNF α (Pileczki y cols., 2012; Sun y cols., 2013) o la IL-8 (Kuai y cols., 2012).

La intención original en este trabajo era la de unir los apartados de los modelos de inflamación *in vitro* con el apartado de silenciamiento de la IL-6, evaluando el efecto del silenciamiento de ésta en los diferentes modelos. El silenciamiento mediante siRNA de diferentes moléculas implicadas en la inflamación ocular ha sido probado previamente en modelos de inflamación por cicatrización corneal (Gorovoy y cols., 2008), de neovascularización (Seta y cols., 2007) y de queratitis infecciosas (Guo y cols., 2012; Sauer y cols., 2012). Sin embargo, esta aproximación terapéutica resulta ser una tecnología con un alto coste y, al no haber obtenido un buen porcentaje de silenciamiento en la puesta a punto (al menos de un 70-80% como en las pruebas con GAPDH o

como el obtenido en los trabajos mencionados), se decidió no probar el silenciamiento en los modelos.

Otra aproximación para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la SO, basada en el silenciamiento génico, sería la consideración del receptor de la IL-6 o alguna de las moléculas de su vía de señalización para su silenciamiento. El empleo de receptores de citoquinas como potenciales dianas terapéuticas es una opción que se ha evaluado en otros trabajos con buenos resultados (Hou y cols., 2013). Por ejemplo, la disminución en la expresión del receptor 2 del TGF β en fibroblastos corneales provocaba una disminución en la respuesta inflamatoria, inhibiendo la vía de señalización del TGF β (Nakamura y cols., 2004).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado del modelo de inflamación por citoquinas, se podría seleccionar la GP130 como potencial diana para el silenciamiento, ya que fue la molécula que vio su expresión más alterada en este modelo, en respuesta a todas las citoquinas probadas. Por falta de tiempo no se han incluido estos experimentos en este trabajo. Sería interesante, en un futuro, probar a silenciar la GP130 en un modelo de inflamación *in vitro* por citoquinas. Así, se podrían evaluar los efectos de este silenciamiento en las demás moléculas de la vía de señalización de la IL-6 y en la expresión de otros mediadores de la respuesta inflamatoria, como diferentes citoquinas (IL-1, IL-8 o IFN γ), factores (TGF β o VEGF) o receptores (TLRs o CD44).

Los datos más relevantes que se extraen de este apartado son los siguientes:

1. Las NPs de gelatina cationizada con espermina y condroitín sulfato presentan unas características apropiadas para la liberación de material genético al interior de células epiteliales corneales.

2. El silenciamiento génico mediante siRNA de citoquinas proinflamatorias no es una aproximación terapéutica efectiva en nuestro modelo de trabajo.

CONCLUSIONES

“Si no lo escribirías y firmarías, no lo digas.”

(E. Wilson)

“If you wouldn’t write it and sign it, don’t say it.”



1. La IL-6 y la IL-17 contribuyen a la cronificación del estatus inflamatorio de las células epiteliales de la línea celular de epitelio de córnea humana HCE, en un modelo *in vitro* de inflamación corneal por exposición a citoquinas, ejerciendo ambas una autorregulación positiva en el mantenimiento de este estatus.
2. La presencia de la IL-6, pero no de la IL-10, incrementa la velocidad de cicatrización de las células HCE en un modelo de herida corneal. Esta cicatrización es el resultado no sólo de la migración celular, también contribuye la proliferación celular.
3. Las células HCE son capaces de iniciar una respuesta inflamatoria en respuesta a sobrenadantes bacterianos, aumentando la producción de la IL-6 y regulando la respuesta proinflamatoria mediante la secreción variable de la sGP130.
4. El receptor A de la IL-17 está presente en los epitelios corneal, limbar y conjuntival de la superficie ocular humana. También se ha identificado este receptor en la línea celular HCE, donde se ha demostrado que es funcional.
5. El aumento de la producción de la IL-6 y la presencia del receptor A de la IL-17, que es funcional en la línea celular HCE, sugieren una participación activa de las células epiteliales de la córnea en la respuesta inmune tipo Th17.
6. Las nanopartículas basadas en gelatina cationizada son vehículos eficaces para la liberación controlada de siRNA al interior de las células HCE para silenciar la expresión de la IL-6. Sin embargo, esta estrategia, como terapia potencialmente útil para las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular, no es una aproximación efectiva en las condiciones experimentales empleadas.



LIMITACIONES

En este trabajo se han presentado resultados derivados de la utilización de tres modelos *in vitro* de inflamación de la superficie ocular. Como cualquier otro modelo *in vitro*, éstos van a presentar una serie de limitaciones respecto a la situación real. Pero como ya se argumentó en el apartado de Justificación, este tipo de modelo permite discernir los efectos aislados de la población celular estudiada. Sin embargo, nunca va a poder permitir, por ejemplo, el estudio histológico de tejidos inflamados, ni el estudio de la quimiotaxis de células específicamente inmunes, como los linfocitos, que en cualquier proceso inflamatorio son reclutados desde los ganglios más cercanos al sitio donde ocurre el proceso inflamatorio. Además, es bien sabido que las células estromales, los fibroblastos y las células endoteliales tienen también un papel importante en los procesos inflamatorios de la superficie ocular. Mediante el estudio de los modelos de este trabajo, basados exclusivamente en células epiteliales, no se consigue valorar esta aportación.

En relación con aspectos más técnicos, este trabajo también tiene varias limitaciones. Por ejemplo, en el primer modelo, de inflamación corneal inducida por exposición a citoquinas, se estudiaba la expresión del pSTAT3, que es un mediador activado cuyo lugar de acción es el núcleo. Por lo tanto, el pSTAT3 tendría una expresión nuclear, pero para poder analizarlo por electroforesis y *Western blot* tendríamos que haber hecho un fraccionamiento del lisado celular, que no se hizo por no disponer de ultracentrífuga, y podría haber aportado más información al respecto. Los ensayos de citolocalización por inmunofluorescencia que se hicieron para superar esta deficiencia no dieron resultados, ya que no se consiguió poner a punto la técnica de inmunodetección por fluorescencia del pSTAT3. En cuanto al segundo modelo, de herida corneal, solamente se pudieron seleccionar heridas de máximo 600 µm de anchura, para poder visualizarlas y medirlas con los objetivos, la cámara y el software disponible. Sin embargo, las heridas provocadas por incisiones quirúrgicas o por traumatismos pueden ser de mayor tamaño. Haría falta una nueva aproximación para valorar el efecto de las condiciones estudiadas en heridas de tamaño mayor. En el tercer modelo, se estimularon las células con sobrenadantes bacterianos y la limitación en este caso es clara: un

sobrenadante del cultivo bacteriano no es igual que una bacteria infectando una célula. Las células corneales podrían responder de diferente modo al estímulo provocado por bacterias vivas y secretar más cantidad de IL-17 o expresar más receptores para IL-17 en su superficie. No obstante, estos modelos de trabajo se utilizan con frecuencia porque, por el momento, no se dispone de modelos *in vitro* tridimensionales para realizar aproximaciones experimentales más completas antes de llegar al modelo animal de enfermedad.

Por otra parte, se ha introducido un tratamiento estadístico diferente a los demás en el modelo de herida corneal. Gracias al consejo de un estadístico, se consideró oportuno el uso de nuevas herramientas estadísticas que proporcionasen resultados más robustos. Por robustos se entiende que la significación estadística sea más independiente de los errores producidos por la propia metodología de experimentación. Aunque la intención era la de emplear este mismo análisis para todos los datos, el tamaño de la muestra supuso un impedimento: mientras que el número de observaciones para el modelo de herida corneal era de 90 para cada condición, en otros ensayos, como el de inflamación corneal inducida por exposición a citoquinas o a sobrenadantes bacterianos, se hicieron solamente duplicados de tres experimentos independientes (es decir, 6 observaciones), debido a las características propias de la técnica.

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Este trabajo ha dado lugar a la siguiente publicación, que se puede encontrar como Anexo I (página 191):

- Isabel Arranz-Valsero, Ute Schulze, Laura Contreras-Ruiz, Laura García-Posadas, Antonio López-García, Friedrich Paulsen, Yolanda Diebold. Título: “Involvement of corneal epithelial cells in the Th17 response in an *in vitro* bacterial inflammation model”. *Molecular Vision* 2013; 19: 85-99

Y a las siguientes comunicaciones a congresos:

- Jenny E. Párraga, Isabel Arranz-Valsero, Giovanni K. Zorzi, Yolanda Diebold, Begoña Seijo, Alejandro Sánchez. Título: “Cationized Gelatin/Chondroitin Sulphate Nanoparticles for siRNA Delivery”. Presentación en póster en el congreso: 3rd International Symposium of Therapeutic Macromolecules (Cardiff, Reino Unido), del 26 al 29 de junio de 2010.
- Isabel Arranz-Valsero, Ute Schulze, Laura Contreras-Ruiz, Laura García-Posadas, Antonio López-García, Friedrich Paulsen, Yolanda Diebold. Título: “Involvement of Corneal Epithelial Cells in the Th17 Response in an *In Vitro* Bacterial Inflammation Model”. Presentación en póster en el congreso: ARVO 2012 Annual Meeting (Fort Lauderdale, Florida), del 6 al 10 de mayo de 2012. Publicación: ARVO Meeting Abstracts March 26, 2012; 53:6141.
- Isabel Arranz-Valsero, Laura Soriano-Romaní, Antonio López-García, Laura García-Posadas, Yolanda Diebold. Título: “Effects of IL-6 and IL-10 on an *in vitro* model of corneal wound healing”. Presentación en póster en el congreso: AOPT 2013 (Alicante), del 7 al 10 de febrero de 2013.



BIBLIOGRAFÍA

- Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P, et al. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2012.
- Ahmed B, Tschen JA, Cohen PR, et al. Cutaneous castleman's disease responds to anti interleukin-6 treatment. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:2386-90.
- Allen D, Habib M, and Steel D. Final incision size after implantation of a hydrophobic acrylic aspheric intraocular lens: New motorized injector versus standard manual injector. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38:249-55.
- Alonso MJ, and Sánchez A. Biodegradable nanoparticles as new transmucosal drug carriers. Sönke Svenson. *In Carrier-Based Drug Delivery*. Washington DC: ACS Symposium Series: 2004. 283-95 pp.
- Alonso MJ, Calvo P, Remuñán C, et al. *Application of nanoparticles based on hydrophilic polymers as pharmaceutical forms*. EE.UU. patent 2001/0051189.
- Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:614-21.
- Arranz-Valsero I, Schulze U, Contreras-Ruiz L, et al. Involvement of corneal epithelial cells in the Th17 response in an in vitro bacterial inflammation model. *Mol Vis* 2013; 19:85-99.
- Baeyens V, and Gurny R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. *Pharm Acta Helv* 1997; 72:191-202.
- Barequet IS, Habet-Wilner Z, Keller N, et al. Effect of amniotic membrane transplantation on the healing of bacterial keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:163-7.
- Baudouin C, Hamard P, Liang H, et al. Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology* 2004; 111:2186-92.
- Bellinghausen I, Knop J, and Saloga J. The role of interleukin 10 in the regulation of allergic immune responses. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126:97-101.
- Blake SJ, Bokhari FF, and McMillan NA. RNA interference for viral infections. *Curr Drug Targets* 2012; 13:1411-20.
- Boorstein SM, Elnor SG, Meyer RF, et al. Interleukin-10 inhibition of HLA-DR expression in human herpes stromal keratitis. *Ophthalmology* 1994; 101:1529-35.
- Bora RS, Gupta D, Mukkur TK, et al. RNA interference therapeutics for cancer: Challenges and opportunities (review). *Mol Med Rep* 2012; 6:9-15.
- Borras T. Advances in glaucoma treatment and management: Gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:2506-10.

- Calonge M. Classification of ocular atopic/allergic disorders and conditions: An unsolved problem. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 1999; (228):10-3.
- Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, et al. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res* 1997a; 14:1431-6.
- Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* 1997b; 63:125-32.
- Campa C, and Harding SP. Anti-VEGF compounds in the treatment of neovascular age related macular degeneration. *Curr Drug Targets* 2011; 12:173-81.
- Carlson EC, Liu CY, Yang X, et al. In vivo gene delivery and visualization of corneal stromal cells using an adenoviral vector and keratocyte-specific promoter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2194-200.
- Caskey M, Lefebvre F, Filali-Mouhim A, et al. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J Exp Med* 2011; 208:2357-66.
- Cassoux N, Giron A, Bodaghi B, et al. IL-10 measurement in aqueous humor for screening patients with suspicion of primary intraocular lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:3253-9.
- Chen CY, and Shyu AB. AU-rich elements: Characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 1995; 20:465-70.
- Chen SX, Huang FY, Tan GH, et al. RNA interference against interleukin-5 attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in an asthma model. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10:22-8.
- Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, et al. IL-17 is essential for host defense against cutaneous staphylococcus aureus infection in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:1762-73.
- Cobbold SP, Nolan KF, Graca L, et al. Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation tolerance: Molecular markers and mechanisms. *Immunol Rev* 2003; 196:109-24.
- Conley SM, Cai X, and Naash MI. Nonviral ocular gene therapy: Assessment and future directions. *Curr Opin Mol Ther* 2008; 10:456-63.
- Conti S, Polonelli L, Frazzi R, et al. Controlled delivery of biotechnological products. *Curr Pharm Biotechnol* 2000; 1:313-23.
- Contreras-Ruiz L, Schulze U, Garcia-Posadas L, et al. Structural and functional alteration of corneal epithelial barrier under inflammatory conditions. *Curr Eye Res* 2012a; 37:971-81.
- Contreras-Ruiz L, Zorzi GK, Hileeto D, et al. A nanomedicine to treat ocular surface inflammation: Performance on an experimental dry eye murine model. *Gene Ther* 2012b.
- Contreras-Ruiz L, de la Fuente M, Parraga JE, et al. Intracellular trafficking of hyaluronic acid-chitosan oligomer-based nanoparticles in cultured human ocular surface cells. *Mol Vis* 2011; 17:279-90.

- Contreras-Ruiz L, de la Fuente M, Garcia-Vazquez C, et al. Ocular tolerance to a topical formulation of hyaluronic acid and chitosan-based nanoparticles. *Cornea* 2010; 29:550-8.
- Coolen NA, Schouten KC, Boekema BK, et al. Wound healing in a fetal, adult, and scar tissue model: A comparative study. *Wound Repair Regen* 2010; 18:291-301.
- Cruz NM, Yuan Y, Baid R, et al. Efficacy of nanoparticle-based gene delivery for rescuing Nr2e3 associated retinal degeneration. *ARVO Meeting Abstracts* 2012; 53:1884.
- Cua DJ, and Tato CM. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:479-89.
- Dallas A, and Vlassov AV. RNAi: A novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit* 2006; 12:RA67-74.
- Das Sarma J, Ciric B, Marek R, et al. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 2009; 6:14.
- Davies JB, Ciavatta VT, Boatright JH, et al. Delivery of several forms of DNA, DNA-RNA hybrids, and dyes across human sclera by electrical fields. *Mol Vis* 2003; 9:569-78.
- de Campos AM, Diebold Y, Carvalho EL, et al. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: In vitro stability, in vivo fate, and cellular toxicity. *Pharm Res* 2004; 21:803-10.
- de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, et al. Interfering with disease: A progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6:443-53.
- De Kozak Y, Thillaye-Goldenberg B, Naud MC, et al. Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by systemic and subconjunctival adenovirus-mediated transfer of the viral IL-10 gene. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:212-23.
- de la Fuente M, Seijo B, and Alonso MJ. Novel hyaluronan-based nanocarriers for transmucosal delivery of macromolecules. *Macromol Biosci* 2008a; 8:441-50.
- de la Fuente M, Seijo B, and Alonso MJ. Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Ther* 2008b; 15:668-76.
- De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, et al. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol* 2009; 2:243-53.
- D'Elia MM, Benagiano M, Della Bella C, et al. T-cell response to bacterial agents. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5:640-5.
- Diebold Y, Contreras-Ruiz L, Arranz-Valseiro I, et al. Drug delivery systems for ophthalmic administration of anti-inflammatory agents. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2011; 10:203-14.
- Diebold Y, and Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29:596-609.
- Diebold Y, Jarrin M, Saez V, et al. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials* 2007; 28:1553-64.

- Dorsett Y, and Tuschl T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:318-29.
- Dyer AM, Hinchcliffe M, Watts P, et al. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles. *Pharm Res* 2002; 19:998-1008.
- Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, et al. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:8549-57.
- Eckes B, Zigrino P, Kessler D, et al. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol* 2000; 19:325-32.
- Edwards AM, Potts JR, Josefsson E, et al. Staphylococcus aureus host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1000964.
- Ekblad L, Lindgren G, Persson E, et al. Cell-line-specific stimulation of tumor cell aggressiveness by wound healing factors - a central role for STAT3. *BMC Cancer* 2013; 13:33,2407-13-33.
- Ely LK, Fischer S, and Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol* 2009; 10:1245-51.
- Enriquez de Salamanca A, Diebold Y, Calonge M, et al. Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: Toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:1416-25.
- Enriquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010; 16:862-73.
- Enriquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, et al. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: An in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine* 2008; 44:160-7.
- Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, et al. Keratolimbic allograft in corneal reconstruction. *Eye (Lond)* 2004; 18:406-17.
- Estornes Y, Toscano F, Virard F, et al. dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8. *Cell Death Differ* 2012.
- Ferrari G, Bignami F, Giacomini C, et al. Safety and efficacy of topical infliximab in a mouse model of ocular surface scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54:1680-8.
- Fleiszig SM, Zaidi TS, and Pier GB. Pseudomonas aeruginosa invasion of and multiplication within corneal epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 1995; 63:4072-7.
- Fleiszig SM, Zaidi TS, Fletcher EL, et al. Pseudomonas aeruginosa invades corneal epithelial cells during experimental infection. *Infect Immun* 1994; 62:3485-93.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:556-67.
- Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 2008; 43:402-7.
- Garley M, and Jablonska E. Chosen IL-17 family proteins in neutrophils of

- patients with oral inflammation. *Adv Med Sci* 2008; 53:326-30.
- Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, et al. Roles of IL-10 in ocular inflammations: A review. *Ocul Immunol Inflamm* 2012; 20:406-18.
- Gomes Dos Santos AL, Bochot A, and Fattal E. Intraocular delivery of oligonucleotides. *Curr Pharm Biotechnol* 2005; 6:7-15.
- Gorovoy M, Koga T, Shen X, et al. Downregulation of LIM kinase 1 suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol Vis* 2008; 14:1951-9.
- Gu FM, Li QL, Gao Q, et al. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2011; 10:150,4598-10-150.
- Guo H, Gao J, and Wu X. Toll-like receptor 2 siRNA suppresses corneal inflammation and attenuates aspergillus fumigatus keratitis in rats. *Immunol Cell Biol* 2012; 90:352-7.
- Hackett JM, Lagali N, Merrett K, et al. Biosynthetic corneal implants for replacement of pathologic corneal tissue: Performance in a controlled rabbit alkali burn model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:651-7.
- Hao J, Li SK, Kao WW, et al. Gene delivery to cornea. *Brain Res Bull* 2010; 81:256-61.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, et al. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334 (Pt 2):297-314.
- Hirano Y, Sakurai E, Matsubara A, et al. Suppression of ICAM-1 in retinal and choroidal endothelial cells by plasmid small-interfering RNAs in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:508-15.
- Hohki S, Ohguro N, Haruta H, et al. Blockade of interleukin-6 signaling suppresses experimental autoimmune uveoretinitis by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Exp Eye Res* 2010; 91:162-70.
- Hou J, Townson SA, Kovalchin JT, et al. Design of a superior cytokine antagonist for topical ophthalmic use. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:3913-8.
- Hume EB, Cole N, Khan S, et al. A staphylococcus aureus mouse keratitis topical infection model: Cytokine balance in different strains of mice. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:294-300.
- Kao CY, Huang F, Chen Y, et al. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2005; 175:6676-85.
- Keister JC, Cooper ER, Missel PJ, et al. Limits on optimizing ocular drug delivery. *J Pharm Sci* 1991; 80:50-3.
- Khatri N, Rathi M, Baradia D, et al. In vivo delivery aspects of miRNA, shRNA and siRNA. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2012; 29:487-527.
- Kim MR, Manoukian R, Yeh R, et al. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood* 2002; 100:2330-40.
- Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20:639-73.

- Klebe S, Sykes P, Coster D, et al. Prolongation of sheep corneal allograft survival by ex vivo transfer of the gene encoding interleukin-10. *transplantation* 2001; 71: 1214. *Transplantation* 2001; 71:1207-9.
- Kleinman ME, Kaneko H, Cho WG, et al. Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol Ther* 2012; 20:101-8.
- Kompella UB, Kadam RS, and Lee VH. Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv* 2010; 1:435-56.
- Konat Zorzi G, Contreras-Ruiz L, Parraga JE, et al. Expression of MUC5AC in ocular surface epithelial cells using cationized gelatin nanoparticles. *Mol Pharm* 2011; 8:1783-8.
- Kramer JM, Hanel W, Shen F, et al. Cutting edge: Identification of a pre-ligand assembly domain (PLAD) and ligand binding site in the IL-17 receptor. *J Immunol* 2007; 179:6379-83.
- Kuai WX, Wang Q, Yang XZ, et al. Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2012; 18:979-85.
- Lee JH, Lee W, Kwon OH, et al. Cytokine profile of peripheral blood in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic retinopathy. *Ann Clin Lab Sci* 2008; 38:361-7.
- Leonardi A, Motterle L, and Bortolotti M. Allergy and the eye. *Clin Exp Immunol* 2008; 153 Suppl 1:17-21.
- Leung RK, and Whittaker PA. RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 2005; 107:222-39.
- Lewis AC. Interleukin-6 in the pathogenesis of posterior capsule opacification and the potential role for interleukin-6 inhibition in the future of cataract surgery. *Med Hypotheses* 2013; 80:466-74.
- Li X, Mai J, Virtue A, et al. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine-- a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One* 2012; 7:e33628.
- Liang CC, Park AY, and Guan JL. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007; 2:329-33.
- Liang H, Baudouin C, Daull P, et al. In vitro and in vivo evaluation of a preservative-free cationic emulsion of latanoprost in corneal wound healing models. *Cornea* 2012; 31:1319-29.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203:2271-9.
- Liton PB, Li G, Luna C, et al. Cross-talk between TGF-beta1 and IL-6 in human trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 2009; 15:326-34.
- Liu Q, Wu K, Qiu X, et al. siRNA silencing of gene expression in trabecular meshwork: RhoA siRNA reduces IOP in mice. *Curr Mol Med* 2012; 12:1015-27.
- López-Fraga M, Martínez T, and Jiménez A. RNA interference technologies and therapeutics. *BioDrugs* 2009; 23:305-32.
- Lutter R, Loman S, Snoek M, et al. IL-6 protein production by airway epithelial(-like) cells disabled in IL-6

- mRNA degradation. *Cytokine* 2000; 12:1275-9.
- Maertzdorf J, Osterhaus AD, and Verjans GM. IL-17 expression in human herpetic stromal keratitis: Modulatory effects on chemokine production by corneal fibroblasts. *J Immunol* 2002; 169:5897-903.
- Marquart ME. Animal models of bacterial keratitis. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:680642.
- Matsumoto G, Kushibiki T, Kinoshita Y, et al. Cationized gelatin delivery of a plasmid DNA expressing small interference RNA for VEGF inhibits murine squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2006; 97:313-21.
- Maurice DM, and Mishima S. Ocular pharmacokinetics. M. L. Sears. *In Handbook of experimental pharmacology*. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag; 1984. 16-119.
- McAllister F, Henry A, Kreindler JL, et al. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene- α and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: Implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol* 2005; 175:404-12.
- McCarthy J, O'Neill MJ, Bourre L, et al. Gene silencing of TNF- α in a murine model of acute colitis using a modified cyclodextrin delivery system. *J Control Release* 2013; 168:28-34.
- McGeachy MJ, and Cua DJ. Th17 cell differentiation: The long and winding road. *Immunity* 2008; 28:445-53.
- Mediero A, Alarma-Estrany P, and Pintor J. New treatments for ocular hypertension. *Auton Neurosci* 2009; 147:14-9.
- Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, et al. Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes: Possible mechanism during corneal healing. *Exp Eye Res* 2006; 83:747-57.
- Mochizuki M, Sugita S, and Kamoi K. Immunological homeostasis of the eye. *Prog Retin Eye Res* 2013; 33:10-27.
- Molesworth-Kenyon SJ, Yin R, Oakes JE, et al. IL-17 receptor signaling influences virus-induced corneal inflammation. *J Leukoc Biol* 2008; 83:401-8.
- Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: Input and output integration. *J Immunol* 2007; 178:2623-9.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003; 171:6173-7.
- Nakamura H, Siddiqui SS, Shen X, et al. RNA interference targeting transforming growth factor- β type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol Vis* 2004; 10:703-11.
- Nakamura M, and Nishida T. Differential effects of epidermal growth factor and interleukin 6 on corneal epithelial cells and vascular endothelial cells. *Cornea* 1999; 18:452-8.
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420:846-52.
- Obata Y, Nishino T, Kushibiki T, et al. HSP47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Acta Biomater* 2012; 8:2688-96.

BIBLIOGRAFÍA

- O'Connor W, Jr, Kamanaka M, Booth CJ, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009; 10:603-9.
- Onishi RM, Park SJ, Hanel W, et al. SEF/IL-17R (SEFIR) is not enough: An extended SEFIR domain is required for il-17RA-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2010; 285:32751-9.
- Paolicelli P, de la Fuente M, Sanchez A, et al. Chitosan nanoparticles for drug delivery to the eye. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6:239-53.
- Pappu R, Rutz S, and Ouyang W. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol* 2012; 33:343-9.
- Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, et al. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol* 2010; 30:185-95.
- Paulsen F, Jager K, Worlitzsch D, et al. Regulation of MUC16 by inflammatory mediators in ocular surface epithelial cell lines. *Ann Anat* 2008; 190:59-70.
- Peate WF. Work-related eye injuries and illnesses. *Am Fam Physician* 2007; 75:1017-22.
- Pileczki V, Braicu C, Gherman CD, et al. TNF-alpha gene knockout in triple negative breast cancer cell line induces apoptosis. *Int J Mol Sci* 2012; 14:411-20.
- Ramaesh T, Ramaesh K, Riley SC, et al. Effects of N-acetylcysteine on matrix metalloproteinase-9 secretion and cell migration of human corneal epithelial cells. *Eye (Lond)* 2012; 26:1138-44.
- Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 2003; 9:210-6.
- Resnikoff S, and Keys TU. Future trends in global blindness. *Indian J Ophthalmol* 2012; 60:387-95.
- Riemens A, Stoyanova E, Rothova A, et al. Cytokines in tear fluid of patients with ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Mol Vis* 2012; 18:797-802.
- Romagnani P, and Crescioli C. CXCL10: A candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta* 2012; 413:1364-73.
- Rossi J, Zamore P, and Kay MA. Wandering eye for RNAi. *Nat Med* 2008; 14:608-11.
- Russell P, Walsh E, Chen W, et al. The effect of temperature on gene silencing by siRNAs: Implications for silencing in the anterior chamber of the eye. *Exp Eye Res* 2006; 82:1011-6.
- Sabat R, Grutz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21:331-44.
- Saito T, and Tabata Y. Preparation of gelatin hydrogels incorporating small interfering RNA for the controlled release. *J Drug Target* 2012; 20:864-72.
- Salmaggi A, Dufour A, Eoli M, et al. Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: Further evidence for decreased systemic immunosuppression? *J Neurol* 1996; 243:13-7.
- Sánchez A, and Alonso MJ. Nanoparticulate carriers for ocular drug delivery. V. P. Torchilin. In *Nanoparticulates as drug carriers*. Northeastern University, EE.UU.: 2006. 639-61.

- Sauer A, Pfaff AW, Villard O, et al. Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and antiparasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J Infect Dis* 2012; 206:1319-29.
- Scherer LJ, and Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol* 2003; 21:1457-65.
- Seet LF, Su R, Toh LZ, et al. In vitro analyses of the anti-fibrotic effect of SPARC silencing in human tenon's fibroblasts: Comparisons with mitomycin C. *J Cell Mol Med* 2012; 16:1245-59.
- Seta F, Patil K, Bellner L, et al. Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by siRNA targeting cytochrome P450 4B1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; 84:116-27.
- Shi JH, Guan H, Shi S, et al. Protection against TGF-beta1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. *Arch Dermatol Res* 2013.
- Shoji J, Kawaguchi A, Gotoh A, et al. Concentration of soluble interleukin-6 receptors in tears of allergic conjunctival disease patients. *Jpn J Ophthalmol* 2007; 51:332-7.
- Silver JS, and Hunter CA. Gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* 2010; 88:1145-56.
- Stern ME, Gao J, Siemasko KF, et al. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004; 78:409-16.
- Stevenson M. Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:851-8.
- Storvold GL, Andersen TI, Perou CM, et al. siRNA: A potential tool for future breast cancer therapy? *Crit Rev Oncog* 2006; 12:127-50.
- Subramaniam A, Shanmugam MK, Perumal E, et al. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1835:46-60.
- Sugaya S, Sakimoto T, Shoji J, et al. Regulation of soluble interleukin-6 (IL-6) receptor release from corneal epithelial cells and its role in the ocular surface. *Jpn J Ophthalmol* 2011; 55:277-82.
- Sun K, Li Y, Lu Z, et al. Suppression of titanium particle-induced TNF-alpha expression and apoptosis in human U937 macrophages by siRNA silencing. *Int J Artif Organs* 2013:0.
- Szodoray P, Gal I, Barath S, et al. Immunological alterations in newly diagnosed primary sjogren's syndrome characterized by skewed peripheral T-cell subsets and inflammatory cytokines. *Scand J Rheumatol* 2008; 37:205-12.
- Tekstra J, Beekhuizen H, Van De Gevel JS, et al. Infection of human endothelial cells with staphylococcus aureus induces the production of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and monocyte chemotaxis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:489-95.
- Tenhumberg S, Waetzig GH, Chalaris A, et al. Structure-guided optimization of the

- interleukin-6 trans-signaling antagonist gp130. *J Biol Chem* 2008; 283:27200-7.
- Thiele K, Riemann D, Navarrete Santos A, et al. Cell-cell contact of human T cells with fibroblasts changes lymphocytic mRNA expression: Increased mRNA expression of interleukin-17 and interleukin-17 receptor. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11:53-8.
- Tolentino MJ, Brucker AJ, Fosnot J, et al. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 2004; 24:132-8.
- Traum D, Timothee P, Silver J, et al. IL-10-induced gp130 expression in mouse mast cells permits IL-6 trans-signaling. *J Leukoc Biol* 2012; 91:427-35.
- Turchinovich A, Zoidl G, and Dermietzel R. Non-viral siRNA delivery into the mouse retina in vivo. *BMC Ophthalmol* 2010; 10:25.
- Turner K, Pflugfelder SC, Ji Z, et al. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea* 2000; 19:492-6.
- Ueta M, and Kinoshita S. Ocular surface inflammation is regulated by innate immunity. *Prog Retin Eye Res* 2012; 31:551-75.
- Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58:1131-5.
- van Gelderen BE, Van Der Lelij A, Peek R, et al. Cytokines in aqueous humour and serum before and after corneal transplantation and during rejection. *Ophthalmic Res* 2000; 32:157-64.
- Von Smoluchowski M. Elektrische endosmose und strömungsströme. L. Graetz. In *Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus, vol II*. Barth, Leipzig: 1921. 366-428.
- Wadia PP, and Tambur AR. Yin and yang of cytokine regulation in solid organ graft rejection and tolerance. *Clin Lab Med* 2008; 28:469,79, vii-viii.
- Wang L, Yi T, Kortylewski M, et al. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 2009; 206:1457-64.
- Ward LD, Hammacher A, Howlett GJ, et al. Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6 receptor complex. *J Biol Chem* 1996; 271:20138-44.
- Wilson JA, and Richardson CD. Future promise of siRNA and other nucleic acid based therapeutics for the treatment of chronic HCV. *Infect Disord Drug Targets* 2006; 6:43-56.
- Windsor WT, Syto R, Tsarbopoulos A, et al. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochemistry* 1993; 32:8807-15.
- Xu X, Capito RM, and Spector M. Delivery of plasmid IGF-1 to chondrocytes via cationized gelatin nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84:73-83.
- Xue ML, Zhu H, Thakur A, et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with

- pseudomonas aeruginosa. *Immunol Cell Biol* 2002; 80:340-5.
- Yoshimura A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci* 2006; 97:439-47.
- Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: Recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 2007; 109:3794-802.
- Zhang F, Yao S, Yuan J, et al. Elevated IL-6 receptor expression on CD4+ T cells contributes to the increased Th17 responses in patients with chronic hepatitis B. *Virology* 2011; 8:270,422X-8-270.



ANEXO / ANNEX I

Involvement of corneal epithelial cells in the Th17 response in an *in vitro* bacterial inflammation model

Isabel Arranz-Valsero,^{1,2} Ute Schulze,³ Laura Contreras-Ruiz,^{1,2} Laura García-Posadas,^{1,2} Antonio López-García,^{1,2} Friedrich Paulsen,^{3,4} Yolanda Diebold^{1,2}

- ^{1.} Ocular Surface Group-IOBA, University of Valladolid, Valladolid, Spain
- ^{2.} CIBER-BBN (Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials, and Nanomedicine), Spain
- ^{3.} Department of Anatomy and Cell Biology, Martin Luther University Halle/Wittenberg, Halle/Saale, Germany
- ^{4.} Department of Anatomy II, Friedrich Alexander University Erlangen/Nuremberg, Erlangen, Germany

Molecular Vision 2013; 19:85-99

Involvement of corneal epithelial cells in the Th17 response in an in vitro bacterial inflammation model

Isabel Arranz-Valsero,^{1,2} Ute Schulze,³ Laura Contreras-Ruiz,^{1,2} Laura García-Posadas,^{1,2} Antonio López-García,^{1,2} Friedrich Paulsen,^{3,4} Yolanda Diebold^{1,2}

¹Ocular Surface Group-IOBA, University of Valladolid, Valladolid, Spain; ²CIBER-BBN (Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials, and Nanomedicine), Spain; ³Department of Anatomy and Cell Biology, Martin Luther University Halle/Wittenberg, Halle/Saale, Germany; ⁴Department of Anatomy II, Friedrich Alexander University Erlangen/Nuremberg, Erlangen, Germany

Purpose: *Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA) are frequent causes of bacterial keratitis, an inflammatory process that can lead to vision loss. We used a human corneal epithelial (HCE) cell line to study the Th17 inflammatory pathway, including interleukin (IL-) 6, IL-17, and associated receptors, in response to stimulation by SA and PA culture supernatants.

Methods: Cells of the HCE cell line were exposed to either SA or PA supernatants in dilutions of 1:100 or 1:50, or to human recombinant IL-17A (20 ng/ml). Cell culture supernatants were collected at 6, 24, and 72 h, and protein and RNA were isolated. Expression of cytokine (IL-6, IL-17A), receptor (sIL-6R, IL-17RA), and mediator (soluble glycoprotein [sgp] 130, MIP3 α) proteins and mRNAs were determined with enzyme-linked immunosorbent assay, immunohistochemistry, western blotting, and real-time, reverse-transcription quantitative PCR. In addition, IL-17RA was localized by transmission electron microscopy after immunogold labeling.

Results: Basal secretion of IL-6 and IL-17A by HCE cells occurred in a time-dependent manner. Expression of IL-6 was significantly enhanced by SA stimulation, but not by PA stimulation. IL-6 mRNA expression was higher in the control and SA-stimulated cells at 6 and 24 h, but not at 72 h. In the PA-stimulated cells, mRNA levels were significantly lower than the controls at 6 and 24 h. Expression of sIL-6R was not altered by SA or PA supernatants, but sgp130 expression was greater than controls at 6 h, less than controls at 24 h, and the same as controls at 72 h. HCE cells secreted IL-17A in a time-dependent manner that was not altered by stimulation; however, the IL-17A mRNA levels were lower than those of the controls at 6 h. With immunohistochemistry, IL-17RA was localized in perinuclear vesicles and in the cytosol and membranes of HCE cells. IL-17RA was also present in the epithelial cells from human ocular surface tissues. As quantified with western blotting, expression of IL-17RA was unchanged in HCE cells stimulated by SA or PA supernatants.

Conclusions: HCE cells react to bacterial inflammation by enhancing the secretion of IL-6 and by regulating the pro-inflammatory response with differential secretion of sgp130. Under normal conditions, HCE cells and ocular surface tissues express IL-17RA. Additionally, HCE cells express IL-17RA after bacterial stimulation. All of these molecules are involved in the Th17 differentiation pathway, suggesting that corneal epithelial cells may act as indirect participants in the Th17 signaling pathway.

Staphylococcus aureus (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA) are frequent causes of bacterial keratitis, an inflammatory process that can lead to vision loss. Both pathogens are usually considered extracellular bacteria, growing as biofilms on mucous membranes. However, the pathogens can sometimes invade corneal epithelial cells and cause inflammation [1-3]. In some cases, once the infection is controlled, host defense mechanisms may maintain an activated status and contribute to initiating a chronic inflammatory process. For instance, bacterial lipopolysaccharide can trigger intracellular signaling cascades via the Toll-like receptor 4. This

signal rapidly induces inflammatory cytokine production that initiates various overlapping immune responses [4]. Among the different immune responses, the Th17 pathway is the main pathway activated during infection with extracellular pathogens [5,6]. Cytokines secreted by immune cells or by the infected cells, among other environmental and genetic factors, are the main inducers of Th17 pathway activation [7].

Interleukin (IL)-6 is a multifunctional cytokine involved in a broad variety of ocular inflammatory conditions. For instance, IL-6 has a protective role during corneal infection with PA [8]. IL-6 is also one of the major cytokines responsible for differentiating T helper lymphocytes into Th17 cells [9]. IL-6 signal transduction needs a specific transmembrane receptor (IL-6R) and activation of the transmembrane glycoprotein (gp) 130, leading to their dimerization and hexameric complex formation [10]. Although IL-6R expression is mainly

Correspondence to: Yolanda Diebold, IOBA-University of Valladolid, Edificio IOBA, Campus Miguel Delibes, Paseo de Belén 17, 47011 Valladolid, Spain; Phone: +34-983-18 47 50; FAX: +34-983-18 47 62; email: yol@ioba.med.uva.es

limited to hepatocytes and some leukocytes [11], IL-6 is expressed in cytokine-treated human corneal epithelial and normal human conjunctival cell lines [12]. Nonetheless, the immune system can increase the number of potential IL-6 target cells with the IL-6 trans-signaling pathway: IL-6 binds the soluble form of IL-6R (sIL-6R) [13] and transmits the signal through the transmembrane gp130. The ability of ocular surface cells to produce sIL-6R has been reported [14-16], but involvement in bacterial inflammatory conditions remains unknown.

IL-17 is the hallmark cytokine of the recently described Th17 cells [17]. Six isoforms are known (IL-17A-F), and expression varies depending on cell type, tissue, and disease [18]. Some innate sources of IL-17, such as natural killer and myeloid cells, have been reported [19] and are thought to act before adaptive immunity takes place. IL-17A acts as the main cytokine responsible for initiating innate responses against infection by stimulating the production of cytokines, neutrophil chemoattractants, and antimicrobial peptides. IL-17A-producing cells have been identified in the mid-peripheral cornea in a mouse model of dry eye disease [20]. This cytokine is also expressed in corneas from patients with herpetic stromal keratitis [21]. However, IL-17A production is usually linked to leukocytes, while IL-17C is linked to epithelial cell host defense, acting in an autocrine manner [22]. To the best of our knowledge, IL-17A production by corneal epithelial cells has not been described.

IL-17A signal transduction needs at least two receptors, among the five receptors described (IL-17RA-E), but the highest affinity appears with the binding of IL-17A to IL-17RA [23,24]. IL-17RA is expressed in the majority of human cell membranes [25], e.g., human leukocytes [26,27], human bronchial epithelial cells [28], and human corneal fibroblasts [21], but little is known about IL-17RA within the epithelial cells of the ocular surface. A protective role against bacterial inflammation has been postulated for IL-17 [29]. Among other roles, this cytokine is able to increase MIP3 α , a chemoattractant protein with antimicrobial properties, as demonstrated in airway epithelial cells in vitro [30]. However, IL-17 and other Th17-related molecules may also be responsible for the pathogenesis of disease [17,31], as observed in IL-17-deficient mice, which are susceptible to inflammatory autoimmune diseases in a rodent model of collagen-induced arthritis [32]. Understanding the mechanisms of action of Th17-related cytokines may be of great value to enhance the knowledge of severe or chronic ocular inflammatory diseases caused by bacterial infections. Although animal models of bacterial keratitis have been described [33], an in vitro model can be helpful to better understand the contribution

of corneal epithelial cells to the Th17 response during the infection. The aim of this work was to determine whether corneal epithelial cells secrete cytokines and other effectors of the Th17 pathway in response to molecular stimuli derived from bacteria.

METHODS

Materials: Tissue culture plastics, including multichamber Permanox slides were obtained from Nunc (Roskilde, Denmark). Culture medium and supplements, Alexa Fluor-488 donkey antirabbit secondary antibody (Ab) for immunofluorescence analysis, TRIzol reagent, RNase inhibitor, and SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit were purchased from Invitrogen-Gibco (Inchinnan, Scotland). Donkey serum, Laemmli Sample Buffer, and Tween-20 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Materials for bacterial culture included tryptone soy broth from Oxoid (Basingstoke, England), sheep blood from Heipha (Eppenheim, Germany), and filters from Millipore (Eschborn, Germany). Human recombinant IL-17A was from Prospec (Ness-Ziona, Israel). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for IL-6, IL-17A, and MIP3 α were from RayBiotech (Norcross, GA), and those for soluble glycoprotein (sgp) 130 and sIL-6R were from Diaclone (Besançon, France). The bicinchoninic acid (BCA) protein quantification method was from Pierce (Rockford, IL). Materials used for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting, including analysis software, were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). Low fat milk powder and antibodies for western blotting were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), except donkey antimouse affine pure peroxidase-conjugated immunoglobulin, which came from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Propidium iodide was from Molecular Probes (Eugene, OR). Reagent for silver enhancement R-Gent SE-EM was from Aurion (Wageningen, Netherlands), and Epon resin Glycidether 100 from Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Germany). VECTASHIELD medium and VECTASTAIN ABC kits were from Vector Laboratories (Burlingame, CA). Reagents for immunohistochemistry were from Dako (Glostrup, Denmark). RNase-free DNase I was from Boehringer (Mannheim, Germany). Validated primers PPH00537B and PPH00983A were from SABiosciences (Frederick, MD), and 2X SYBR Green Real-time PCR Master Mix was from Qiagen (Hilden, Germany).

Human corneal epithelial cell line: A human corneal epithelial (HCE) cell line [34] was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 + GlutaMAX-I supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were maintained at

37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, and the culture medium was changed every other day. Daily observations were done with phase contrast microscopy.

Production of bacterial supernatants: Bacterial supernatants from SA strain SA113 (ATCC 35,556) and PA strain PA01 (ATCC 15,692) were obtained as previously described by Paulsen et al. [35]. Briefly, laboratory strains of the respective bacteria were grown overnight at 37 °C by shaking in tryptone soy broth. Thereafter, tenfold bacterial dilutions were plated on Columbia agar supplemented with 10% sheep blood overnight at 37 °C. Bacteria at 5×10⁷ cfu/ml were centrifuged twice at 2,000 ×g for 30 min, and the supernatants filtered twice using filters impermeable to bacteria (0.22 μm pore size). The sterility of the supernatant aliquots was tested with overnight incubation on agar.

Stimulation of human corneal epithelial cells with bacterial supernatants or interleukin-17A: A total of 3×10⁵ HCE cells/dish were seeded in individual 8.8 cm² area Petri dishes and cultured for 72 h. The cells were then maintained for 24 h in non-supplemented culture medium. After that, the cells were exposed to either SA or PA supernatants (1:100 and 1:50 dilution), or to IL-17A (20 ng/ml in serum-free DMEM). Cell culture supernatants were collected at 6, 24, and 72 h and used for ELISA. The concentration of the secreted cytokines (IL-6, IL-17A), soluble receptor (sIL-6R), and mediators (sgp130, MIP3α) in cell supernatants was measured according to the manufacturer's instructions. Cell lysates were used for protein determination by SDS-PAGE and western blotting or for mRNA determination with real-time, reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (qPCR). All samples were run in duplicate, in three independent experiments.

Cytotoxicity assay: Cytotoxicity of bacterial supernatants was measured with the tetrazolium salt, 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)-based, colorimetric assay. Stimulation of HCE cells with bacterial supernatants was performed for 6, 24, and 72 h as described above. After stimulation, 100 μl of the XTT working solution (20% of XTT stock solution [1 mg/ml] in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) without phenol red culture medium) was added to each well. Cells were incubated at 37 °C for 16 h, and then the optical density was measured using a microplate multireader at 450 nm (reference wavelength: 620 nm). Three different experiments were performed for each condition. Cell viability was calculated as a percentage of viable cells in the treated group versus an untreated control by employing the following equation:

$$\text{cell viability (\%)} = \text{OD}_{\text{treatment}} / \text{OD}_{\text{control}} \times 100$$

RNA preparation and cDNA synthesis: Cell lysates were prepared from HCE cells using TRIzol reagent, and RNA was isolated using chloroform. Crude RNA was purified with isopropanol and repeated ethanol precipitation. Contaminating DNA was destroyed by digestion with RNase-free DNase I and RNase inhibitor (30 min at 37 °C). Inactivation of the enzyme was done by heating at 65 °C for 10 min. A total of 2 μg of purified RNA was used for each reaction of reverse transcription with the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit.

Quantification of interleukin-6, interleukin-17A, and interleukin-17RA mRNA expression levels with quantitative polymerase chain reaction: The IL-6, IL-17A, and IL-17RA mRNA levels were quantified with qPCR. Primer pair oligonucleotides were designed for IL-6 mRNA and for 18S rRNA that was used as a reference gene. Validated primers were bought for IL-17A and IL-17RA. Primer sequences or references and the amplification procedure for each primer pair are shown in Table 1. The PCR reaction was performed in a volume of 20 μl using 10 μl of 2X SYBR Green Real-time PCR Master Mix, 0.4 μg of synthesized cDNA, and the specific primer pair at 5 nM, in an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Foster City, CA). The fluorescence signal was digitally collected after each cycle of 72 °C. Relative quantification of the signals was done by normalizing the signal of the cytokines with the 18S rRNA signal. The semi-quantitative comparative ΔΔCt method was used to analyze the relative gene expression of each sample. Controls included no-template controls and no-reverse-transcription controls. In addition, after each PCR, samples were subjected to a temperature ramp with continuous fluorescence monitoring for melting curve analysis to verify that the fluorescence signal was due to the amplification of a single fragment.

Interleukin-17RA detection in human ocular surface tissues with immunohistochemistry: For immunohistochemistry analysis, human tissue samples were obtained from bodies donated by testament to the Department of Anatomy and Cell Biology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Germany, for research or teaching purposes, in accordance with German and European Union laws. In addition, the study had the approval of the institutional review boards of the University of Valladolid and the University of Halle-Wittenberg. Samples of human cornea (n=6), limbus (n=4), and conjunctiva (n=6) were fixed in 4% formalin, embedded in paraffin, sectioned (7 μm), and deparaffinized. HCE cells (either exposed to IL-17A or unexposed) were seeded as in the immunofluorescence assays and used as controls. Samples were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde for 7 min. They were then incubated for 10 min with

TABLE 1. GENE PRIMER PAIRS AND AMPLIFICATION PROCEDURES.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Amplification procedure			Length (bp)
		Cycles	T (°C)	Time (s)	
IL-6	F: GACAGCCACTCACCTCTTCA R: CATCCATCTTTTTTCAGCCATC	1	94	180	171
		36	94	20	
			59.1	30	
			72	30	
IL-17A	Reference: PPH00537B Unknown sequence	1	50	120	Unknown
		1	95	600	
		40	95	15	
			60	60	
IL-17RA	Reference: PPH00983A Unknown sequence	1	50	120	Unknown
		1	95	600	
		40	95	15	
			60	60	
18S	F: ACTCAACAGGGGAAACCTCAGC R: CGCTCCACCAACTAAGAACGG	1	50	120	250
		1	94	180	
		40	94	20	
			59	33	
			72	40	

Enzyme Block blocking solution and 1 h with goat serum. Then, non-specific binding was inhibited with 5% goat serum in Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TBS-T). Primary polyclonal rabbit antihuman IL-17RA Ab was used at 1:100 dilution in blocking solution, overnight at 4 °C. The biotinylated goat antimouse secondary Ab was added at 1:100 in blocking solution and incubated at room temperature (RT) for 30 min. Samples were incubated with the mix of the VECTASTAIN ABC kit for 30 min and then with 2% diaminobenzidine for 5 min. Nuclei were stained by quickly dipping the slides in hematoxylin.

Interleukin-17RA detection in human corneal epithelial cells with electrophoresis and western blotting: HCE cells were homogenized in 1% Triton X-100 in PBS (KCl: 200 mg/l; KH₂PO₄: 200 mg/l; NaCl: 8,000 mg/l; Na₂HPO₄·7H₂O 2160 mg/l). After homogenization, the samples were incubated for 30 min on ice and then centrifuged at 15,000 ×g for 30 min at 4 °C. Total cell protein in the resulting supernatant was measured with the BCA method, which was compatible with the buffer used for homogenization. Bovine serum albumin (BSA) was used as the standard.

Protein in cell lysates were mixed 1:1 with Laemmli Sample Buffer and boiled for 5 min. Equal amounts of proteins (10 µg/lane) were resolved with SDS-PAGE on 8% acrylamide gels (15 min at 70 V and 1 h 30 min at 110 V). Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes

(1.5 h at 350 mA). Nonspecific binding was blocked in TBS-T and supplemented with 4% donkey serum and 5% non-fat milk (blocking buffer) for 1 h at RT. Membranes were then incubated with primary Abs diluted in blocking buffer, washed three times with TBS-T, and incubated with corresponding secondary Abs diluted in TBS-T (Table 2). Membranes were incubated with Immun-Star Horseradish Peroxidase Buffer and Immun-Star Horseradish Peroxidase Luminol/Enhancer (Bio-Rad), according to the manufacturer's protocol. Immunoreactive bands were visualized with the chemiluminescence method (ChemiDoc XRS; Bio-Rad, Hercules, CA), and images were analyzed using the Quantity One software. Proteins in the cell lysates of the leukemia chronic myelogenous K562 cell line were used as controls to assess the specificity of the anti-IL-17RA Ab.

Interleukin-17RA detection in human corneal epithelial cells with immunofluorescence: HCE cells were seeded on eight-well multichamber Permax slides (3×10⁴ cells/well), cultured for 72 h, and exposed to SA and PA supernatants up to 72 h. At the end of each experiment, cells were fixed for 7 min in cold methanol. Nonspecific binding was inhibited with 4% donkey serum in PBS (blocking solution). Slides were incubated with primary Ab diluted in blocking solution, washed three times, and incubated with secondary Ab in PBS (Table 2). Nuclei were stained with propidium iodide 1:10,000 in PBS. Slides were mounted in VECTASHIELD

TABLE 2. ANTIBODIES (AB) AND CONDITIONS FOR IMMUNODETECTION OF INDICATED MOLECULES.

Antibodies		Reference	Dilution	Time of incubation	Temperature (°C)
IL-17RA					
1 st Ab	Rabbit anti-human	sc-30175	WB 1:200 IMF 1:50	Overnight	4
2 nd Ab	Goat anti-rabbit	sc-2004	WB 1:2000	1 h	RT
	Donkey anti-rabbit	A-21206	IMF 1:100		
α-Actinin					
1 st Ab	Mouse anti-human	sc-17829	1:500	Overnight	4
2 nd Ab	Donkey anti-mouse	715-035-150	1:5000	1 h	RT

medium, and the preparations were viewed in an epifluorescence microscope (Leica Microsystems DMI 6000B, Wetzlar, Germany). Negative controls included the omission of primary Ab. All samples were run in duplicate, in three independent experiments.

Interleukin-17RA detection in human corneal epithelial cells with transmission electron microscopy after immunogold labeling: Cultured HCE cells were grown on plastic coverslips, exposed to recombinant IL-17A (20 ng/ml), and fixed after confluence in 4% (vol/vol) paraformaldehyde in PBS for 2 h at 4 °C. Control cells were not exposed to the recombinant IL-17A. The fixed cell culture samples were then immersed in 4% (wt/vol) sucrose in PBS for at least 24 h and were subsequently frozen in liquid nitrogen. For preembedding immunocytochemistry, the coverslips were blocked in low-fat milk powder for 30 min at RT. The anti-IL-17RA antibody was applied in PBS/0.2% (wt/vol) BSA and incubated overnight at 4 °C. After six rinses with PBS/0.2% (wt/vol) BSA, the coverslips were incubated overnight at 4 °C with ultrasmall gold-conjugated antimouse F(ab')₂ in PBS/0.2% (wt/vol) BSA. The coverslips were then rinsed five times with PBS/0.2% (wt/vol) BSA and two times with PBS and then fixed with 2.5% (vol/vol) glutaraldehyde in PBS for 2 h at 4 °C. Silver enhancement was then performed for 1.5 h in darkness. Coverslips were postfixated with 0.5% (wt/vol) OsO₄ in PBS for 15 min and embedded in Epon resin. Ultrathin sections of the coverslips were cut and examined with electron microscopy (EM 902; Zeiss, Oberkochen, Germany). Apart from the omission of the primary antibody, control sections were treated the same way. No control section showed labeling with gold particles.

Statistical analysis: Data were calculated as means \pm standard error of the mean. Statistical significance between different conditions was assessed with the Student *t* test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Interleukin-6, soluble form of interleukin-6R, and soluble glycoprotein 130 expression in human corneal epithelial cells exposed to either Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa supernatants: Potential inflammatory responses were evaluated in SA- and PA-stimulated HCE cells by analyzing changes in the expression of IL-6 and the principal molecules in the signaling pathway, such as sIL-6R and sgp130. Control unstimulated HCE cells secreted IL-6, sIL-6R, and sgp130 in a time-dependent manner (Figure 1). In cells exposed to SA supernatants, the IL-6 levels were significantly increased for both dilutions when compared to control cells at every time of study, reaching 21-, 7-, and fourfold increases for the 1:50 dilution at 6, 24, and 72 h, respectively ($p < 0.0005$, $p < 0.005$, and $p < 0.0005$). There were no differences in IL-6 secretion between PA-stimulated and control unstimulated cells at any time of study. IL-6 mRNA expression in control cells unexposed to bacterial supernatants remained constant at 6 and 24 h, and decreased at 72 h ($p < 0.0005$, Figure 1). In SA-stimulated cells, IL-6 mRNA expression tended to increase at earlier times and then drop to the control mRNA levels at 72 h of stimulation. However, in PA-stimulated cells, IL-6 mRNA expression was significantly decreased at 6 and 24 h, but by 72 h, the expression was similar to the control levels. There were no differences in sIL-6R levels between the control and stimulated cells, in any condition. However, sgp130 levels in response to both dilutions of SA and PA were significantly increased relative to the control cells at 6 h, were significantly decreased at 24 h, and were not different from the control cells at 72 h.

To determine if the changes in cytokine expression were due to a toxic effect of soluble pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), we measured the viability of the HCE cells exposed to bacterial supernatants. The XTT-toxicity assay showed that the viability of cells exposed to both bacterial

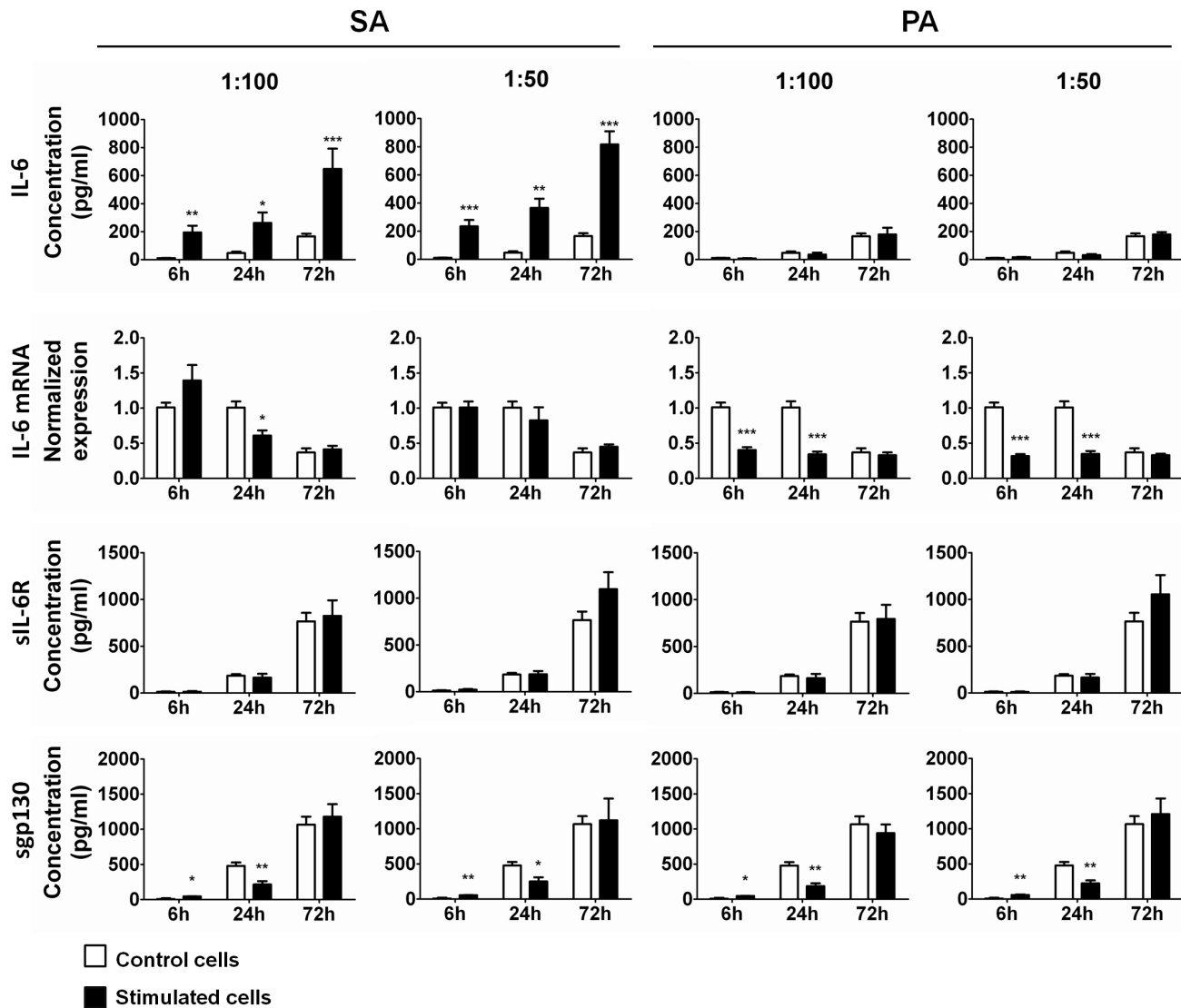


Figure 1. Interleukin 6, interleukin 6 Receptor, and soluble glycoprotein 130 secretion by HCE cells exposed to *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* supernatants. Supernatants and mRNA from *Staphylococcus aureus* (SA)- and *Pseudomonas aeruginosa* (PA)-stimulated HCE cells (solid bars) and from control unstimulated cells (open bars) were collected at different time points. Bars represent the mean value of duplicates from three independent experiments. Values are expressed as mean±SEM, and statistical significance, when compared to control unstimulated cells, is indicated with asterisks (*p<0.05; **p<0.005; ***p<0.0005). Interleukin (IL-) 6, soluble IL-6 Receptor (sIL-6R), and soluble glycoprotein (sgp)130 were each secreted in a time-dependent manner. IL-6 secretion increased significantly in SA-stimulated cells but not in PA-stimulated cells. IL-6 mRNA expression was higher in control and SA-stimulated cells at 6 h and 24 h, but not at 72 h. In PA-stimulated cells, IL-6 mRNA levels were significantly lower than those of the controls at 6 h and 24 h. sIL-6R secretion did not change significantly under any condition; however, sgp130 secretion increased significantly in each condition at 6 h of stimulation and then significantly decreased at 24 h. By 72 h, there were no significant differences between the control and stimulated cells.

supernatants at both dilutions was higher than 90% at any time of study (data not shown).

Interleukin-17RA expression in human ocular tissues: To our knowledge, IL-17RA has not been identified in epithelial cells from human ocular surface tissues, so we used immunohistochemistry to describe the distribution of IL-17RA in sections from cadaveric donors (Figure 2). The corneal epithelium had

a granular perinuclear cytoplasmic reactivity in all epithelial layers, but it was more obvious in the superficial cell layer. At the limbus, the superficial epithelial cells also reacted strongly with the antibody. Deeper epithelial layers demonstrated reactivity only weakly at the cell surfaces. The basal cell layer showed no reactivity. The cytoplasm of conjunctival

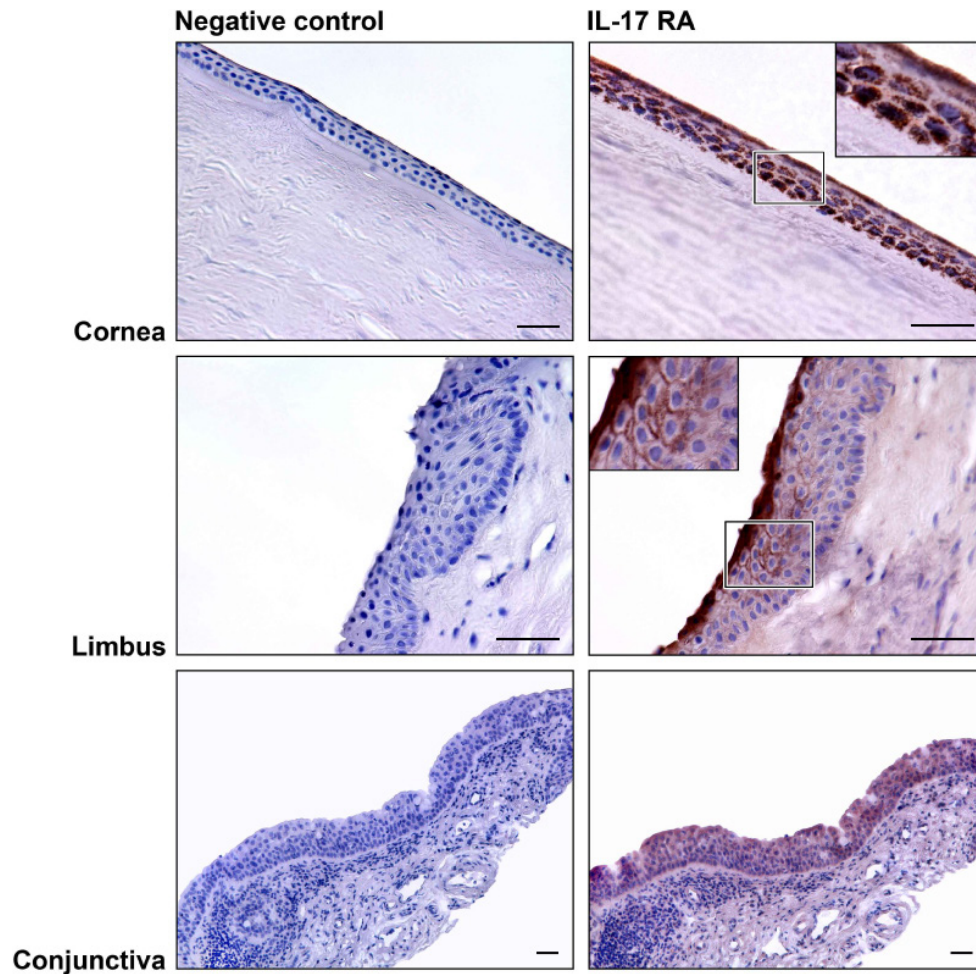


Figure 2. Interleukin 17 Receptor A expression in human ocular surface tissues. Ocular surface tissues (cornea, limbus, and conjunctiva) expressed histochemically detectable Interleukin 17 Receptor A (IL-17RA) as seen in these representative micrographs. The superficial layers were the most intensely stained, and the deeper cells had different patterns depending on the location: dotted staining in the cornea, staining in the cell-to-cell-contact regions in the limbus, and homogeneous staining in the conjunctiva. Insets show higher magnification of staining distribution. Bar=40 μ m.

epithelial cells, but not goblet cells, was also positive for IL-17RA.

Interleukin-17A and interleukin-17RA expression in human corneal epithelial cells exposed to either Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa supernatants: We determined whether HCE cells were involved in the Th17 response when stimulated with SA and PA supernatants by measuring IL-17A and IL-17RA protein and mRNA expression. Control unstimulated HCE cells secreted IL-17A to the culture medium in a time-dependent manner (Figure 3A). There were no differences in IL-17A secretion between the SA-stimulated and the control unstimulated cells at any time of study. In the cells exposed to the PA supernatants, there was a significant decrease in secreted IL-17A levels for both dilutions when compared to the control cells at 72 h ($p < 0.05$). IL-17A mRNA expression in control cells unexposed to bacterial supernatants remained constant over time. Exposure to bacterial supernatants tended to decrease IL-17A mRNA expression; however, this was significant only at 6 h ($p < 0.05$).

Western blot analyses were performed to quantify IL-17RA expression. An 85 kDa immunoreactive band was found in the control K562 cell lysates, unstimulated HCE cells, and bacterial supernatant-stimulated HCE cells (Figure 3B). IL-17RA expression in control cells was unchanged over time, and there were no differences between the control and stimulating conditions at any time of study. Moreover, there were no significant variations in IL-17RA mRNA expression in all control and stimulating conditions (Figure 3A).

IL-17RA was also identified in control HCE cells with immunofluorescence microscopy (Figure 4). HCE cells expressed IL-17RA throughout the culture period, showing vesicular reactivity close to the nucleus and a homogeneous reactivity in the cytosol and at the cell surfaces. At longer times of study, the reaction intensity seemed to slightly decrease. Fluorescence signal was also present in SA- and PA-stimulated cells, regardless of the stimulation dilution or time. Stimulation with bacterial supernatants did not modify the pattern or the signal intensity in any case, although

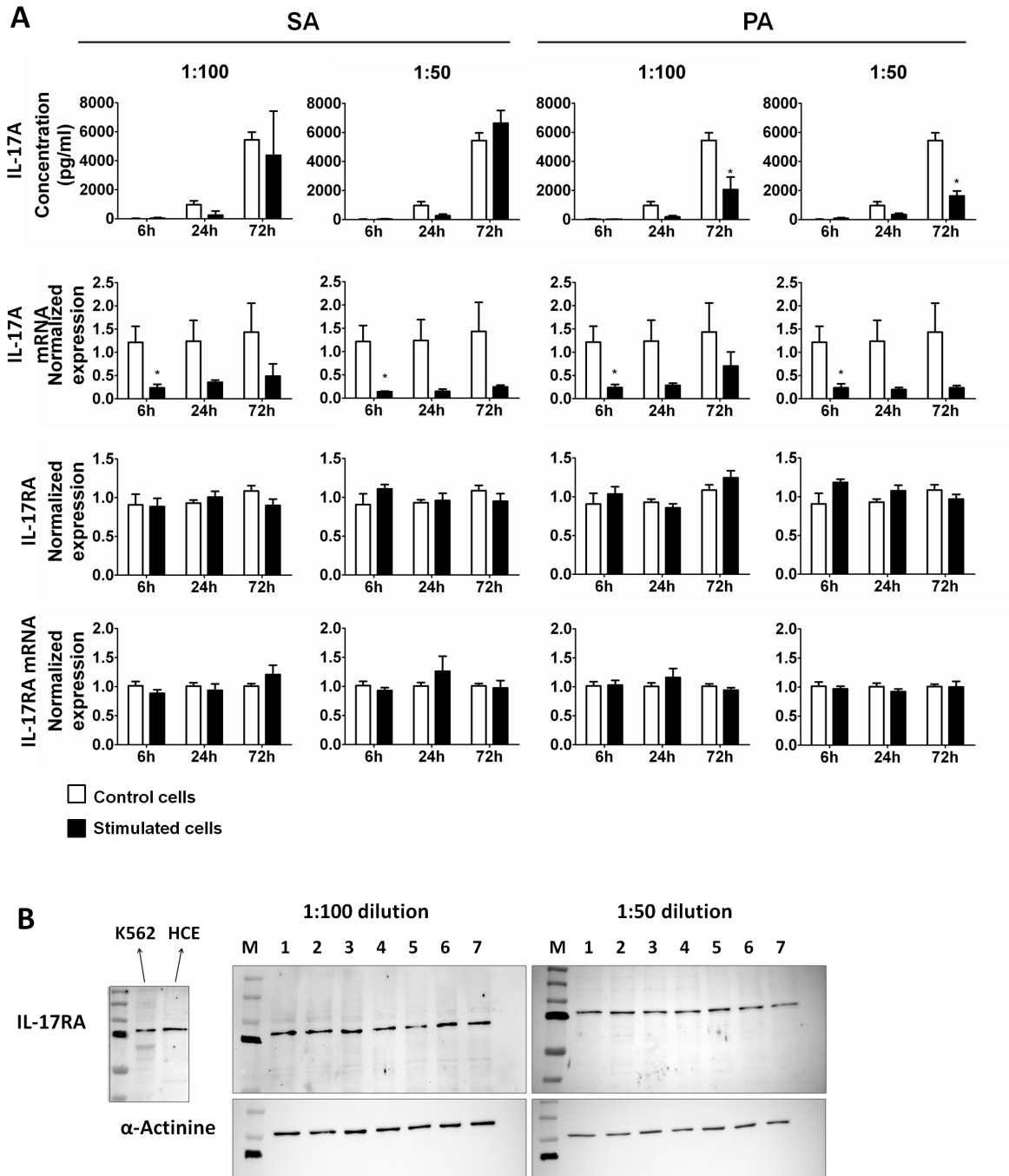


Figure 3. Interleukin 17A and Interleukin 17 Receptor A expression by HCE cells exposed to *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* supernatants. **A**: Supernatants, protein, and mRNA from *Staphylococcus aureus* (SA)- and *Pseudomonas aeruginosa* (PA)-stimulated HCE cells (solid bars) and from control unstimulated cells (open bars) were collected at different time points. Bars represent the mean value of duplicates from three independent experiments. Values are expressed as mean±SEM, and statistical significance, when compared to control unstimulated cells, is indicated with asterisks (*p<0.05). Interleukin (IL-) 17A was secreted in a time-dependent manner that was not altered under any condition. IL-17A mRNA expression remained constant in the control unstimulated cells. In stimulated cells, it was significantly decreased at 6 h and tended to be lower at 24 h and 72 h than in the control cells. IL-17 Receptor A (IL-17RA) protein and mRNA expression did not change significantly with time. **B**: Internal control for specific band determination: K562 and HCE protein lysates, and representative western blot images for each condition: M- Molecular weight markers; 1- SA, 6 h; 2- PA, 6 h; 3- SA, 24 h; 4- PA, 24 h; 5- SA, 72 h; 6- PA, 72 h; 7- C, 72 h.

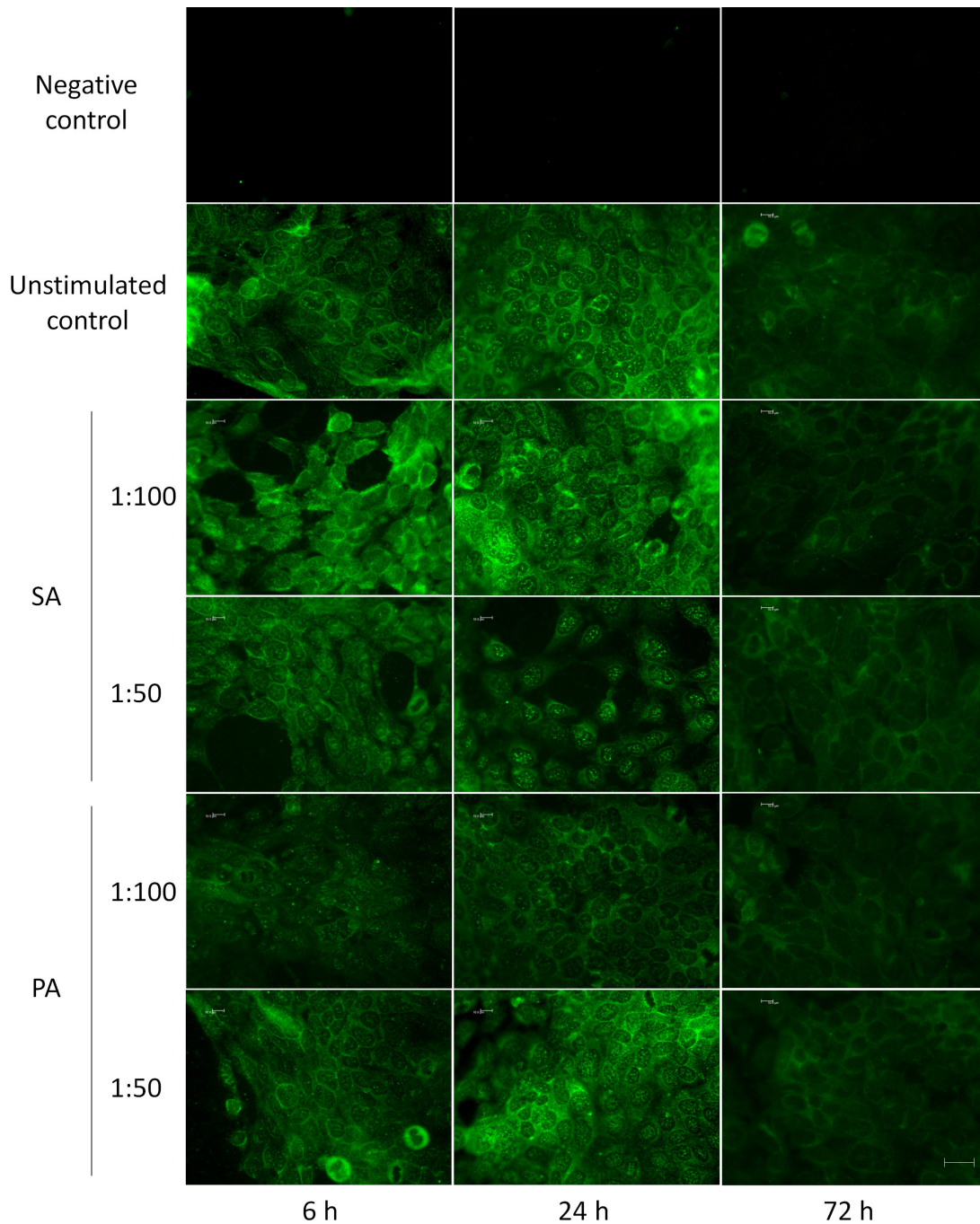


Figure 4. Interleukin 17 Receptor A immunofluorescence in HCE cells exposed to *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* supernatants. Interleukin 17 Receptor A (IL-17RA) expression was analyzed with immunocytochemistry in fixed HCE cells exposed to *Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA) supernatants at different dilutions and time points. Experiments were performed three times, and a representative image of each condition is shown. Bar=25 μ m. Control unstimulated cells expressed IL-17RA in the cytosol, plasma membrane, and close to the nucleus. Stimulated cells also expressed IL-17RA.

fluorescence slightly decreased over time, particularly in the areas close to the nucleus.

Interleukin-17RA expression in human corneal epithelial cells exposed to interleukin-17A: Possible changes in

IL-17RA were evaluated in HCE cells exposed to IL-17A. IL-17RA was visualized with immunocytochemistry and immunogold-labeling electron microscopy in unexposed and exposed cultured HCE cells (Figure 5A, B). After exposure

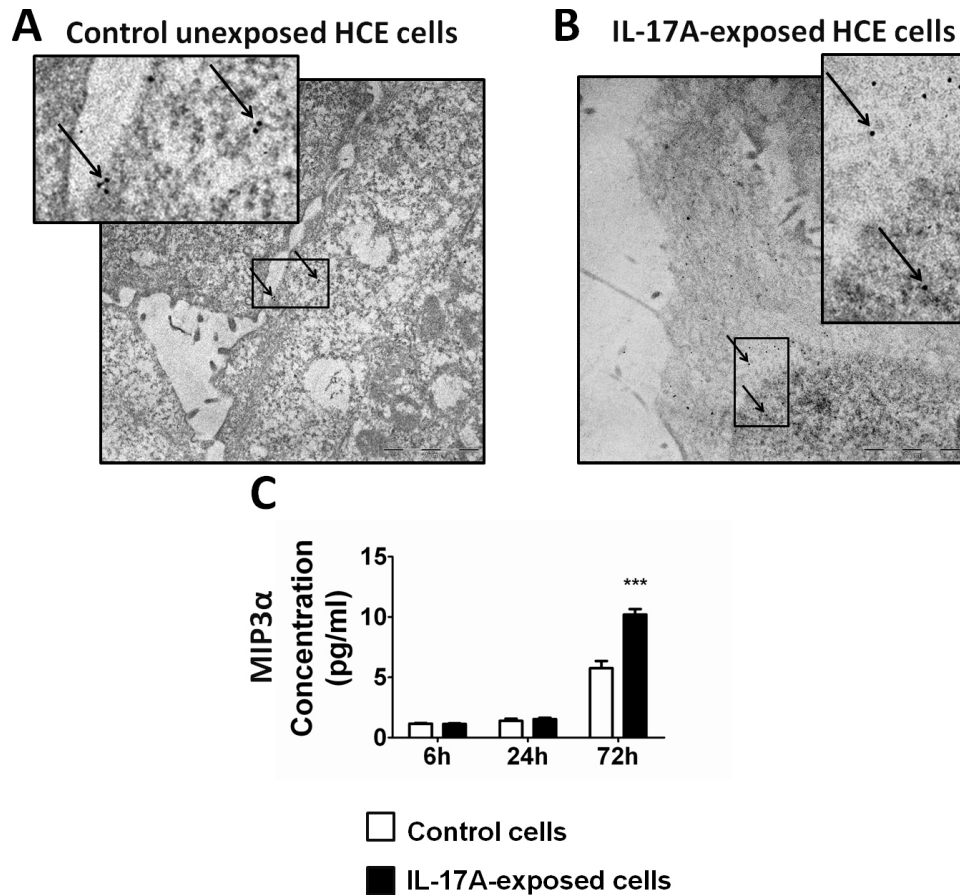


Figure 5. Interleukin 17 Receptor A expression and MIP3 α secretion by HCE cells stimulated by interleukin 17 A. **A, B:** Interleukin 17 Receptor A (IL-17RA) expression was analyzed with immunogold labeling and electron microscopy in HCE cells either untreated or exposed to interleukin (IL-)17A, respectively. Control unexposed cells expressed IL-17RA in the cytosol. In IL-17A-exposed cells, immunogold labeled IL-17RA was present in the nucleus in addition to the cytosol. Bar=2 μ m. Insets show higher magnification of gold-labeled antibody. **C:** After 72 h, there was a significant increase in MIP3 α in supernatants from cells exposed to IL-17A (solid bars) compared to unexposed controls (open bars), indicating an active receptor for IL-17A. Bars represent the mean value of duplicates from three independent experiments. Values are expressed as mean \pm SEM, and statistical significance is indicated with an asterisk ($p<0.05$).

to recombinant IL-17A, more gold particles were visible than without exposure.

Western blot analyses were performed to quantify IL-17RA expression. An 85 kDa immunoreactive band was present in control and IL-17A-exposed cells. IL-17RA expression in IL-17A-exposed cells tended to slightly increase over time, but the differences were not statistically significant (data not shown). Additionally, IL-17RA mRNA expression did not vary significantly among all control and exposure conditions (data not shown).

To determine whether IL-17RA was a functional receptor, we measured the MIP3 α levels in the cell culture supernatants from the control unexposed and the IL-17A-exposed HCE cells (Figure 5C). HCE cells secreted MIP3 α in a time-dependent manner, and the expression was significantly enhanced by IL-17A exposure after 72 h ($p<0.0005$).

DISCUSSION

During infectious inflammatory processes, the immune system determines the T cell response (Th1, Th2, or Th17) depending on a broad variety of genetic and environmental

factors. These factors include the type of cytokines secreted by the infected cells or specific immune cells at the place of infection. The Th17 pathway is commonly activated during infection with extracellular bacteria through cytokines, including IL-6, involved in differentiating naïve T cells into Th17 cells [36]. Tekstra et al. have reported that vascular endothelial cells can initiate and support an inflammatory response after infection by pathogenic microorganisms [37], but the ability of epithelial cells to achieve the same response has not completely been elucidated thus far. In our work, HCE cells under basal conditions secreted IL-6 into the culture medium in a time-dependent manner. Moreover, SA supernatant, but not PA supernatant, induced a significant increase in IL-6 secretion. This in vitro model of corneal bacterial infection demonstrates how HCE cells are able to react against SA-derived harmful products (PAMPs) by increasing IL-6 production. The increase in proinflammatory cytokines after PAMP stimulation could come from potential toxicity; however, the viability levels of the HCE cells exposed to bacterial supernatants remained close to that of the control cells, as determined with the XTT-based toxicity assay. It is possible that bacterial PAMPs lead to a

nearly immediate increase of IL-6 secretion through mRNA stabilization, a characteristic mechanism of short-lived cytokines, as explained by Liton et al. [38]. At earlier stimulation time points, even before 6 h, IL-6 mRNA was rapidly translated into protein, contributing to the high increase in IL-6 secretion observed in SA-stimulated cells. In addition, Lutter et al. reported that bacterial agents restrict eukaryotic protein synthesis [39]. For IL-6, this leads to the inhibition of mRNA degradation. Thus, although there was no increase in mRNA production, we found an increase in IL-6 protein expression provoked by restricted mRNA degradation. Later, after 72 h, IL-6 mRNA levels dropped to the control levels while the secreted IL-6 progressively increased over time. Decreasing levels of IL-6 mRNA could indicate a transient effect of the *in vitro* stimulation with bacterial PAMPs. However, while PA-stimulation did not show any effect in secreted IL-6 expression, we observed a significant decrease in IL-6 mRNA expression at 6 h and 24 h. This could indicate regulation by the HCE cells, inhibiting IL-6 secretion, avoiding in this way a proinflammatory milieu when IL-6 is not actually needed. In our work, we used a PA strain that is perhaps not pathogenic or not pathogenic to HCE cells, and further studies are needed to determine whether other PA strains, including ocular pathogenic strains, produce a different response.

Desiccating stress, another common cause of ocular surface inflammation, increases IL-6 and IL-17A expression [20]. IL-17A is also expressed in corneas from patients with herpetic stromal keratitis [21]. However, our results show that the production of IL-17A, the hallmark protein of the Th17 pathway, is not increased after stimulation with the bacterial supernatants in HCE cultures. Furthermore, we observed a decrease in IL-17A mRNA levels at 6 h exposure. This leads us to think that corneal epithelial cells may not be the main sources of IL-17 during infectious inflammation, but that they are able to downregulate IL-17A mRNA production. Nevertheless, they can be considered active producers of IL-6. In the inflamed eye, IL-6 promotes the differentiation of the lymphocytes attracted to the Th17 cells [9]. The presence of these cells in the affected area would explain an increase in IL-17A amounts at the ocular surface. Moreover, potential innate immune cells present at the site of infection may respond to bacterial products by producing IL-17A. In turn, this could act via IL-17R on epithelial cells, resulting in secretion of chemotactic factors such as MIP-3 α that may recruit more leukocytes to the site of infection. This demonstrates a protective role of IL-17A when expressed in response to bacterial infection, a role that is different from the pathogenic role when expressed by Th17 cells in autoimmune or chronic inflammatory diseases [17].

For understanding and treatment of inflammatory diseases, components of the signaling pathway are sometimes as crucial as the ligands themselves. Therefore, we also studied soluble IL-6R and gp130, both important to the IL-6 signaling pathway. Although IL-6 expression was increased in the presence of bacterial supernatants, sIL-6R secretion by the HCE cells was not significantly increased at any of the studied stimulation times. There was a tendency to increase sIL-6R secretion in 1:50 dilution-stimulated cells as compared to the control. Taking into account that IL-6R expression is mainly limited to hepatocytes and some leukocytes, our results may point out that other cell types at the ocular surface are responsible for the secretion of the soluble form of the receptor to assure the propagation of IL-6 signals into the infected corneal epithelial cells, at least at earlier time points of infection. However, expression of sgp130 increased significantly at the earliest time point and then decreased at the next time point. At later times, there were no detectable differences between the control and treated cells. The soluble receptor sgp130 acts as an antagonist by inhibiting the binding of the preassembled IL-6-sIL-6R to the transmembrane gp130, thus effectively restraining IL-6 signaling (Figure 6) [40]. This may reflect changes in response to increased IL-6 secretion. Thus, the initial protective response to neutralize potential inflammatory effects of IL-6 would be later overcome by the reduced sgp130 levels. This could result in a more proinflammatory outcome in response to bacterial products. Therefore, based on our results, we assume that the same HCE cells that are producing high amounts of the proinflammatory cytokine IL-6 are also autoregulating its production by secreting a potential inhibitor, the sgp130 receptor.

Mouse corneal fibroblasts express IL-17RA [41], and IL-17RA mRNA has been found in human corneal fibroblasts [21]. Until now, IL-17RA protein expression has not been identified in cells of the human ocular surface, but we found IL-17RA protein expressed in human corneal, limbus, and conjunctival epithelial cells. A different pattern of reactivity with the antibody was present depending on the cell type and its location. Considering the distribution of the reaction, corneal and limbal sections presented intense reactivity in the most apical epithelial cell layer. However, expression of IL-17RA in the conjunctival epithelium was present as weaker and more homogeneous reactivity in every cell layer, even in stromal cells. The superficial cells of the ocular surface are usually the most exposed to pathogens, and this could explain the abundant presence of cytokine receptors in the most superficial epithelial cell layers of corneal and limbal cells, but not in the conjunctiva, which is not directly involved in vision.

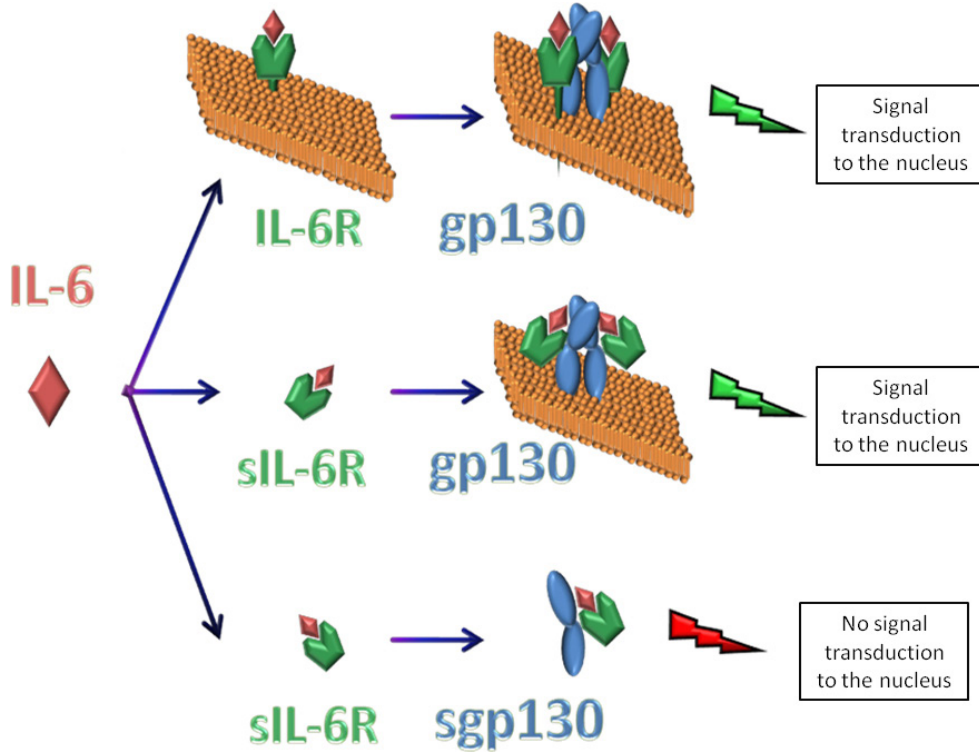


Figure 6. Possible interactions between interleukin 6 and its receptor complex, and regulation by soluble glycoprotein 130. Interleukin 6 Receptor can be present as both a transmembrane (IL-6R) and a soluble protein (sIL-6R). Glycoprotein (gp) 130 can be present linked to cell membranes and as a soluble fragment (sgp130). Interleukin (IL-) 6 can bind either IL-6R or sIL-6R, and both receptors are able to initiate the IL-6 signaling cascade by interacting as a homodimer with two copies of transmembrane gp130. However, sgp130 acts as an antagonist by binding sIL-6R/IL-6, inhibiting their interaction with transmembrane gp130, and blocking the IL-6 signaling pathway.

We also found differences among the three different regions regarding the pattern of the reaction within the cells. IL-17RA expression was present as perinuclear vesicular reactivity and in the cytosol of corneal epithelial cells, which is in agreement with our *in vitro* results of immunofluorescence. Limbal cells were stained only at the cell-cell contact regions, and conjunctival epithelial cells presented homogeneous reactivity. We can presume that limbal cells are in an active region in terms of IL-17A signaling, which would explain the reactivity on cell membranes, and paracrine signaling in the IL-17 cascade. The presence of the receptor in granules within the cytosol of corneal epithelial cells suggests that IL-17RA is present as a precursor awaiting the appropriate signal that triggers IL-17RA processing.

N-glycosylation of IL-17RA has been reported in T cells [42] as a mechanism of receptor maturation. A glycosylated 110 kDa protein is described in patients with oral inflammation [43]. In our work, IL-17RA was found as an 85 kDa protein, which is lower than the predicted molecular weight based on amino acid sequence analysis (96 kDa; UniProt Knowledgebase). We first thought that this could correspond to an immature form of the receptor and that the stimulation with bacterial supernatants did not lead to the receptor's maturation. Thus, we determined whether IL-17RA maturation could occur in the presence of higher amounts of the

main ligand IL-17A. The stimulation of HCE cell cultures with IL-17A did not lead to a higher molecular weight protein as determined with SDS-PAGE and western blotting. However, our MIP3 α secretion results in IL-17A-stimulated HCE cells indicate that the IL-17RA was functional, as it was able to transduce a signal, leading to an increase in MIP3 α expression [30].

IL-17RA is needed for the signal transmission of IL-17, the main effector cytokine of the Th17 pathway, which is the usual response for extracellular pathogens. IL-17RA-deficient mice are vulnerable to infections caused by extracellular pathogens [17], though no data concerning the cornea are available. Although SA and PA are extracellular pathogens, in our work, corneal epithelial cells were not stimulated to express higher levels of IL-17RA protein or mRNA by bacterial PAMPs. This is probably because corneal epithelial cells produce a constant amount of mRNA for IL-17RA, keeping a stable level, in case the receptor is needed for translation into protein after a challenge. Additionally, one must take into account that we used only PAMPs, not real bacteria. Thus, an *in vivo* approach is needed to have a full understanding of what occurs during infection.

In conclusion, corneal epithelial cells of the HCE cell line are not innate sources of IL-17 during exposure to bacterial supernatants *in vitro*. However, these cells may act as indirect

participants in the Th17 pathway by secreting IL-6, controlling its signal propagation with the secretion of sgp130, and expressing IL-17RA, the main receptor of the IL-17A propagation signal. Further studies in human primary epithelial cells are warranted to clarify the regulation of this signaling pathway.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors would like to thank Hong Nguyen, Gertrud Link, and Marco Gösswein for technical help in immunohistochemistry, electron microscope experiments, and image improvement, respectively. Authors also acknowledge the assistance of Britt Bromberg, PhD, ELS, of Xenofile Editing (<http://www.xenofileediting.com>) for the final editing of the manuscript. This work was supported by FEDER-CICYT MAT2010–20452-C03–01, Regional Grant VA132A11–2, and Bilateral Research Grant Spain/Germany DE2009–0085 and DAAD ID6234017 as well as in part by DFG grant PA 738/9–2. Isabel Arranz-Valsero was supported by Regional JCyL Scholarship/European Social Fund Program and other authors by FPU and FPI Scholarship Programs (Ministry of Science and Innovation, and Ministry of Education, Spain). None of the authors have commercial interest in the results of this manuscript. This work has been partially presented at the Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, FL, USA, 2012).

REFERENCES

- Edwards AM, Potts JR, Josefsson E, Massey RC. Staphylococcus aureus host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1000964-[\[PMID: 20585570\]](#).
- Fleiszig SM, Zaidi TS, Fletcher EL, Preston MJ, Pier GB. Pseudomonas aeruginosa invades corneal epithelial cells during experimental infection. *Infect Immun* 1994; 62:3485-93. [\[PMID: 8039920\]](#).
- Fleiszig SM, Zaidi TS, Pier GB. Pseudomonas aeruginosa invasion of and multiplication within corneal epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 1995; 63:4072-7. [\[PMID: 7558321\]](#).
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801. [\[PMID: 16497588\]](#).
- D'Elios MM, Benagiano M, Della Bella C, Amedei A. T-cell response to bacterial agents. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5:640-5. [\[PMID: 21918304\]](#).
- Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, Ouyang W, Hu Y. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol* 2010; 30:185-95. [\[PMID: 20177959\]](#).
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203:2271-9. [\[PMID: 16982811\]](#).
- Xue ML, Zhu H, Thakur A, Willcox M. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with Pseudomonas aeruginosa. *Immunol Cell Biol* 2002; 80:340-5. [\[PMID: 12121222\]](#).
- Hohki S, Ohguro N, Haruta H, Nakai K, Terabe F, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Kawahata H, Kishimoto T, Naka T. Blockade of interleukin-6 signaling suppresses experimental autoimmune uveoretinitis by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Exp Eye Res* 2010; 91:162-70. [\[PMID: 20420831\]](#).
- Ward LD, Hammacher A, Howlett GJ, Matthews JM, Fabri L, Moritz RL, Nice EC, Weinstock J, Simpson RJ. Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6 receptor complex. *J Biol Chem* 1996; 271:20138-44. [\[PMID: 8702737\]](#).
- Tenhumberg S, Waetzig GH, Chalaris A, Rabe B, Seeger D, Scheller J, Rose-John S, Grotzinger J. Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130. *J Biol Chem* 2008; 283:27200-7. [\[PMID: 18650419\]](#).
- Enriquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, Galatowicz G, Garcia-Vazquez C, Fernandez I, Stern ME, Diebold Y, Calonge M. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine* 2008; 44:160-7. [\[PMID: 18760623\]](#).
- Ahmed B, Tschen JA, Cohen PR, Zaki MH, Rady PL, Tyring SK, Corringham RE, Kurzrock R. Cutaneous castleman's disease responds to anti interleukin-6 treatment. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:2386-90. [\[PMID: 17766835\]](#).
- Shoji J, Kawaguchi A, Gotoh A, Inada N, Sawa M. Concentration of soluble interleukin-6 receptors in tears of allergic conjunctival disease patients. *Jpn J Ophthalmol* 2007; 51:332-7. [\[PMID: 17926108\]](#).
- Sugaya S, Sakimoto T, Shoji J, Sawa M. Regulation of soluble interleukin-6 (IL-6) receptor release from corneal epithelial cells and its role in the ocular surface. *Jpn J Ophthalmol* 2011; 55:277-82. [\[PMID: 21523377\]](#).
- Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H, Murakami A. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:8549-57. [\[PMID: 21989726\]](#).
- Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 2008; 43:402-7. [\[PMID: 18701318\]](#).
- Kim MR, Manoukian R, Yeh R, Silbiger SM, Danilenko DM, Scully S, Sun J, DeRose ML, Stolina M, Chang D, Van GY, Medlock ES. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. *Blood* 2002; 100:2330-40. [\[PMID: 12239140\]](#).

19. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:479-89. [PMID: 20559326].
20. De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, Pitcher JD 3rd, Fang B, Zheng X, Ma P, Farley WJ, Siemasko KF, Niederhorn JY, Stern MEPflugfelder SC. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol* 2009; 2:243-53. [PMID: 19242409].
21. Maertzdorf J, Osterhaus AD, Verjans GM. IL-17 expression in human herpetic stromal keratitis: modulatory effects on chemokine production by corneal fibroblasts. *J Immunol* 2002; 169:5897-903. [PMID: 12421973].
22. Pappu R, Rutz S, Ouyang W. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol* 2012; 33:343-9. [PMID: 22476048].
23. Ely LK, Fischer S, Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol* 2009; 10:1245-51. [PMID: 19838198].
24. Onishi RM, Park SJ, Hanel W, Ho AW, Maitra A, Gaffen SL. SEF/IL-17R (SEFIR) is not enough: an extended SEFIR domain is required for il-17RA-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2010; 285:32751-9. [PMID: 20729198].
25. Kramer JM, Hanel W, Shen F, Isik N, Malone JP, Maitra A, Sigurdson W, Swart D, Tocker J, Jin T, Gaffen SL. Cutting edge: identification of a pre-ligand assembly domain (PLAD) and ligand binding site in the IL-17 receptor. *J Immunol* 2007; 179:6379-83. [PMID: 17982023].
26. Das Sarma J, Ciric B, Marek R, Sadhukhan S, Caruso ML, Shafagh J, Fitzgerald DC, Shindler KS, Rostami A. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 2009; 6:14-[PMID: 19400960].
27. Thiele K, Riemann D, Navarrete Santos A, Langner J, Kehlen A. Cell-cell contact of human T cells with fibroblasts changes lymphocytic mRNA expression: increased mRNA expression of interleukin-17 and interleukin-17 receptor. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11:53-8. [PMID: 10705299].
28. McAllister F, Henry A, Kreindler JL, Dubin PJ, Ulrich L, Steele C, Finder JD, Pilewski JM, Carreno BM, Goldman SJ, Pirhonen J, Kolls JK. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol* 2005; 175:404-12. [PMID: 15972674].
29. Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, Monroe HR, Magorien JE, Blauvelt A, Kolls JK, Cheung AL, Cheng GMiller LS. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:1762-73. [PMID: 20364087].
30. Kao CY, Huang F, Chen Y, Thai P, Wachi S, Kim C, Tam L, Wu R. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2005; 175:6676-85. [PMID: 16272323].
31. Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, Evans RT, Gaffen SL. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 2007; 109:3794-802. [PMID: 17202320].
32. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003; 171:6173-7. [PMID: 14634133].
33. Marquart ME. Animal models of bacterial keratitis. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:680642.
34. 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; 36:614-21. [PMID: 7534282].
35. Paulsen F, Jager K, Worlitzsch D, Brauer L, Schulze U, Schafer G, Sel S. Regulation of MUC16 by inflammatory mediators in ocular surface epithelial cell lines. *Ann Anat* 2008; 190:59-70. [PMID: 18342144].
36. Hume EB, Cole N, Khan S, Garthwaite LL, Aliwarga Y, Schubert TL, Willcox MD. A *Staphylococcus aureus* mouse keratitis topical infection model: cytokine balance in different strains of mice. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:294-300. [PMID: 15877608].
37. Tekstra J, Beekhuizen H, Van De Gevel JS, Van Benten IJ, Tuk CW, Beelen RH. Infection of human endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces the production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and monocyte chemotaxis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:489-95. [PMID: 10469052].
38. Liton PB, Li G, Luna C, Gonzalez P, Epstein DL. Cross-talk between TGF-beta1 and IL-6 in human trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 2009; 15:326-34. [PMID: 19209241].
39. Lutter R, Loman S, Snoek M, Roger T, Out TA, Jansen HM. IL-6 protein production by airway epithelial(-like) cells disabled in IL-6 mRNA degradation. *Cytokine* 2000; 12:1275-9. [PMID: 10930312].
40. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334:297-314. [PMID: 9716487].
41. Molesworth-Kenyon SJ, Yin R, Oakes JE, Lausch RN. IL-17 receptor signaling influences virus-induced corneal inflammation. *J Leukoc Biol* 2008; 83:401-8. [PMID: 17998300].
42. O'Connor W Jr, Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, Kolls JK, Flavell RA. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009; 10:603-9. [PMID: 19448631].
43. Garley M, Jablonska E. Chosen IL-17 family proteins in neutrophils of patients with oral inflammation. *Adv Med Sci* 2008; 53:326-30. [PMID: 19095584].

Articles are provided courtesy of Emory University and the Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, P.R. China. The print version of this article was created on 17 January 2013. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.

