

2015/2016

# *OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN IN VIVO E IN VITRO MEDIANTE VECTORES NO VIRALES*

Grado en Biotecnología

Santiago Milla Navarro

**Tutor: Dr. Eduardo Fernández Jover**

**Co-tutora: Dra. Gema Martínez Navarrete**

**Instituto de Bioingeniería**

**Departamento de Neuroprótesis y rehabilitación visual**





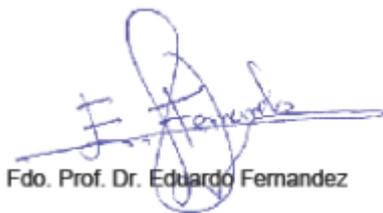
Eduardo Fernández Jover, Catedrático de Universidad y Director del grupo de Neuroingeniería Biomédica y Neuroprótesis del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche y

Gema Martínez Navarrete, Doctora en Biología del grupo de Neuroingeniería Biomédica y Neuroprótesis del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

INFORMAN:

Que el presente trabajo de fin de Grado titulado “Optimización de la transfección *in vivo* e *in vitro* mediante vectores no virales” ha sido supervisado y realizado bajo nuestra dirección por SANTIAGO MILLA NAVARRO, en la Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual, del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández, estimando que se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado y defendido públicamente.

Y para que conste, firmamos la presente autorización en Elche a 22 de Febrero de dos mil dieciséis.



Fdo. Prof. Dr. Eduardo Fernandez



Fdo. Dr. Gema Martínez Navarrete

## CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	4
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
1. Microscopía electrónica. ....	15
2. Ensayos <i>in vitro</i> .....	15
2.1. Preparación de placas de cultivo primario .....	15
2.2. Cultivos primarios de células embrionarias de corteza y retina de rata.....	15
2.3. Construcción del vector de transfección .....	16
2.4. Transfección del cultivo .....	16
2.5. Inmunocitoquímica .....	17
2.6. Cuantificación de la transfección .....	18
2.7. Citometría de flujo .....	18
2.8. Ensayo de viabilidad .....	19
3. Ensayos <i>in vivo</i> .....	19
3.1. Aprobación ética.....	19
3.2. Animales .....	19
3.3. Tomografía de Coherencia Óptica de Láser Confocal .....	20
3.4. Transfección de retina de ratón.....	20
3.5. Perfusión y enucleación.....	21
3.6. Inmunohistoquímica.....	22
3.7. Microscopia de fluorescencia y reconstrucción digital de retinas .....	23
3.8. Citometría de flujo .....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	24
1. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de las magnetopartículas.....	24
2. Ensayos <i>in vitro</i> .....	24
2.1. Resultados de inmunocitoquímica.....	24
2.2. Resultados de la citometría de flujo .....	26
2.3. Resultados del ensayo de viabilidad.....	27
3. Ensayos <i>in vivo</i> .....	28
3.1. Resultados del examen ocular .....	28
3.2. Reconstrucción digital de la retina.....	29
3.3. Resultados de la inmunohistoquímica y de la fluorescencia directa. ....	31
3.4. Resultados de citometría de flujo.....	34
<b>DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>CONCLUSIONES</b> .....	37
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	38

## **ABREVIATURAS**

BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*

Catch, del inglés *Calcium Translocating Channelrhodopsin*

cGMP, del inglés *cyclic Guanosine Monophosphate*

ChR2, del inglés *Channelrhodopsin-2*

DMSO, del inglés *Dimethyl Sulfoxide Minimum*

DNA, del inglés *Deoxyribonucleic acid*

EDTA, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*

FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*

FITC, isotiocianato de fluoresceína

GCL, capa de células ganglionares

GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*

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

INL, capa nuclear interna

MAP2, del inglés *Microtubule Associated Protein 2*

MTT, bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico

ONL, capa nuclear externa

PB, del inglés *Phosphate Buffered*

PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*

PDL, poli-D-lisina

PFA, paraformaldehído

H, hora

Min, minutos

## RESUMEN

En el mundo hay aproximadamente 285 millones de personas con discapacidad visual, lo que ha creado la necesidad de desarrollar nuevas terapias biotecnológicas para conseguir un tratamiento efectivo. La optogenética surge como una terapia viable para restaurar visión en retinopatías. Permite la activación o inhibición del tejido nervioso mediante la expresión precisa de canales iónicos dependientes de luz en la membrana. Canales como la canalrodopsina-2 (ChR2) o su variante Catch, contienen una opsina que cuando es estimulada con una longitud de onda determinada (azul), provoca una modificación estructural que abre el canal permitiendo el flujo de los iones, resultando en una despolarización de la membrana y el disparo de un potencial de acción. En este estudio comprobamos la capacidad transfectiva tanto *in vitro* como *in vivo* usando magnetopartículas para introducir y expresar el plásmido de la Catch.

**Palabras clave:** Optogenética, magnetopartículas, Catch, transfección, neuronas, retina.

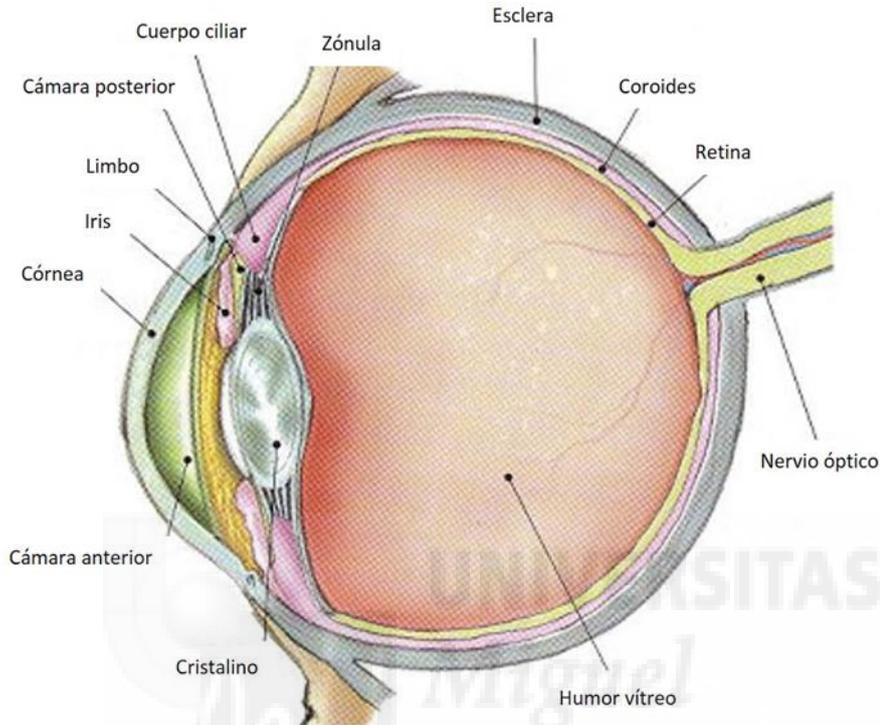
Worldwide there is approximately 285 million visually impaired people creating a demand for the development of new biotechnology therapies for effective treatment. Optogenetics has been proposed as a viable therapy for restoring vision in retinal dystrophies. Optogenetics permits the activation or inhibition of excitable tissue through the ectopic expression of light gated ion channels or pumps in the membrane with precise temporal precision and target specificity. Channels such as channelrhodopsin-2 (ChR2) and its enhanced variant CatCh contain an opsin which when activated by a specific frequency of light (blue) causes a structural modification which opens the channel allowing ions to flow through the membrane resulting in cell depolarization and action potential firing. One important challenge, in gene therapy however, is overcoming the repulsion of the cell membrane on plasmids. Here, we demonstrate an optimized method of transfection *in vitro* and *in vivo* using magnetoparticles to introduce and express the CatCh plasmid in retinal cells.

**Keywords:** Optogenetics, magnetic nanoparticles, Catch, transfection, neurons, retina.

## INTRODUCCIÓN

### I – Estructura ocular y de la retina

El ojo, es uno de los principales órganos sensoriales en los seres humanos. Capta los fotones y los transforma en impulsos nerviosos, dando lugar a la visión. A continuación, se presenta un esquema de la estructura del globo ocular (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura del globo ocular. Imagen obtenida de: <http://anatomiadelojo.blogspot.com.es/2008/05/globo-ocular.html>

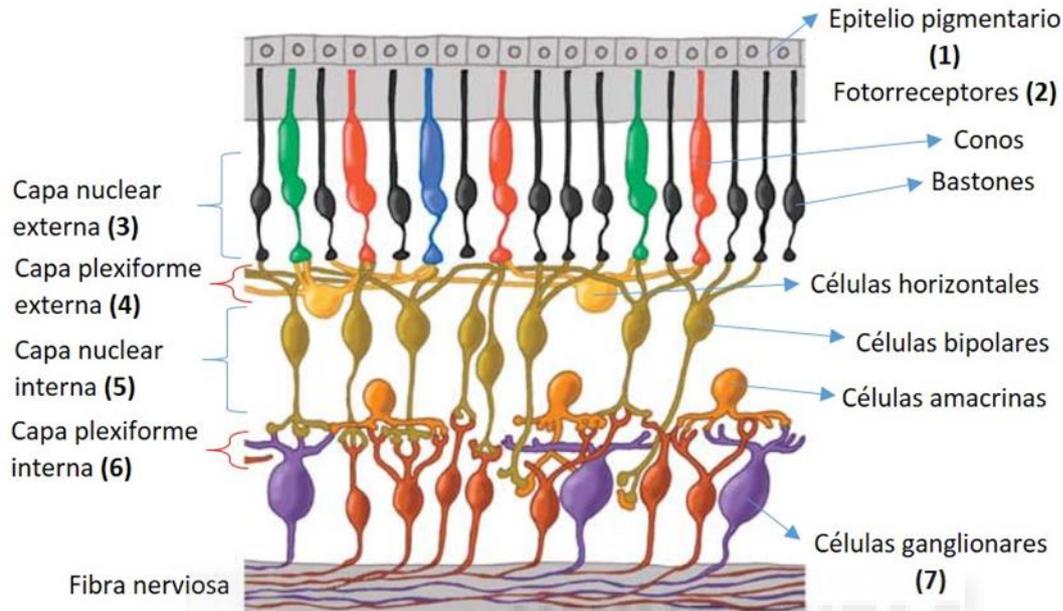
En nuestro caso vamos a centrarnos sobre todo en la retina, por ser una parte esencial de la percepción visual y del posterior procesado.

La retina es una porción altamente especializada del sistema nervioso proveniente del prosencéfalo y cuya finalidad es la captación de los fotones y la fototransducción. Puesto que es una región muy especializada, y por tanto muy poco variable, además de ser de fácil acceso, constituye un modelo único para estudios fisiológicos y morfológicos del sistema nervioso (Rodieck, 1973).

En el centro de la retina se encuentra la mácula. Esta zona carece de vasos sanguíneos y presenta una depresión en su centro conocida como fovea, zona donde encontramos una mayor sensibilidad a los estímulos luminosos debido a la gran cantidad de células sensoriales presentes. Gracias a esto, el ojo humano presenta mayor agudeza visual y es capaz de distinguir, muy precisamente, formas o detalles muy similares. En el lateral se encuentra la papila, lugar por donde pasan los vasos sanguíneos que nutren la retina y las fibras nerviosas que derivan al nervio óptico (Kolb, 2005). La retina se compone de una serie

de capas superpuestas e interconectadas, que son responsables de la recepción de los fotones y la fototransducción.

A continuación podemos observar un esquema de la retina desde la capa más externa a la más interna (Figura 2):



**Figura 2.** Estructura de la retina donde se aprecian los distintos tipos celulares organizados en capas. Los cuerpos celulares de fotorreceptores, en la parte superior, componen la capa nuclear externa, cerca del epitelio pigmentario. Los cuerpos de las células horizontales y células bipolares componen la capa nuclear interna. Las células amacrinas se encuentran cerca de las células ganglionares. Las uniones de los axones y dendritas forman las diversas capas plexiformes. Finalmente encontramos las fibras nerviosas que transportan el estímulo hasta el cerebro. (Kolb, H. 2005)

El epitelio pigmentario (1 en la Figura 2), es la capa más externa de la retina. Está formada por células hexagonales que se organizan en una sola capa, que se caracterizan por la presencia de gránulos de pigmento en su interior que absorben la luz que llega hasta ellas. Estas células están implicadas en la fagocitosis de los segmentos más externos de los fotorreceptores cuando dejan de ser funcionales, así como en el metabolismo y almacenaje de vitamina A, utilizada para la síntesis de pigmentos (Strauss, 2005). Seguidamente encontramos los fotorreceptores (2). Son células que están formadas por discos membranosos apilados. En las membranas de estos discos podemos encontrar una molécula formada por un cromóforo retinal y una opsina. Esta molécula es un receptor unido a proteína G que será excitado por los fotones. La capa de los fotorreceptores está formada por conos y bastones. Son las células que captan los fotones y llevan a cabo la fototransducción, por tanto son las únicas células realmente sensibles a los estímulos lumínicos. Los conos y bastones están distribuidos de forma diferente, para garantizar una precisión visual extrema. Por una parte, los bastones se encuentran en mayor densidad en la región periférica, donde se detecta el movimiento y se determinan las formas. Son

funcionales principalmente en condiciones de baja luminosidad y proporcionan la visión en blanco y negro. Por otra parte, los conos están localizados mayoritariamente en la región central, conocida como fovea, encargada de la agudeza visual. Los conos están adaptados a condiciones de alta luminosidad y proporcionan la visión en color. Los cuerpos celulares de los conos y bastones se organizan en una capa denominada nuclear externa (3). Seguidamente, encontramos la capa plexiforme externa (4), donde se produce la sinapsis entre fotorreceptores y las células bipolares, que sirven de unión a las células ganglionares, y las células horizontales, cuya función es la modulación del estímulo. Consecutivamente, encontramos la capa nuclear interna (5), compuesta por los cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales y de las células gliales (células de Müller, astrocitos y células de la microglía) (Kolb, 2005), así como de las células amacrinas, que son interneuronas moduladoras y células interplexiformes, cuya función es coordinar el flujo de información entre las capas plexiformes (Gallego et al., 2003). A continuación, encontramos la capa plexiforme interna (6), donde se lleva a cabo la sinapsis entre los axones de las células bipolares, las células amacrinas, y las dendritas de las células ganglionares (7) que a su vez están directamente conectadas con las fibras del nervio óptico (Kolb, 2005), que conducirá los estímulos hacia el cerebro para su posterior procesamiento (OTAegi, 2009).

En el proceso de la visión, los rayos de luz entran al ojo y atraviesan la cámara anterior, el cristalino, el humor vítreo y finalmente llegan a la fovea. Cuando llega un fotón de luz, se produce un cambio conformacional en el cromóforo retinal que a su vez provoca un cambio en la opsina. El cambio conformacional activa la transducina  $G_t$  unida al receptor, que activa, a su vez, una fosfodiesterasa de cGMP, reduciendo así los niveles de cGMP. Debido a esta reducción, se desactivan los canales catiónicos, lo que provoca una hiperpolarización de la membrana de las células fotorreceptoras, provocando el cese de liberación de neurotransmisor, que es estable mientras hay oscuridad. Este cese en la liberación de los neurotransmisores es lo que inicia el proceso de la visión. Este proceso es el que conocemos como fototransducción. El estímulo es transferido a las células de la capa nuclear interna. Una vez allí la señal es modificada e integrada por las células horizontales y amacrinas, conducido posteriormente hasta las células ganglionares a través de las células bipolares para ser transmitido a las fibras del nervio óptico. El estímulo recorrerá todo el nervio óptico hasta llegar al lóbulo occipital, donde se llevará a cabo el procesamiento de la información aportada por el estímulo nervioso y se formarán las imágenes. Hay que destacar que la información recaba por cada ojo es procesada en la zona opuesta de la corteza cerebral.

## II – Trastornos de la retina y alteraciones visuales

En el mundo hay aproximadamente 285 millones de personas con discapacidad visual, de las cuales 39 millones son ciegas y 246 millones presentan baja visión. A pesar de que en los últimos años el porcentaje de personas afectadas ha disminuido, es necesario el desarrollo de nuevas terapias biotecnológicas con el objetivo de mejorar la calidad de vida de personas con esta discapacidad. La retina es tan especializada y su funcionalización tan específica y única, que ha perdido la capacidad de regeneración, por lo que cualquier alteración fisiológica o patológica tiene graves consecuencias. Algunos ejemplos de alteraciones visuales son:

- Retinosis pigmentaria: conjunto de enfermedades degenerativas que se caracterizan por la pérdida lenta y progresiva de la visión, debido a una destrucción gradual de los fotorreceptores. Es frecuente la aparición de acúmulos pigmentarios en el fondo del ojo (Fernández, 2007).
- Degeneración macular asociada a la edad: es una maculopatía bilateral de causa desconocida, que provoca pérdida irreversible de la visión central, debida a la alteración del epitelio pigmentario y de la retina. Existen dos formas clínicas de degeneración macular relacionada con la edad: del tipo neovascular y la DMRE del tipo no neovascular, también conocidas como formas húmedas y secas, respectivamente (Marcos et al., 2008).
- Retinopatía diabética: es una complicación de la diabetes en la que los vasos sanguíneos de la retina son dañados. Puede derivar en la aparición de cataratas y glaucomas.
- Retinoblastoma: división anormal de las células de la retina que provoca graves alteraciones en la visión.

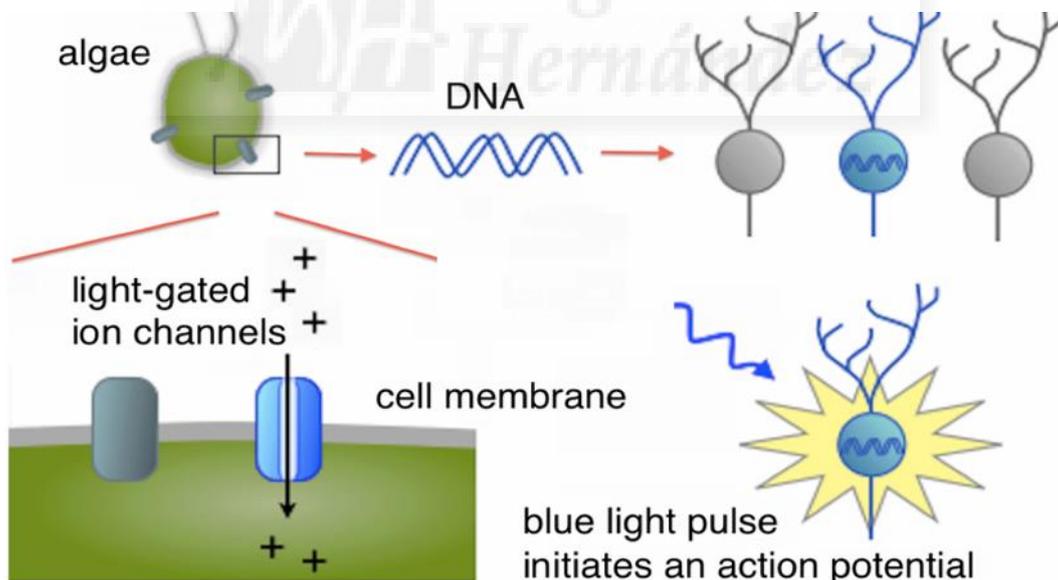
## III – Optogenética

Una nueva aproximación terapéutica para enfermedades de retina es la optogenética. Una combinación de métodos genéticos y ópticos que permiten un control rápido y dirigido de eventos específicos en sistemas biológicos diana, basados en la transfección de un segmento de DNA específico que codifica para una opsina, una proteína que presenta un segmento sensible a la luz y un canal que deja pasar iones cuando el segmento sensible a la luz es excitado, permitiendo así una respuesta casi instantánea (Deisseroth, 2011).

Además, el ojo presenta ventajas únicas para realizar tratamientos mediante terapia génica. Su pequeño tamaño, compartimentalización y situación inmunoprivilegiada, facilitan la liberación de vectores de transfección y su dispersión sistémica, minimizando los efectos

adversos. Además, como el medio es transparente, nos permite seguir eficazmente el proceso de transferencia genética (Puras., Martínez Navarrete., et al., 2015).

Las opsinas son proteínas naturales sensibles a la luz, integradas en la estructura de la rodopsina y que tienen un cromóforo retinal que se isomeriza cuando es excitado por la luz, activando la proteína G unida. Las opsinas combinan un dominio sensible a la luz y un canal iónico, por lo que son excelentes candidatos para modular el potencial de membrana y provocar la despolarización de la membrana de las neuronas (Yizhar et al., 2011). La optogenética se centra en estas moléculas y su verdadero objetivo es la adaptación de opsinas exógenas provenientes de microorganismos para su utilización en terapia génica. Las investigaciones se han centrado en el estudio de tres opsinas en concreto, la bacteriorrodopsina, la halorrodopsina y finalmente la canalrodopsina, con especificidad iónica diferente, siendo ésta última de gran interés en la optogenética. Se obtuvo de *Chlamydomonas reinhardtii*, un alga verde que posee la capacidad para moverse hacia una fuente luminosa gracias a la Canalrodopsina-2 (ChR2). La ChR2 es excitada por luz a una longitud de onda de 473 nm (correspondiente a la luz azul) produciendo un cambio conformacional que abre el poro permitiendo el paso de cationes, como sodio o potasio, a favor de gradiente electroquímico, al interior de la neurona, provocando corrientes que desembocan en la hiperpolarización de la membrana (Nagel et al., 2003) (Figura 3).



**Figura 3.** Breve visualización del proceso de optogenética en el que podemos observar la apertura de los canales iónicos dependientes de luz, cuando la neurona recibe un estímulo lumínico. Obtenida de: <https://sqonline.ucsd.edu/2014/04/bioengineering-of-the-future-optogenetics/>

A partir del descubrimiento de la Canalrodopsina-2 y tras realizar estudios para demostrar que es inocua en roedores, se intentó, con éxito, modificarla mediante ingeniería genética, para obtener variantes de la proteína con otras características. Una de las

variantes de esta opsina es la CatCh, obtenida a partir de una mutación de la Leucina 132 en una Cisteína, lo que aumenta la permeabilidad al calcio. Se ha demostrado que esta variante es capaz de provocar potenciales de acción en las neuronas, despolarizando (activando) o hiperpolarizando (inhibiendo) las neuronas, en respuesta a estímulos de luz con una longitud de onda de 474 nm, por lo que la combinación de todos estos métodos y herramientas permiten un control multimodal de la actividad neuronal (Kleinlogel et al., 2011).

#### **IV – Vectores**

El vehículo de transfección más básico es el propio DNA desnudo, pero esto presenta varios inconvenientes. Por tanto, para que la transfección se pueda llevar a cabo, se necesita disponer de un vector de transfección. Un vector es un sistema que se usa para introducir un gen exógeno en las células, facilitando la entrada del plásmido en dicha célula, así como también protegerlo frente a los mecanismos intracelulares de degradación, aumentando así su biodisponibilidad. El vector ideal debe tener una alta eficacia de transfección, baja toxicidad celular y elevada especificidad (Buerli et al. 2007).

Los vectores pueden tener características muy variadas. Generalmente se clasifican en vectores virales y vectores no virales:

- **Vectores virales:** se basan en la modificación de la estructura de un virus, con el fin de limitar la patogenicidad, mientras se deja intacta la capacidad infectiva, que es lo que permitirá que el inserto se introduzca en la célula diana. Las regiones del material genético del virus que han sido eliminadas, serán reemplazadas por el nuevo material genético que se va a introducir. Sin embargo, se ha demostrado que existe un riesgo potencial de respuesta inmune y mutagénesis, que podría desembocar en la activación de oncogenes o en el silenciamiento de genes supresores de tumores, así como la reversión del virus a su estado natural. Los tipos de virus más usados son los retrovirus, adenovirus, adenoasociados y herpesvirus (Thomas et al., 2003).
- **Vectores no virales:** estos vectores usan vehículos diferentes para transportar el plásmido e introducirlo en la célula. La investigación en terapia génica se ha decantado hacia el desarrollo de estos vectores gracias a las ventajas que poseen. Son fáciles de sintetizar y están desprovistos de la mayoría de los riesgos para la salud que presentan los vectores virales. Otra ventaja muy importante, es la ausencia de limitación de tamaño y la capacidad para transportar varios genes al mismo tiempo, lo que será muy útil para el tratamiento eficaz de enfermedades. Entre las técnicas no virales, destacan la electroporación o la biobalística. Sin

embargo, con estos métodos no se obtienen elevados niveles de transfección. Por ello, se han desarrollado otros tipos de vectores más eficaces, como lípidos catiónicos, polímeros o nanopartículas de diversos materiales. Estos materiales poseen la ventaja de presentar cargas positivas, favoreciendo la unión del material genético (Yin et al., 2014).

En retina se han realizado multitud de estudios en los que se han usado ambos tipos de vectores, pero incluso con un refinamiento genético exhaustivo, los vectores virales no se presentan como candidatos óptimos, debido a los efectos biológicos adversos que pueden desencadenar. Esto, junto con la limitación de tamaño del inserto, ha dado paso a un auge de los vectores no virales, obteniendo mejores tasas de transfección en retina y con menos riesgos asociados (Puras, Martínez-Navarrete, et al., 2015).

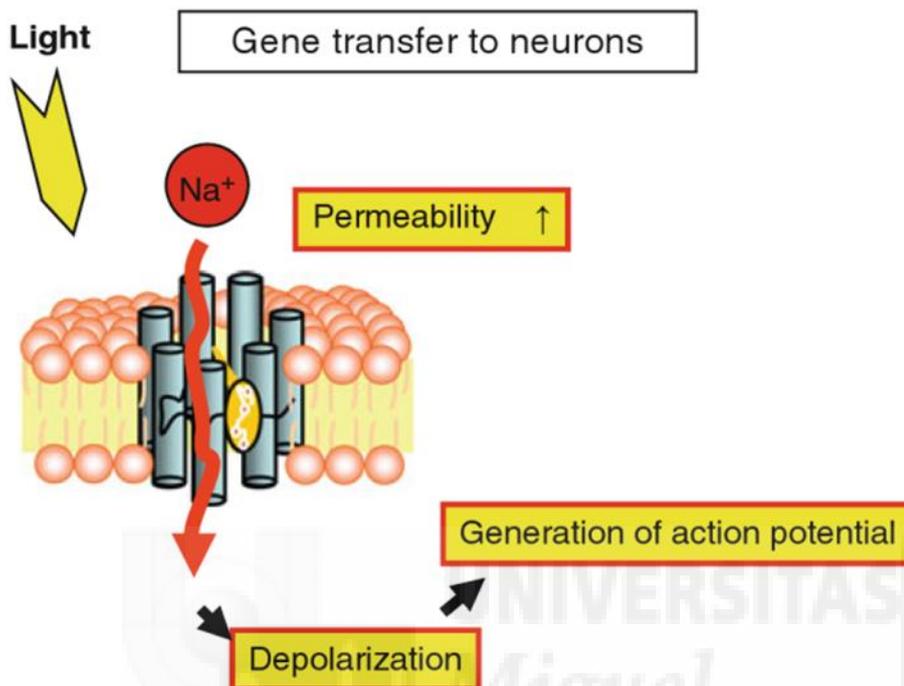
## **V – Nanopartículas magnéticas**

En este trabajo nos hemos centrado en un sistema de vectores no virales formado por nanopartículas magnéticas. Las nanopartículas magnéticas son un vector no vírico químico. Poseen un núcleo compuesto por materiales magnéticos tales como hierro, níquel o cobalto y sus derivados químicos. Las más comunes son las de óxido de hierro. Estas nanopartículas son un método muy interesante ya que presentan una alta transfección *in vivo* con una cirugía mínima en cerebro (Soto-Sánchez et al., 2015). Las características magnéticas de sus núcleos y su capacidad para unir moléculas de interés a su superficie hacen que sean un método muy atractivo para la introducción de plásmidos. Son capaces de dispersarse fácilmente en soluciones fisiológicas, formando suspensiones homogéneas. Estas suspensiones pueden interactuar con un campo magnético externo y así poder concentrarlas en la zona que nos interesa, obteniendo así una expresión localizada del plásmido (Buerli et al., 2007).

## **VI – Opsina CatCh**

Abreviación de la expresión inglesa *Calcium Translocating Channelrhodopsin*. Esta proteína es una mutación de la Canalrodopsina-2, que presenta una permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  cuatro veces mayor que el modelo silvestre. Se caracteriza, además, por tener una sensibilidad a la luz setenta veces superior a la del modelo silvestre, así como una cinética de respuesta mucho más rápida cuando se expresa en las neuronas del hipocampo (Kleinlogel et al., 2011). Esta mayor sensibilidad y cinética mejorada se debe a la modificación de la afluencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Aunque hay estudios que sugieren que estas características son debidas a que estos mutantes presentan unas cinéticas de desactivación muy lentas (Mattis et al., 2011). La Catch presenta un 70 % de homología con la secuencia

de aminoácidos de la Canalrodopsina mostrada entre las posiciones 1-309. Sin embargo, sus nuevas características son debidas a la presencia de una mutación en la leucina 132, que es sustituida por una cisteína. Estas características hacen que sea un canal iónico de gran interés para los estudios que se reflejarán en este trabajo.



**Figura 4.** Excitación de neuronas que presentan la proteína Catch. La expresión de la Catch en la membrana de la célula permite la apertura de canales catiónicos, cuando son estimuladas lumínicamente. Al abrirse los canales, se inicia el flujo de iones positivos, despolarizando la membrana y dando lugar a la generación de potenciales de membrana.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La terapia génica en retina se muestra muy prometedora en la prevención y tratamiento de enfermedades de la retina. Sin embargo, las neuronas son células muy sensibles a las variaciones en el medio que las rodea, lo que hace que sea extremadamente difícil encontrar una técnica adecuada para transfectar el sistema nervioso. Los vectores virales han demostrado no ser una técnica eficaz debido a la gran cantidad de efectos biológicos adversos que presentan y el tamaño limitado del inserto. En estudios previos en este laboratorio (Soto-Sánchez et al., 2015) se ha demostrado la capacidad de transfección que presentan las magnetopartículas en la corteza cerebral de rata. Basándonos en estos estudios, se ha planteado el uso de estas magnetopartículas para transfectar neuronas e insertar un plásmido que codifique para una opsina, que al expresarse en la membrana de la neurona, nos permitirá ejercer cierto control sobre los potenciales de acción mediante estimulación lumínica. La opsina de este estudio es Catch, una proteína derivada de la ChR2 que presenta mayor sensibilidad a los estímulos lumínicos y una permeabilidad cuatro veces mayor al calcio, lo que facilita la estimulación neuronal. Cabe destacar la ausencia de este tipo de experimentos específicamente con este gen.

Por tanto, el objetivo principal de este proyecto es comprobar la eficacia de la transfección tanto *in vitro* como *in vivo* mediante el uso de diversos tipos de magnetopartículas y el plásmido hVChR1-mKate-betaChR2 (L132C) que codifica para la proteína Catch.

Los objetivos específicos planeados fueron:

- Testar el uso de las magnetopartículas con el plásmido de la Catch *in vitro* y comprobar la eficacia de transfección.
- Optimizar el ratio óptimo de magnetopartículas y plásmido mediante ensayos *in vitro*.
- Confirmar la baja toxicidad del uso de las magnetopartículas.
- Caracterizar la capacidad de transfección de dichas magnetopartículas en el sistema visual de roedores.
- Confirmar la ausencia de lesiones oculares debidos a los tratamientos aplicados para transfectar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Microscopía electrónica.

Se llevó a cabo un examen mediante microscopía electrónica de transmisión para comprobar el tamaño de las magnetopartículas. Para ello, se colocó sobre una rejilla de carbono con forma de una gota de la suspensión de las nanopartículas y posteriormente se observó en el microscopio electrónico de transmisión Jeol Jem 1011.

### 2. Ensayos *in vitro*

#### 2.1. Preparación de placas de cultivo primario

Para los cultivos celulares se usaron placas de 12 pocillos, en las que se colocaron cubreobjetos en cada pocillo previamente esterilizados con etanol 99% e irradiados con luz ultravioleta. Posteriormente, se añadió PDL 0,01 mg/ml (Sigma-Aldrich) y se introdujeron las placas en el incubador (5% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>) a 37°C durante 24 h. El PDL es un enzima cargada positivamente, lo que favorece la adherencia de las células a la superficie de las placas, mediante interacciones electrostáticas entre las cargas negativas de la membrana de las células y las cargas positivas de la superficie de la placa. Transcurrido el tiempo, se retiró el polímero, se realizaron 3 lavados con PBS y después se añadió laminina a una concentración de 8,3 µg/µl (Sigma-Aldrich) durante 3 h.

#### 2.2. Cultivos primarios de células embrionarias de corteza y retina de rata

Se usaron embriones de ratas Sprague Dawley con una gestación de entre 17 y 19 días aproximadamente. Las ratas fueron sacrificadas por personal cualificado, mediante una dislocación cervical. Los embriones se extrajeron rápidamente mediante cesárea y fueron decapitados en una campana de flujo laminar en solución estéril HBSS (Gibco, Life Technologies). Se extrajeron los hemisferios cerebrales y las retinas. Se disgregaron mecánicamente por separado y se incubaron en medio de tripsinización (Tabla 1) (durante 15 min si son corteza y 10 min si son retina) a 37°C. La digestión proteolítica fue inhibida mediante el uso de medio neutralizante (Tabla 1). A continuación, se centrifugaron durante 5 min a 500 g y 17°C. Se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el precipitado muy suavemente en el medio de cultivo primario (Tabla 1). El siguiente paso fue la determinación de la viabilidad celular manualmente, mediante el método de la cámara de Neubauer, usando la tinción de Azul tripán (Invitrogen, Life technologies). La densidad celular por pocillo que sembró fue de 100.000 células tanto para el cultivo de corteza como para el cultivo de retina.

Tras 48 h después de la siembra, se reemplazó el 50% del medio de cultivo por medio nuevo, con el fin de mantener el cultivo estable. Este procedimiento se fue repitiendo cada 3 o 4 días, así como el día previo a la transfección.

Medio	Composición
<b>Medio de tripsinización</b>	50% Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco, Life Technologies), 50% HBSS + 66 mM Glucosa (Panreac AppliChem)
<b>Medio neutralizante</b>	50% HBSS + 66 mM Glucosa, 48% HBSS, 2% FBS (Invitrogen, Life Technologies)
<b>Medio de cultivo primario de corteza</b>	95,2% Neurobasal Medium (Gibco, Life Technologies), 2% FBS, 2% B27 50x (Gibco, Life Technologies), 0,4% Glutamax (Gibco, Life Technologies), 0,4% Pen-Strep (Gibco, Life Technologies)
<b>Medio de cultivo primario de retina</b>	87% DMEM (Gibco, Life Technologies), 10% FBS, 2% B27 50x (Gibco, Life Technologies), 0,4% Glutamax (Gibco, Life Technologies), 0,4% Pen-Strep (Gibco, Life Technologies)

Tabla 1. Medios de cultivo empleados y composición de cada medio.

### 2.3. Construcción del vector de transfección

Para este estudio se usó el plásmido hVChR1-mKate-betaChR2 (L132C) (donado por el doctor E. Bamberg, Max Planck Institute of Biophysics, Alemania). Es un plásmido lineal que presenta un tamaño de 3033 bp, obtenido mediante una mutación L132C de la ChR2. El plásmido codifica para la proteína Catch fusionada con el gen de la GFP, que nos permite seguir la expresión del gen por su fluorescencia verde cuando se expresa.

Se usaron 1,12 µg de plásmido por pocillo, basándose en los experimentos de optimización previos de la alumna de Master Concepción Benavente Soria en la Unidad de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual. Tanto el plásmido como las magnetopartículas, se diluyeron en el reactivo Opti-MEM (Gibco, Life Technologies) por separado, y posteriormente se mezclaron. La mezcla se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente, para que se produjese la formación del magnetocomplejo.

### 2.4. Transfección del cultivo

Se testaron diferentes ratios de plásmido/magnetopartículas, para comprobar el ratio óptimo:

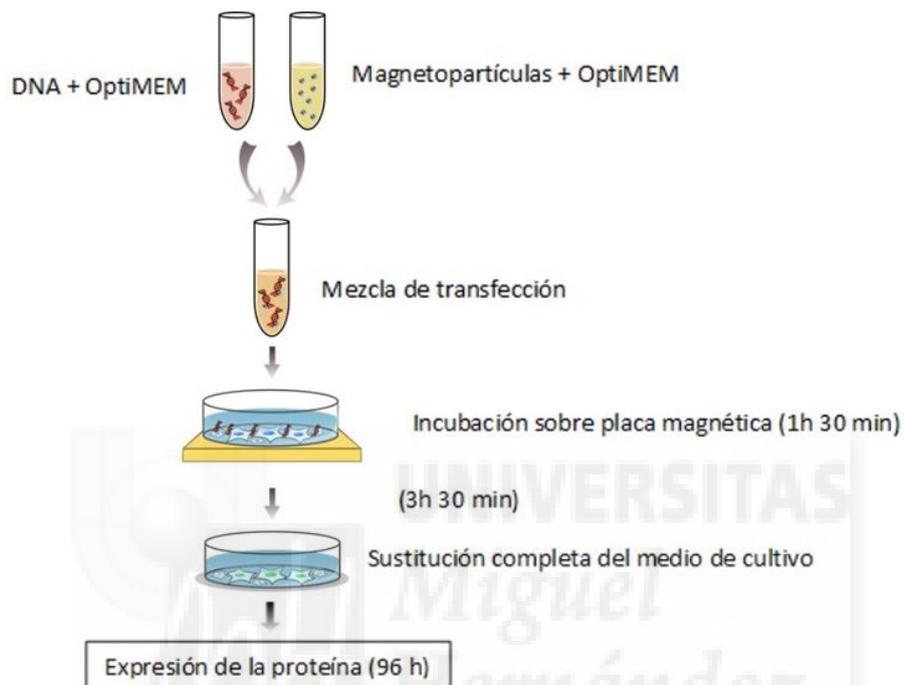
µg plásmido	µl magnetopartículas
1	2
1	3

Tabla 2. Ratios de concentración plásmido/magnetopartículas probados en el ensayo *in vitro*.

Tras la formación del magnetocomplejo, se retiró medio de los pocillos, dejando 400 µl en cada uno. Seguidamente se adicionaron 100 µl de la mezcla de transfección a cada pocillo y se agitaron las placas para conseguir un volumen de distribución uniforme del plásmido. Es imprescindible que este proceso se realice con la mayor suavidad posible, para evitar la rotura del magnetocomplejo. Posteriormente, se incubaron las placas durante 1 h y 30 min a 37°C y sobre una placa magnética que proporciona un campo magnético que

favorece la dirección de las magnetopartículas hacia las células adheridas a la superficie del cubreobjetos. Una vez pasado este tiempo, se retiró la placa magnética y se dejaron incubar las placas durante 3 h y 30 min a 37°C. Transcurrido todo el tiempo, se retiró todo el medio de transfección y se substituyó por medio de cultivo primario. Las placas se dejaron en el incubador durante 96 h, al cabo de las cuales, se examinó la eficacia de la transfección.

A continuación, observamos un esquema de el proceso de transfección:



**Figura 5.** Figura del proceso de magnetofección modificada para adecuarla al protocolo realizado. Obtenida de: <http://www.ozbiosciences.com/content/13-magnetofection-transfection>

## 2.5. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica nos permite identificar antígenos de interés mediante el uso de anticuerpos específicos.

Tras 96 h desde la transfección y previamente a la inmunocitoquímica, las células fueron fijadas con una solución de PFA 4%, en un primer pase de 5 min y otro de 20 min. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS. A continuación, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente con una solución permeabilizadora compuesta por PB 0,1 M + Tritón x-100 0,5% durante 5 min, y después se incubaron durante 1 h en BSA 10% (Sigma-Aldrich). Esta solución bloquea las posibles interacciones inespecíficas. Seguidamente, se añadieron 50 µl de mezcla de anticuerpos primarios en BSA al 3% (Tabla 3) por cubre y se dejaron incubar en una cámara húmeda a 4°C durante 24 h. Tras las 24 h, se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min cada uno y se incubaron de nuevo las muestras con los anticuerpos secundarios en BSA al 3% (Tabla 3), a 4°C durante 1 h. Los anticuerpos secundarios se unen a los primarios y la molécula fluorescente conjugada al anticuerpo

secundario nos permite detectar los antígenos. Se realizaron tres lavados con PB 0,1 M y se montaron con un medio antifading (tampón carbonato-bicarbonato sódico 0,1M + Glicerol (1:2)) junto con el marcador nuclear, Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich).

Anticuerpos primarios	Proteína	Tipo/Especie	Dilución	Casa comercial
anti-MAP2	MAP2	Policlona/Conejo	1:200	Millipore
anti-GFP	GFP	Monoclonal/Ratón	1:100	Invitrogen

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios usados en inmunocitoquímica de cultivos primarios de retina y corteza.

Anticuerpos secundarios	Antígeno	Fluorocromo	Dilución	Casa comercial
anti-Mouse	IgG Ratón	Alexa Fluor 488	1:100	Invitrogen
anti-Rabbit	IgG Conejo	Alexa Fluor 555	1:100	Invitrogen

**Tabla 4.** Anticuerpos secundarios usados en inmunocitoquímica de cultivos primarios de retina y corteza.

## 2.6. Cuantificación de la transfección

Se tomaron fotos de las inmunohistoquímicas realizadas mediante el uso de un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) equipado con un sistema ApoTome, con diferentes filtros de fluorescencia, y posteriormente se cuantificó manualmente el número de células transfectadas respecto del número total, así como una clasificación de los diferentes tipos celulares transfectados observados.

Tanto los estudios estadísticos como las representaciones gráficas se realizaron mediante el software de análisis IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp.®, Armonk EEUU). Todos los valores se representan con medias  $\pm$  SD. Se comprobó si los datos seguían una distribución normal aplicando los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapir-Wilk. Se utilizó una significancia estadística en la que el p-valor = 0,05.

## 2.7. Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que mide la emisión de fluorescencia y la dispersión de la luz de células frente a un haz de luz láser. En este estudio nos ofrece datos acerca de los niveles de fluorescencia de la población que haya sido transfectada gracias a la expresión de la GFP. En esta técnica, se usa una suspensión de células en un sistema de flujo laminar, sobre la que se hace incidir la haz láser que proporciona información sobre sus características físico-químicas.

El primer paso fue realizar un lavado con PBS a 37°C. Posteriormente, se procedió a la tripsinización de las células con Tripsina-EDTA 0,25% y se dejó incubar durante 5 min, agitando periódicamente para facilitar la separación de las células de la superficie de la

placa de cultivo y observando al microscopio para asegurarnos de que las células se desprendían. A continuación, se añadió medio neutralizante con FBS al 20% a 4°C. El medio resultante se recogió y se centrifugó durante 5 min a 200 g y a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en 1 ml de una solución de PBS + 2% FBS. Finalmente, se analizaron las muestras mediante un citómetro de flujo BD FACSCanto II (Becton Dickinson).

## **2.8. Ensayo de viabilidad**

Se realizó un ensayo MTT para evaluar la posible toxicidad de las magnetopartículas y el plásmido en las concentraciones usadas en el cultivo. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, dando como resultado un compuesto coloreado azul-violeta, permitiendo determinar la funcionabilidad de la mitocondria.

Se preparó una solución de MTT (Sigma Aldrich) en PBS, obteniéndose una concentración final de 1 mg/ml. Se retiró el medio de las placas de cultivo y se añadieron 200 µl de la solución de ensayo por pocillo. Se dejaron incubar las placas a 37°C durante 3 h, al cabo de las cuales se retiró la solución de MTT y se añadieron 100 µl de DMSO (Sigma Aldrich) a cada pocillo. Se procedió a medir la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (Beckman Coulter AD 340). Comprobaremos la viabilidad de las células mediante un cambio de color del medio del pocillo hacia un tono morado, lo que nos indica que la célula está viva y las mitocondrias funcionan.

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

### **3.1. Aprobación ética**

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

### **3.2. Animales**

Se utilizaron un total de 14 ratones C57BL/6J de entre 12 y 16 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar con ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas. Los ratones se dividieron en 4 grupos: un grupo control sin tratamiento, un grupo control con el plásmido Catch, un grupo tratado con NeuroMag+plásmido Catch, y un último grupo tratado con FluoMag-N+plásmido Catch.

### 3.3. Tomografía de Coherencia Óptica de Láser Confocal

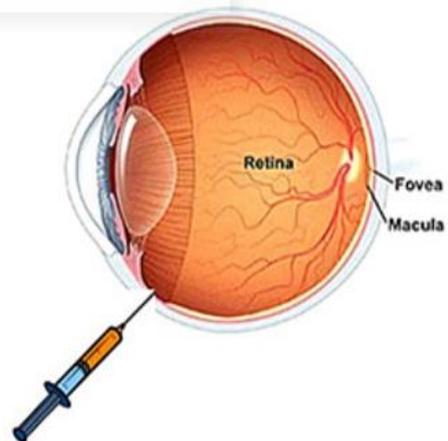
A los animales se les realizó un examen ocular previo a la transfección, mediante el uso de un equipo que combina la adquisición de imagen de fondo del ojo mediante un oftalmoscopio confocal de barrido de láser combinado con un tomógrafo de coherencia óptica (OCT) Spectral-Domain (Spectralis™ HRA+OCT, Heidelberg Engineering), para cerciorarse del estado de la retina. El OCT utiliza fuentes de luz diferentes que permiten adquirir simultáneamente dos imágenes diagnósticas, un rayo láser explora permanentemente el fondo de ojo, observa los movimientos de éste y sirve de este modo como referencia para poder conducir el segundo rayo precisamente sobre la posición apropiada para la adquisición de la imagen de sección transversal. Para facilitar el examen ocular y reducir el riesgo de aparición de un edema, por una deshidratación corneal, se utilizaron lentes de contacto. Este examen ocular también se realizó 96 h tras la inyección del magnetocomplejo, previamente a la perfusión de los animales.

### 3.4. Transfección de retina de ratón

Para la construcción del vector de transfección se siguió el protocolo descrito para las transfecciones *in vitro* (ver apartado 2.3).

Previamente a la transfección, los ratones fueron anestesiados, mediante una inyección intraperitoneal con ketamina (Imagene, Merial) (45 mg/kg) y xilacina (Rompun, Bayer Health Care) (10 mg/kg). Se dilató la pupila del ratón usando Tropicamida 1% (Colircusí tropicamida, Alcon Cusí) y se procedió a la inyección intravítrea (Figura 6) de la mezcla de transfección. Se inyectó 1 µl del magnetocomplejo con una microjeringa de 5 µl en el humor vítreo, manteniendo la aguja en el ojo durante 10 segundos aproximadamente para evitar el reflujo.

Tras retirar la aguja, se colocaron los ratones sobre la placa magnética con el fin de mejorar la dirección del vector y se usó una manta térmica para asegurar que la temperatura corporal de los ratones no disminuyese. Al cabo de 96 h, se llevó a cabo otro examen ocular mediante el OCT, para comprobar el estado del ojo y de la retina, así como realizar un análisis con el láser de azul para detectar fluorescencia, si existiera y si los niveles fueran suficientes.



**Figura 6.** Transfección mediante inyección intravítrea. Imagen obtenida de: <http://www.regenestem.com/intravitreal-injections/>

El plásmido se combinó por separado con dos tipos distintos de nanopartículas magnéticas (Tabla 5), y se realizaron inyecciones de ambas mezclas.

Magnetopartícula	Diametro	Ratio de transfección	Flourescencia	Casa comercial	Nº de animales
NeuroMag	200 nm	1µg plásmido / 2µl magnetopartículas	No	OzBiosciences	8
FluoMag-N	200 nm	1µg plásmido / 2µl magnetopartículas	Sí (Rojas)	OzBiosciences	4

Tabla 5. Magnetopartículas usadas en el estudio *in vivo*.

### 3.5. Perfusión y enucleación

La perfusión es un procedimiento mediante el cual se fijan los tejidos del ratón sacrificado para preservarlos tras su muerte, facilitando así el estudio histológico.

Tras la transfección, se procedió al sacrificio del animal mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal). Se inyectó PB 0,1M, como solución de lavado, en el ventrículo izquierdo del corazón, para desplazar la sangre que queda en el sistema circulatorio y llegar a todos los tejidos. Seguidamente, se realizó el mismo procedimiento, pero esta vez sustituyendo el PB por PFA 4%, cuya función era la de fijar los tejidos (Figura 7).

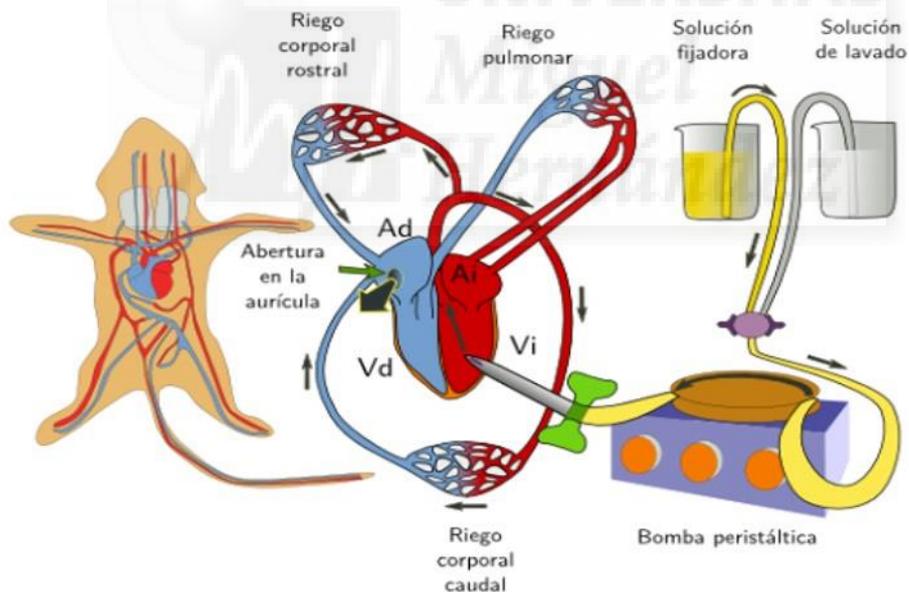


Figura 7. Perfusión mediante bomba peristáltica. Imagen tomada de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-técnicas/2-métodos-fijación.php>

Tras la perfusión, se procedió a la enucleación del globo ocular de los ratones perfundidos, para proceder a su fijación. Para ello, se realizó una pequeña incisión en el limbo esclerocorneal y se sumergió en una solución de PFA 4%. Una vez los ojos estaban fijados, se separaron los ojos que se cortaron en el criostato, de aquellos de los que se extrajo la retina entera (*wholmount*).

Magnetopartículas	nº ojos cortados	nº retinas wholemount	nº retinas cortadas (tras wholemount)
NeuroMag	3	7	1
FluoMag-N	0	4	3

**Tabla 6.** Recuento total de retinas y ojos usado en la realización de los ensayos.

- Para la extracción de la retina entera, se retiró el cristalino, la córnea y finalmente se extrajo la retina cuidadosamente. Se dejó fijando durante 1 h más en PFA 4% a temperatura ambiente, extendida sobre un papel de filtro. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con PB 0,1 M de 5 min cada uno y a continuación se realizó una tinción con Hoechst durante toda la noche. Se montaron las retinas en portaobjetos y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia confocal (Leica TCS SP) y mediante el uso de un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) equipado con un sistema ApoTome con diferentes filtros de fluorescencia.
- Por otro lado, los ojos enucleados que habían sido seleccionados para cortar en el criostato y que habían sido previamente fijados, se lavaron y se les aplicó un tratamiento para crioproteger el tejido mediante la inclusión de éstos en una solución de sacarosa a concentraciones crecientes (15, 20 y 30%), manteniéndose toda la noche en la solución al 30% de sacarosa. Al día siguiente, se incluyeron en oct (Optimal Cutting Temperature, Sakura Finetek), Se realizaron cortes de 16  $\mu$ m en el criostato (Microm) y se recogieron los cortes sobre portaobjetos (Superfrost).

### 3.6. Inmunohistoquímica

- En las retinas enteras.- Se permeabilizaron las retinas con PB 0,1 M y Tritón x-100 0,5% durante 10 min. Posteriormente se pasaron a Tritón 2% con suero normal de asno al 10% en PBS durante 1 h. A continuación se incubaron con la mezcla de anticuerpos primarios (Tabla 7) a 4°C durante 5 días. Tras ese tiempo, se realizaron tres lavados con una solución de PB 0,1 M + Tritón x-100 0,5% de 15 min cada uno. Se adicionaron los anticuerpos secundarios (Tabla 8) y se dejaron incubar las retinas a 4°C durante 2 días. Finalmente, se realizaron 3 lavados con una solución de PB 0,1 M + Tritón x-100 0,5% de 15 min cada uno y se montaron las retinas sobre un portaobjetos para su posterior observación mediante microscopía.
- En los cortes de retina.- Se realizaron 3 lavados de 5 min con PB 0,1 M, y se añadió la solución de bloqueo con BSA 10% + Tritón x-100 0,5% durante 1h. Posteriormente, se incubó con la mezcla de anticuerpos primarios (Tabla 7) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces durante 5 min y se

incubaron con los anticuerpos secundarios específicos (Tabla 8). Finalmente, se montaron y se visualizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP.

Anticuerpos primarios	Tipo/Especie	Dilución	Casa comercial
anti-GFP	Monoclonal/Ratón	1:100	Millipore
anti-NeuN	Policlonal/Conejo	1:200	Millipore
anti-Calretinina	Policlonal/Cabra	1:200	Millipore

**Tabla 7.** Anticuerpos primarios usados en inmunohistoquímica.

Anticuerpos secundarios	Fluorocromo	Dilución	Casa comercial
anti-Mouse	Alexa Fluor 488	1:100	Invitrogen
anti-Rabbit	Alexa Fluor 555	1:100	Invitrogen
anti-Goat	Alexa Fluor 633	1:100	Invitrogen

**Tabla 8.** Anticuerpos secundarios usados en inmunohistoquímica.

### 3.7. Microscopia de fluorescencia y reconstrucción digital de retinas

Se reconstruyeron las retinas mediante el uso de un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) equipado con un sistema ApoTome con diferentes filtros de fluorescencia, con el fin de examinar con mejor detalle toda la superficie y poder detectar las zonas que presentaban transfección.

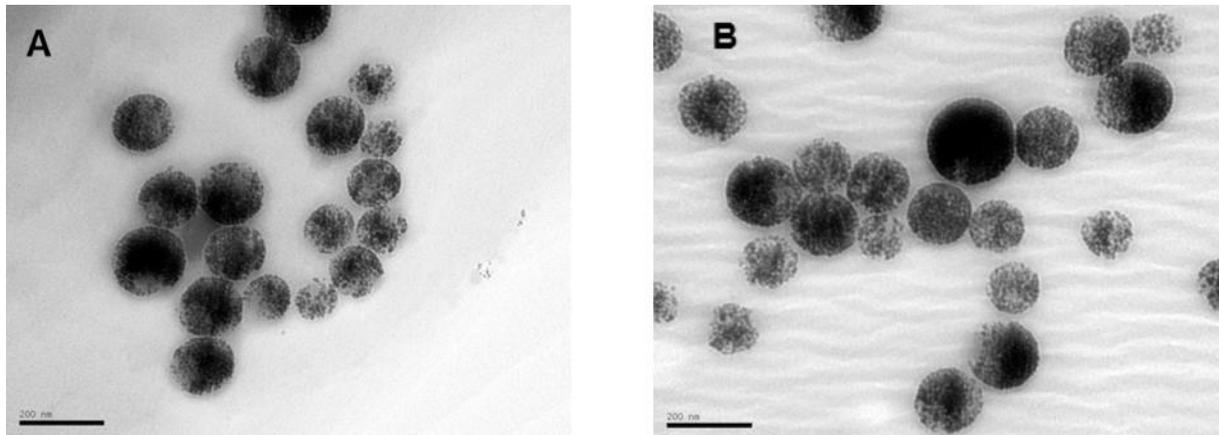
### 3.8. Citometría de flujo

Los ratones transfectados fueron sacrificados tras 96 h y se extrajo su retina. A continuación, se sumergieron las retinas durante 1 h en una solución de papaína 10U/ml (Sigma-Aldrich) en HBSS (Gibco). Pasada 1 h, se centrifugaron durante 4 min a 400 g y a continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS. Finalmente se analizaron las muestras mediante un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BectonDickinson) usando específicamente el filtro FICT-A.

## RESULTADOS

### 1. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de las magnetopartículas

Como se aprecia en la Figura 8, las magnetopartículas NeuroMag, y las FluoMag-N, poseen un diámetro de entre 150-200 nm y una morfología esférica.

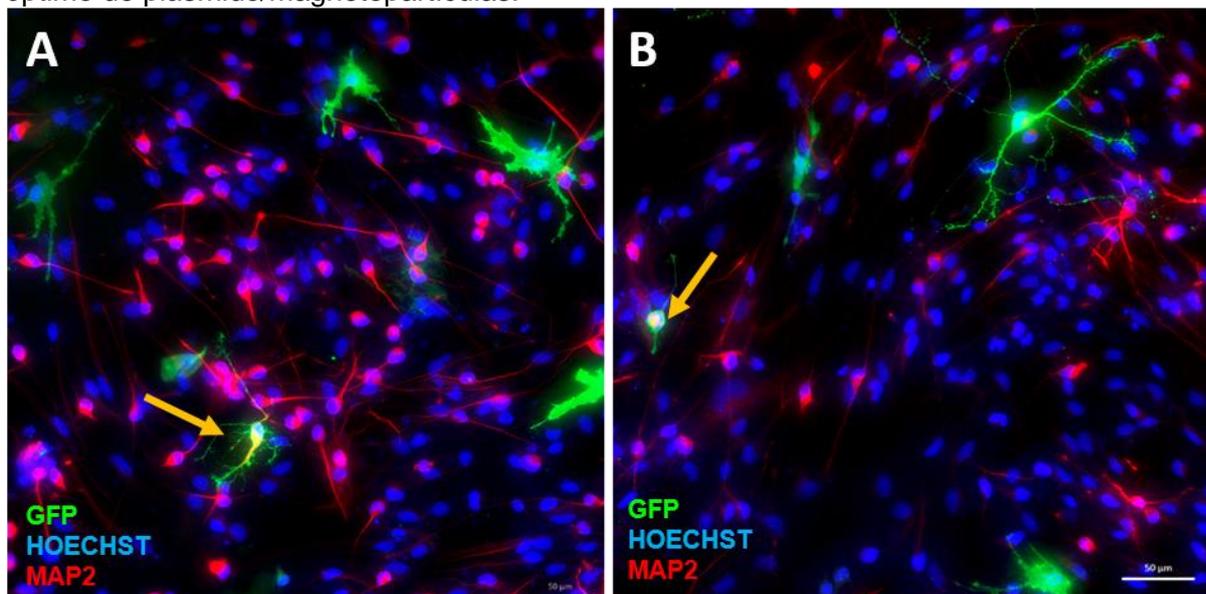


**Figura 8.** Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de las magnetopartículas NeuroMag (A) y FluoMag-N (B). Escala: 200 nm

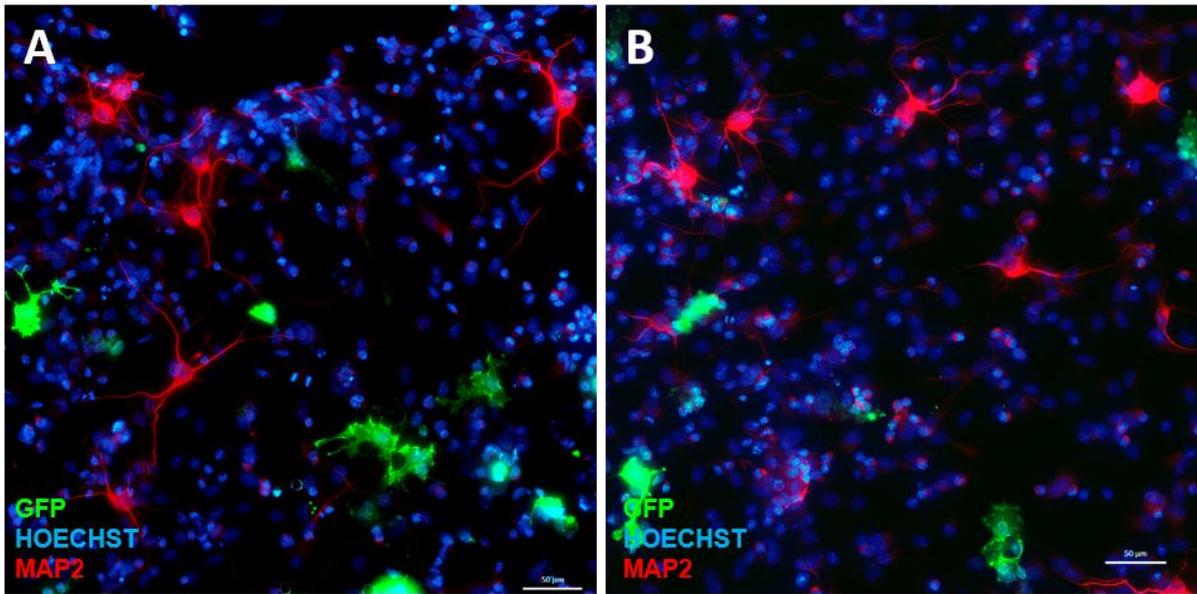
### 2. Ensayos *in vitro*

#### 2.1. Resultados de inmunocitoquímica

Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica de los cultivos primarios de corteza (Figura 9) y retina (Figura 10) de rata embrionaria, y posteriormente, se llevaron a cabo contajes manuales de dichas inmunohistoquímicas, con la finalidad de seleccionar el ratio óptimo de plásmido/magnetopartículas.

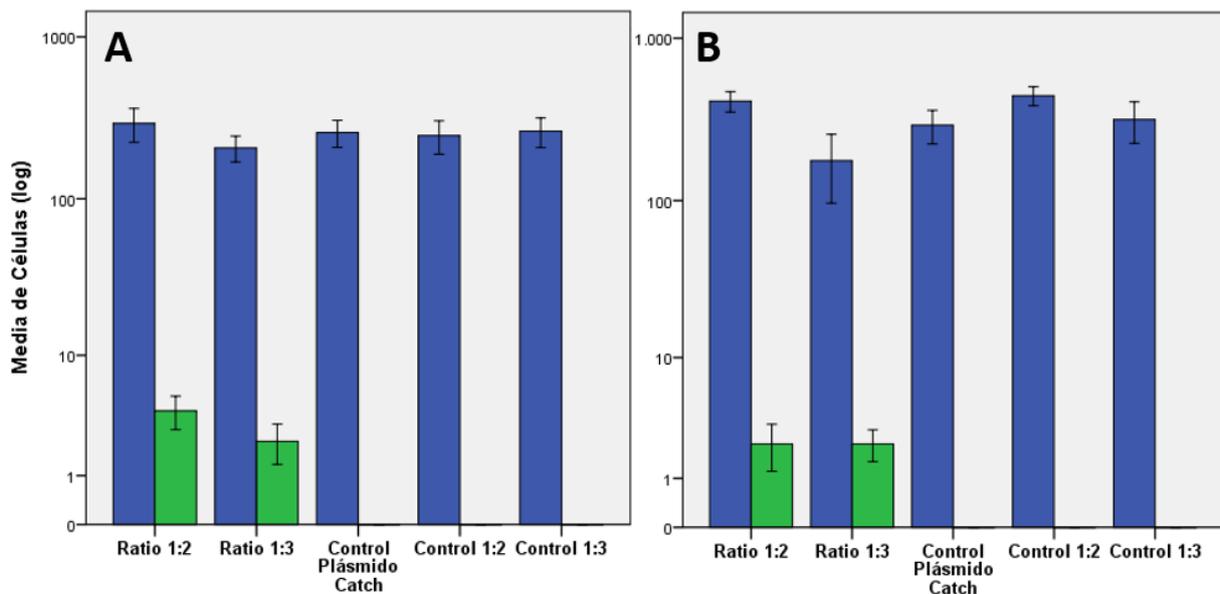


**Figura 9.** Inmunocitoquímica de cultivo primario de corteza transfectado con NeuroMag en un ratio 1:2 (A) y 1:3 (B) de plásmido/magnetopartículas. Se aprecia la expresión de GFP (verde) en las células transfectadas, así como células neuronales que expresan MAP2 (rojo) y los núcleos celulares marcados con Hoechst (Azul). En las imágenes podemos observar dos neuronas en las que la GFP colocaliza con el MAP2 (flechas naranjas), Escala: 50  $\mu$ m



**Figura 10.** Inmunocitoquímica de cultivo primario de retina transfectado con NeuroMag en un ratio 1:2 (A) y 1:3 (B) de plásmido/magnetopartículas. Se aprecia la expresión de GFP (verde) en las células transfectadas, así como células neuronales que expresan MAP2 (rojo) y los núcleos celulares marcados con Hoechst (Azul). Escala: 50  $\mu$ m

Se realizó un conteaje en 12 campos distintos para cada uno de los ratios y controles, y en ellos se contabilizó: células que expresaban GFP, células MAP2 positivas, células GFP-MAP2 positivas y número total de células por campo. Tras usar un test de normalización, se vio que la población no seguía una distribución normal. Sabiendo esto, se usó el test de Kruskal-Wallis para contrastar los diferentes grupos entre sí, y el test de Kolmogorov-Smirnov para ver las diferencias entre pares de grupos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

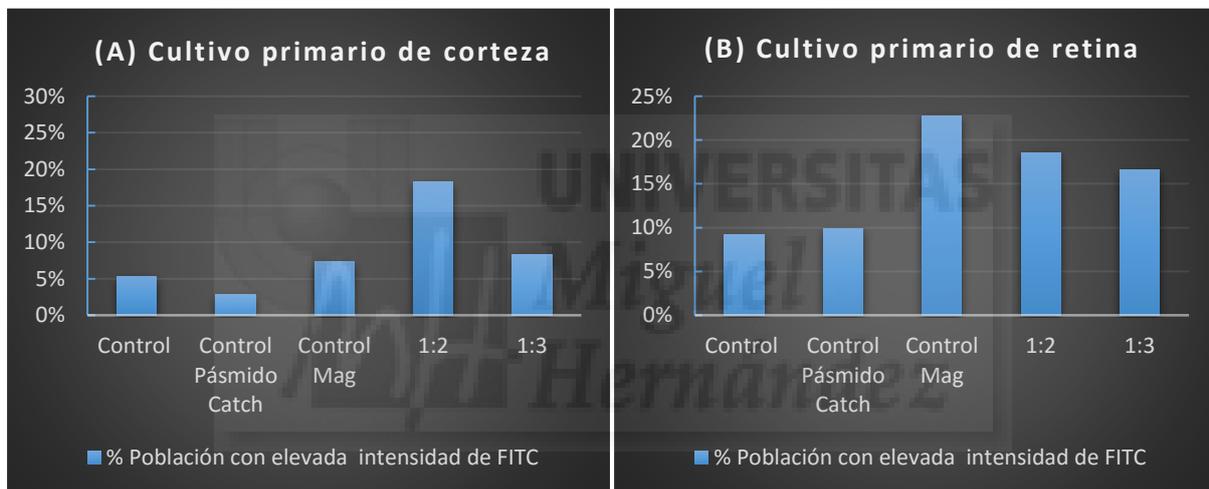


**Figura 11.** Histograma de la media del número de células totales (histogramas azules) y media del número de células transfectadas (histogramas verdes) por muestra, para los cultivos primarios de corteza (A) y retina (B).

Según la representación gráfica de los contajes en las transfecciones de los cultivos primarios de corteza cerebral (Figura 11 A) y de retina (Figura 11 B), el ratio 1:2 presenta mayores tasas de transfección que el 1:3 con respecto a los controles (los datos estadísticos se adjuntan en el Anexo I).

## 2.2. Resultados de la citometría de flujo

Con el fin de verificar los resultados obtenidos mediante la inmunocitoquímica, se realizó un análisis de citometría de flujo en cultivos primarios de corteza y retina transfectados, en los que se usó un ratio de 1:2 y 1:3 plásmido/magnetopartículas. Se usó un filtro FITC-A para medir la fluorescencia de las muestras debido a que se encuentra en el rango de excitación y emisión para detectar la GFP. A continuación, presentamos los resultados obtenidos de dicho análisis.

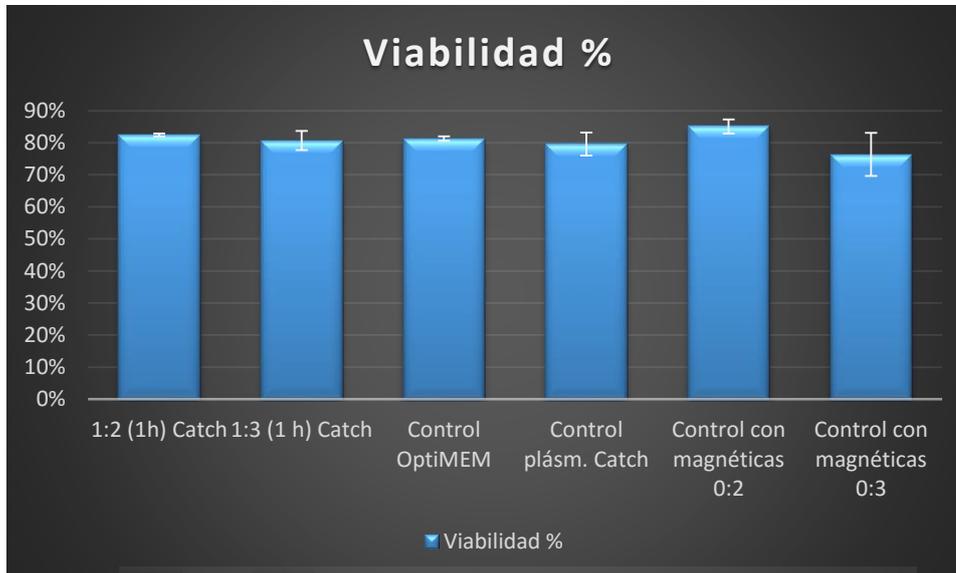


**Gráfica 1.** Representación del porcentaje de población con elevada intensidad de FITC en las transfecciones realizadas en los cultivos primarios de corteza y retina. Se tomaron datos del control sin tratar, el control con el plásmido, el control con las magnetopartículas NeuroMag y las muestras de los cultivos primarios tanto de corteza (A), como de retina (B), para los ratios probados.

Como se muestra en la Gráfica 1, generalmente el porcentaje de población con elevados niveles de intensidad para el FITC es mayor en las muestras transfectadas en comparación con los controles. Además, estos datos corroborarían los obtenidos con los contajes realizados en las inmunocitoquímicas de las transfecciones de cultivos primarios de corteza y retina, ya que el ratio 1:2 aporta mejores resultados que el 1:3.

### 2.3. Resultados del ensayo de viabilidad

Para finalizar con los resultados de los ensayos *in vitro*, presentamos los datos obtenidos del ensayo de viabilidad realizado en el cultivo primario de corteza, recogidos en la Gráfica 2.



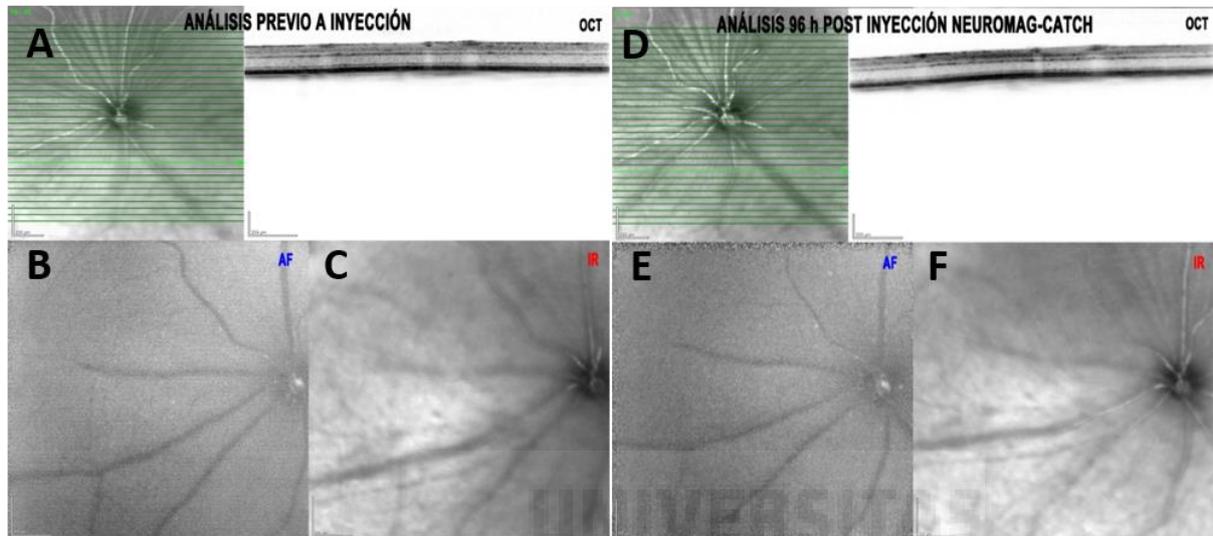
**Gráfica 2.** Representación del porcentaje de viabilidad obtenido en el ensayo de MTT. Se tomaron datos del control sin tratar, el control con el plásmido, el control con las magnetopartículas con ambos ratios y las muestras de las transfecciones en cultivo primario de corteza con ambos ratios.

En cuanto a la viabilidad celular, las magnetopartículas no presentan toxicidad celular ya que la viabilidad celular para los ratios 1:2 y 1:3 no disminuye respecto a los controles. Tampoco se observa una disminución de la viabilidad en las muestras controles tratadas sólo con NeuroMag en proporción 0:2 y 0:3.

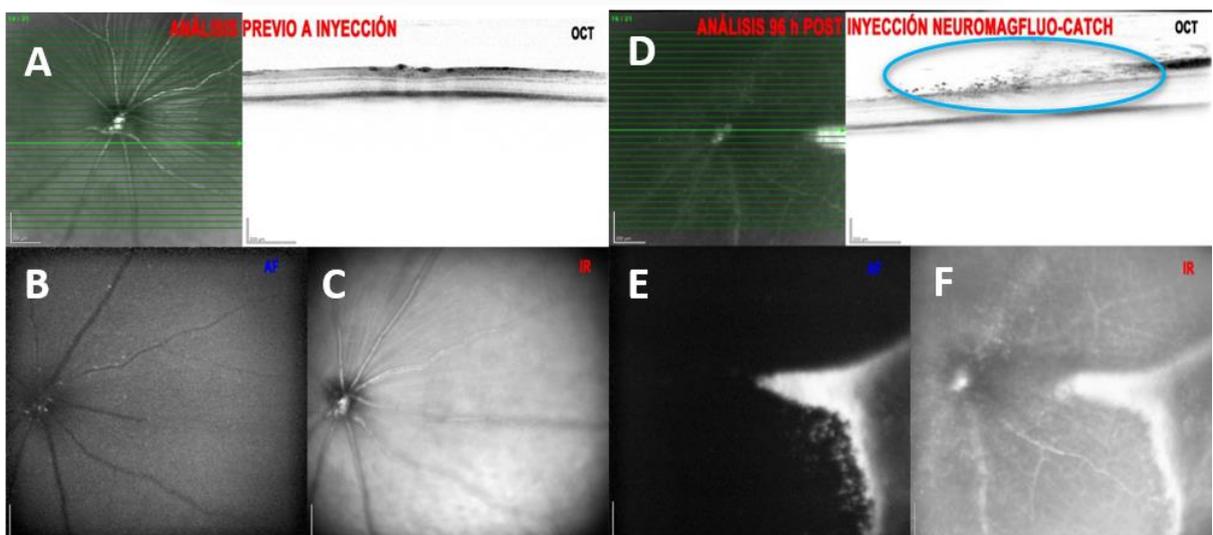
### 3. Ensayos *in vivo*

#### 3.1. Resultados del examen ocular

Como se ha comentado en el apartado 3.1 de la sección de materiales y métodos, se realizaron exámenes oculares a los ratones, previa (Figura 12) y 96 h posteriores (Figura 13) a la transfección, para cerciorarse de que las retinas de dichos animales estaban intactas y que no habían sufrido daño alguno durante el proceso.



**Figura 12.** Análisis del fondo del ojo y de la retina de ratón, mediante tomografía de coherencia óptica laser confocal (Spectralis™ HRA+OCT, Heidelberg Engineering), previo a la inyección (A-C) y tras 96 horas desde la inyección (D-F). En la imagen (A) podemos observar un corte de la retina en buen estado. En la imagen (B) observamos una imagen de autofluorescencia del fondo del ojo y en la imagen (C) una imagen de infrarrojo. No se detecta ningún tipo de alteración ni artefacto en la retina. Las imágenes (D-F) nos muestran que tras la inyección no se ha producido ningún daño o alteración en el fondo del ojo o la retina de los ratones.

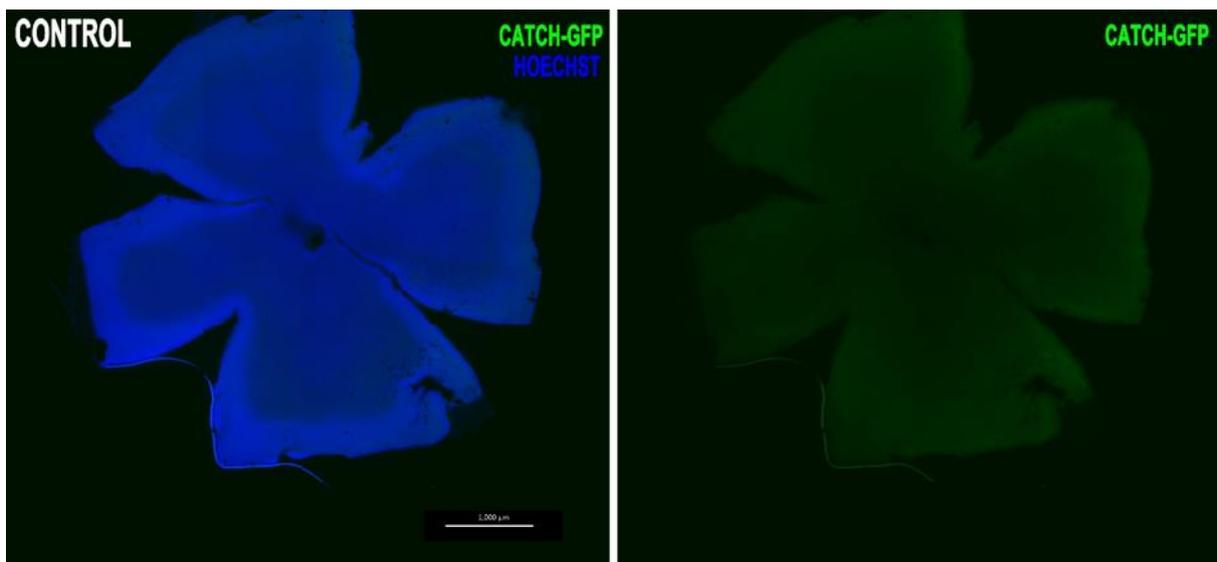


**Figura 13.** Análisis del fondo del ojo y de la retina de ratón, mediante tomografía de coherencia óptica laser confocal (Spectralis™ HRA+OCT, Heidelberg Engineering), previo a la inyección (A-C) y tras 96 horas desde la inyección (D-F). En la imagen (A) podemos observar un corte de la retina en buen estado. En la imagen (B) observamos una imagen de autofluorescencia del fondo del ojo y en la imagen (C) una imagen de infrarrojo. No se detecta ningún tipo de alteración ni artefacto en la retina. En la imagen (D) se aprecian partículas en el vítreo, delimitando con la retina (circulo azul). En las imágenes (E-F) se detecta la autofluorescencia de las partículas FluoMag-N (E), así como su señal en el infrarrojo (F).

En las secciones de retina que observamos en las imágenes de tomografía de coherencia óptica de láser confocal (Figuras 12A, 12D y 13A), comprobamos que las retinas se encuentran en perfecto estado, tanto antes como después de la transfección. Sin embargo, al transfectar con las partículas FluoMag-N (Figura 13 D-F), observamos la aparición de un punteado en la zona más interna de la retina, justo en el borde, lo que nos podría indicar la posible presencia de partículas en esta zona. Además, en las imágenes podemos detectar autofluorescencia (Figura 13-E) y su señal infrarroja (Figura 13-F) en las zonas circundantes a la inyección intravítrea en el lóbulo donde se produce la inyección (Figura 13E) y su señal infrarroja (Figura 13F) en las zonas circundantes a la inyección intravítrea.

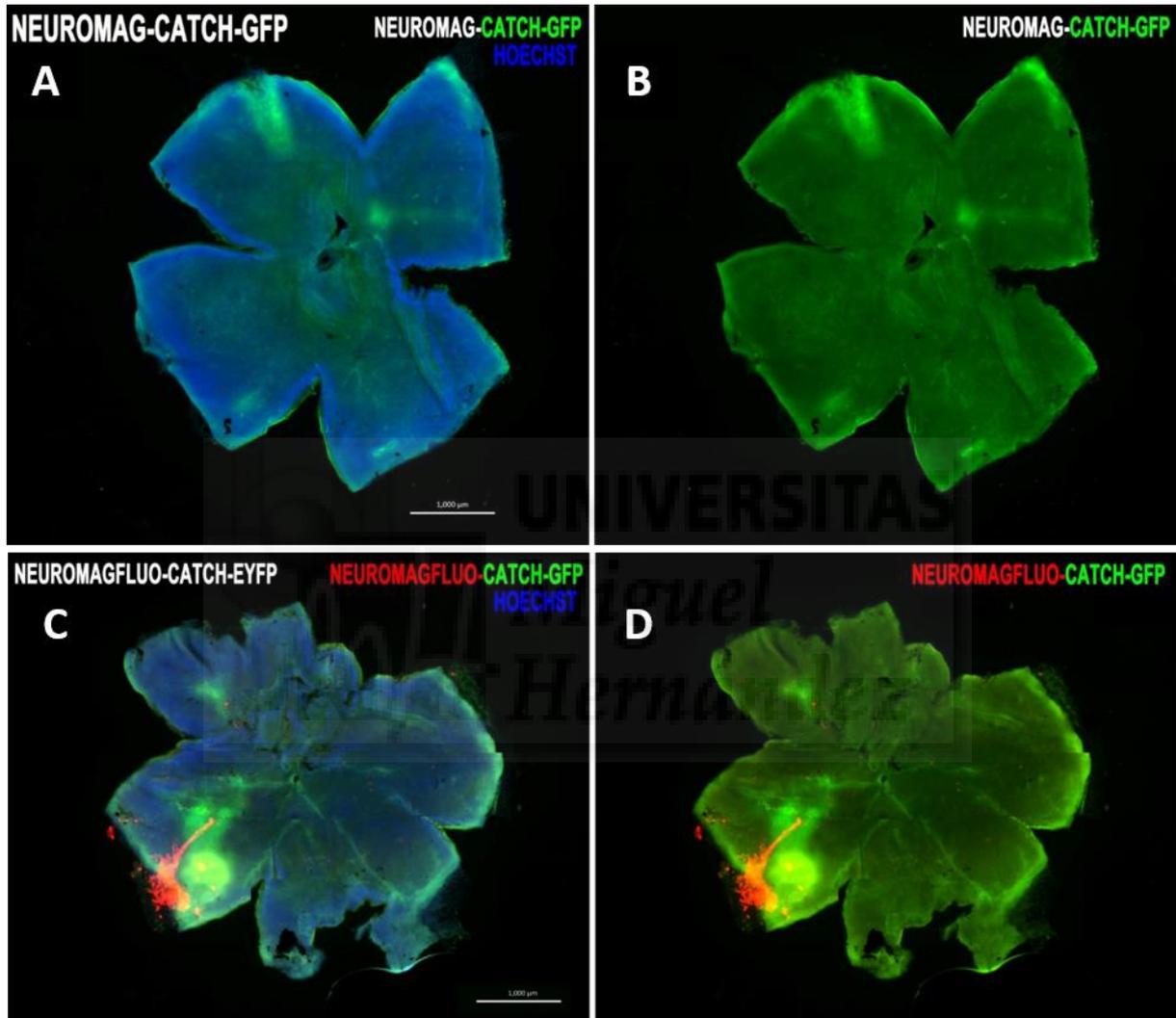
### 3.2. Reconstrucción digital de la retina

Tras realizar las transfecciones con los diversos magnetocomplejos en los ratones, se detectó transfección y por tanto, expresión de la proteína *reporter* GFP en las zonas cercanas donde se había realizado la inyección intravítrea. Se realizó una reconstrucción digital de la retina, con el fin de obtener una confirmación visual más exacta y exhaustiva del proceso de transfección y poder determinar la eficacia del proceso. Para cerciorarnos bien, el primer paso fue realizar un control con el plásmido desnudo. (Figura 14). El plásmido por sí solo no consigue transfectar las células de la retina, ya que no se detecta expresión para la GFP en ninguna zona de la retina, ni siquiera en las zonas circundantes a la inyección.



**Figura 14.** Imagen panorámica de una retina control inyectada con el plásmido que contiene el gen Catch. La imagen de la izquierda contiene la retina y el marcador de núcleos Hoechst, y a la derecha, el canal verde correspondiente a la proteína GFP. Escala: 1000 μm.

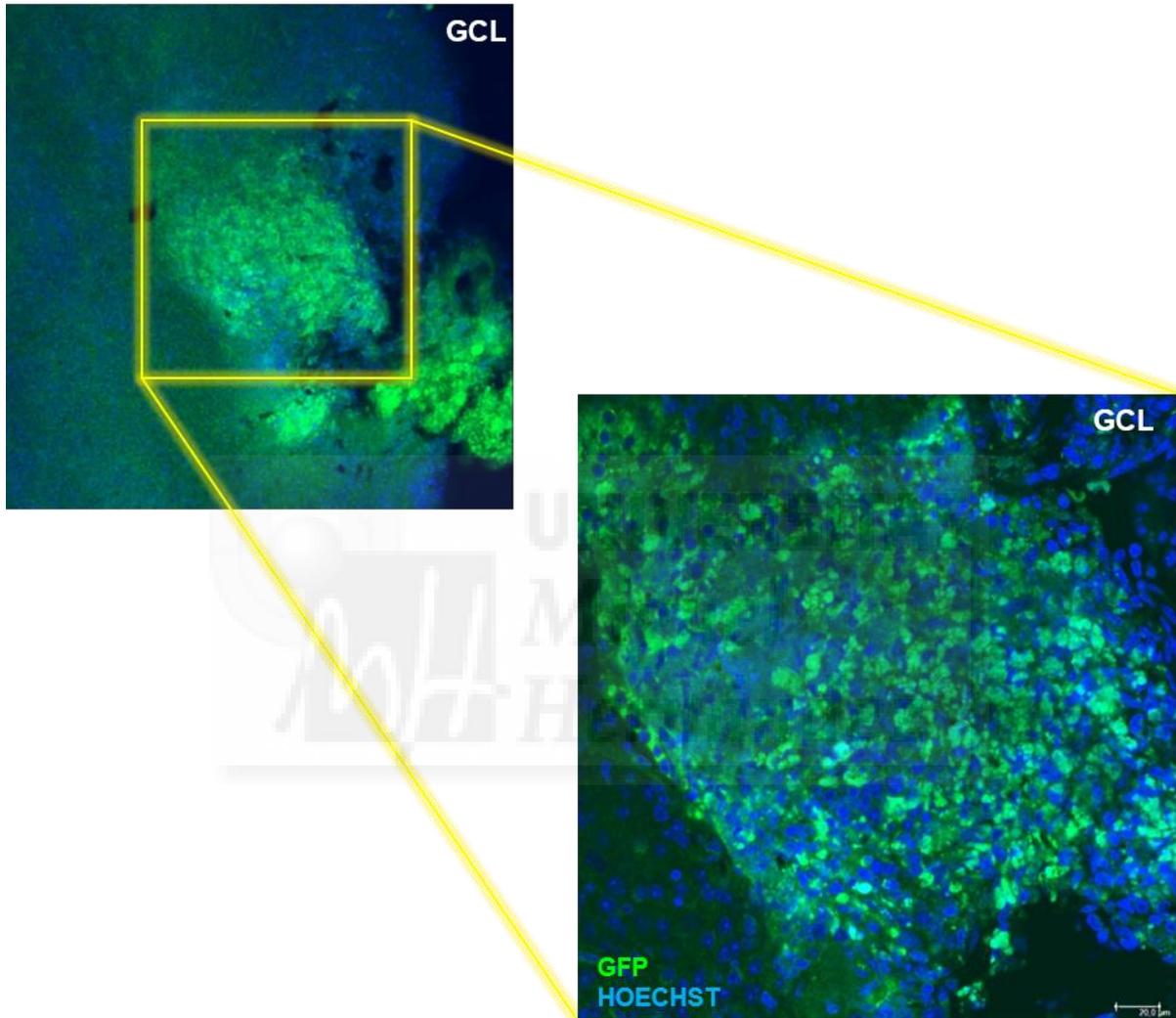
En las retinas inyectadas con los complejos que contenían magnetopartículas NeuroMag (Figura 15A y 15B) y las magnetopartículas FluoMag-N (Figura 15C y 15D) se aprecia la expresión de la proteína GFP en varias zonas de la retina. Esto nos sugiere que el magnetocomplejo difunde desde la zona donde se ha realizado la inyección. Además, en las Figuras 15C y 15D se puede observar con total claridad la señal emitida por las partículas FluoMag-N, lo que nos ayuda a seguir todo el proceso de transfección con mayor facilidad.



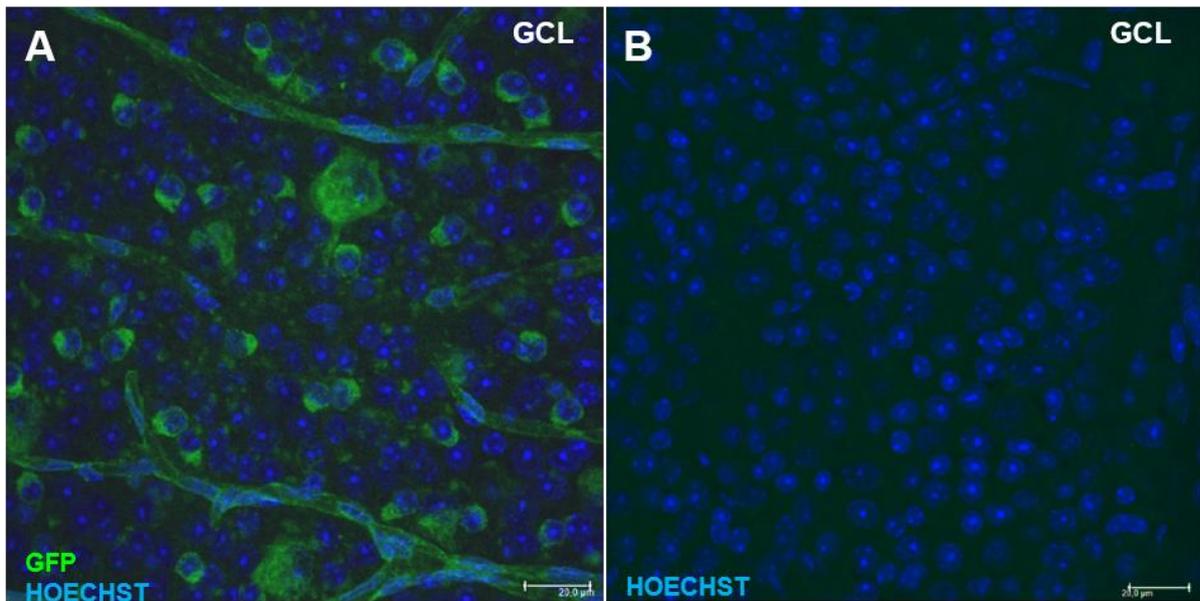
**Figura 15.** Imágenes panorámicas de dos retinas inyectadas con el magnetocomplejo. A-B) Magnetocomplejo formado con las magnetopartículas NeuroMag. C-D) Magnetocomplejo formado por las magnetopartículas FluoMagN. Las imágenes (A) y (C) contienen la retina y el marcador de núcleos Hoechst en el canal azul, mientras que a las (B) y (D), la retina y el canal verde correspondiente a la proteína GFP. Además, en las imágenes C-D) podemos observar la fluorescencia roja emitida por las magnetopartículas FlouMag-N. Escala: 1000 μm.

### 3.3. Resultados de la inmunohistoquímica y de la fluorescencia directa.

Tras la tinción con Hoechst, se analizó la fluorescencia directa de las retinas transfectadas (Figuras 16 y 17). La Figura 16A representa una panorámica de la zona de inyección con NeuroMag, y en la 16B podemos apreciar un detalle de ésta en el que la expresión para la GFP (verde) se localiza principalmente alrededor de los núcleos de las células ganglionares (azul) así como en algunos núcleos localizados en esta capa.



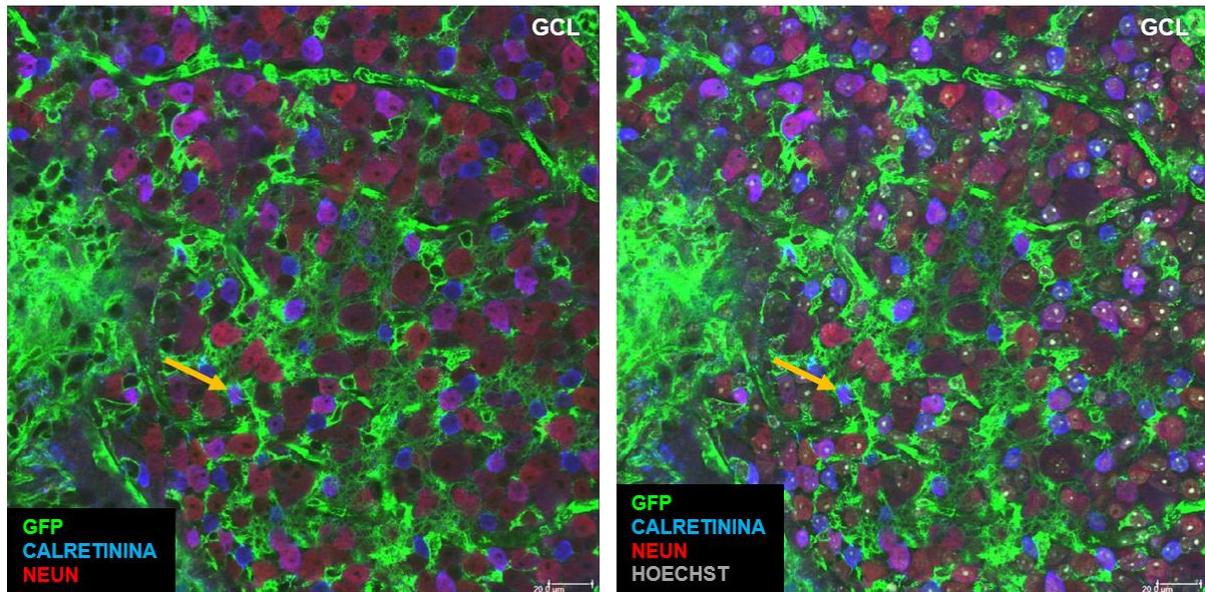
**Figura 16.** Detalle de una retina en wholemout transfectada con NeuroMag en la que se aprecia la expresión de GFP (verde) alrededor y en algunos núcleos de las células ganglionares marcados con Hoechst (azul). Escala: 20  $\mu$ m



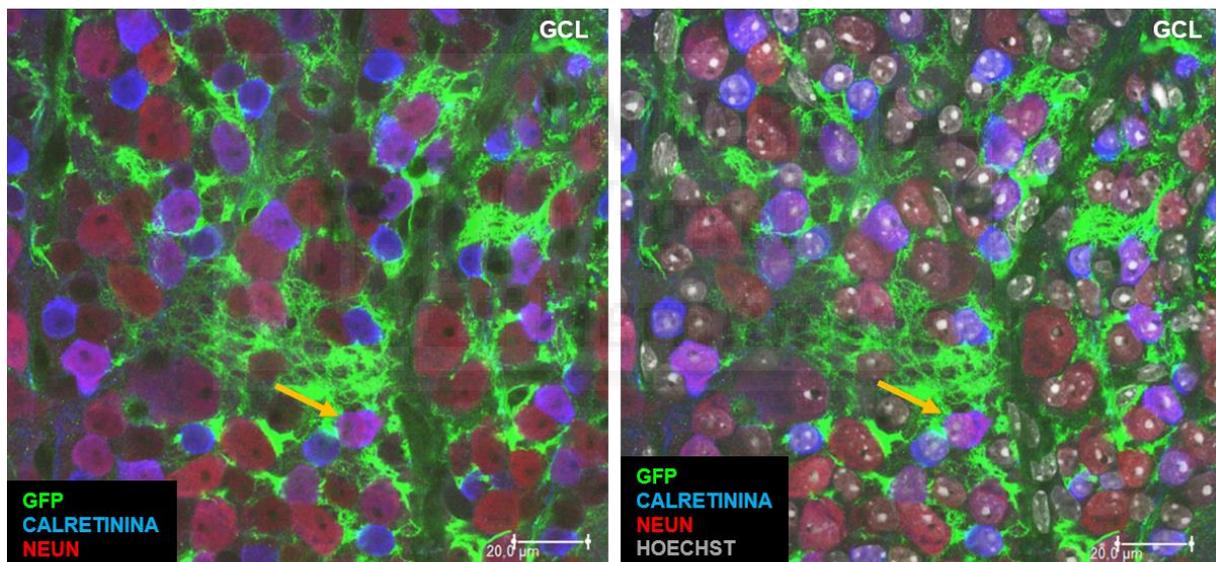
**Figura 17.** Imagen de una retina en wholemount transfectada con FluoMag-N (A) en la que se aprecia la expresión de GFP (verde) alrededor y en algunos núcleos de las células ganglionares marcados con Hoechst (azul), junto con su control negativo (B), transfectado con el plásmido de la catch. Escala: 20  $\mu$ m

En la Figura 17 se muestra una retina transfectada con las magnetopartículas FlouMag-N (A) en la que se aprecia la expresión para la proteína GFP rodeando los núcleos de las células ganglionares. En contraposición, observamos una imagen de una retina transfectada únicamente con el plásmido de la catch (B), constituyendo así su control negativo, donde solo se aprecian los núcleos de las células ganglionares marcados con la tinción de Hoechst.

Adicionalmente, se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica en las retinas enteras empleando un anticuerpo específico contra la GFP y otros específicos para células ganglionares como son el NeuN y la calretinina. Tal y como se muestra en las Figuras 18 y 19, para ambos tipos de magnetopartículas utilizadas en la transfección, se detecta inmunofluorescencia para la GFP (verde). En estas figuras, se aprecia la GFP alrededor de los núcleos de las células ganglionares, así como en algún núcleo de éstas. Dado que en estas retinas a plano se estudia mayoritariamente la capa de células ganglionares, se procedió al estudio de inyecciones de estos magnetocomplejos en secciones verticales de retina.

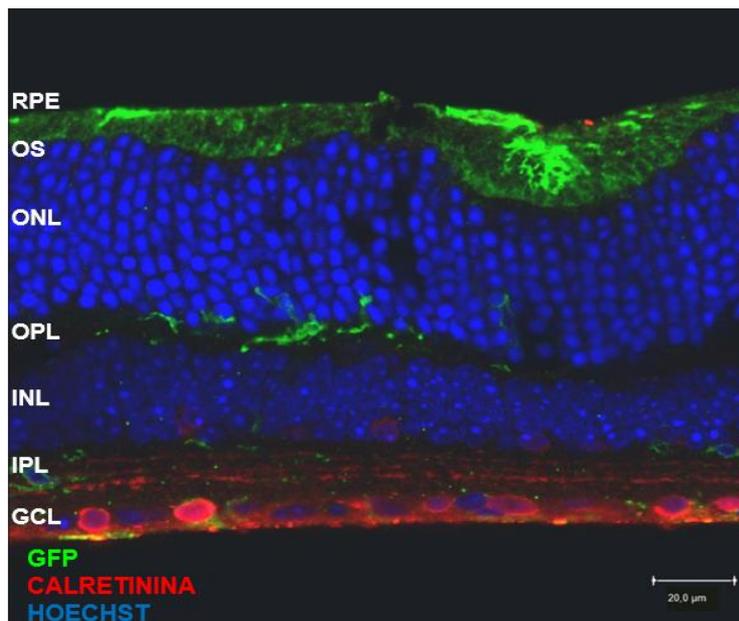


**Figura 18.** Inmunohistoquímica de una retina en wholemount transflectada con NeuroMag en la que se aprecia la expresión de GFP (verde) principalmente alrededor de los núcleos de las células ganglionares que expresan Neun (rojo) y calretinina (azul) (flechas naranjas). Escala: 20  $\mu$ m



**Figura 19.** Inmunohistoquímica de una retina en wholemount transflectada con FluoMag-N en la que se aprecia la expresión de GFP (verde) principalmente alrededor de los núcleos de las células ganglionares que expresan Neun (rojo) y calretinina (azul) (flechas naranjas). Escala: 20  $\mu$ m

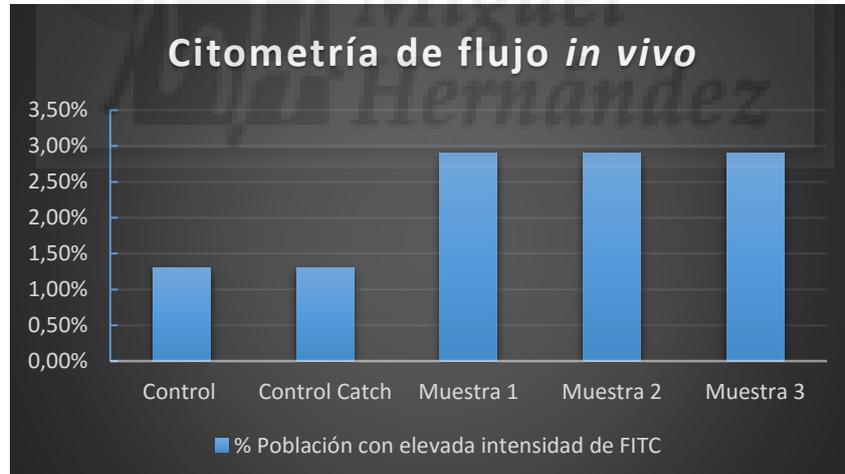
Las figuras anteriores representaban mayormente la capa de células ganglionares, impidiendo determinar con exactitud si se había producido transfección en otras capas. Por tanto, para poder estudiar con más detenimiento la transfección en otras capas de la retina, se analizaron secciones verticales de retinas trasfectadas a las que se les había realizado una inmunohistoquímica contra la GFP (Figura 20). Tras el inmunomarcaje, se apreció expresión para la GFP en los segmentos externos de los fotorreceptores, en la capa nuclear interna, las capas plexiformes y en las células ganglionares, colocalizando con la calretinina.



**Figura 20.** Sección vertical de una retina transfectada. Se puede observar la expresión de GFP en las distintas capas de la retina: segmentos externos de los fotorreceptores, capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa plexiforme interna así como colocalizando con la calretinina (en rojo) en las células ganglionares. RPE: epitelio pigmentario; OS: segmentos externos; ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: células ganglionares. Escala: 20  $\mu$ m.

### 3.4. Resultados de citometría de flujo

Tras 96 h de la inyección intravítrea con los magnetocomplejos, se procedió a la realización de la citometría de flujo. Los datos semicuantitativos obtenidos se reflejan en la gráfica de barras que se muestra a continuación (Gráfica 3).



**Gráfica 3.** Representación del porcentaje de población con elevada intensidad para el FITC en los distintos animales transfectados, en comparación a los controles.

Tal y como se muestra en la Gráfica 3, el porcentaje de población con elevada intensidad para el FITC es relativamente superior en las retinas inyectadas con los magnetocomplejos 1:2 en comparación a las retinas controles inyectadas con el plásmido desnudo o sin éste.

## DISCUSIÓN

Las principales causas de la ceguera están asociados con un mal funcionamiento y/o degeneración de las células de la retina. Por ello, el principal objetivo es desarrollar nuevas terapias para preservar o mejorar la función de la retina. Actualmente, la terapia génica representa la mejor esperanza terapéutica para muchas enfermedades retinianas hereditarias y adquiridas. Las neuronas son células altamente sensibles a cualquier alteración del medio que las rodea, lo que hace que sean extremadamente difíciles de transfectar. Se ha intentado llevar a cabo la transfección mediante vectores virales, pero estos vectores presentan problemas, debido a los efectos biológicos que pueden provocar y el tamaño limitado del inserto. Sin embargo, se ha demostrado que los vectores no virales presentan mayor eficacia a la hora de transfectar y menos efectos adversos.

El objetivo de este trabajo se ha centrado en la transfección *in vitro* e *in vivo* de manera estable del gen que codifica para la proteína Catch, una opsina derivada de la canalrodopsina2, la cual nos permitiría ejercer un control neuronal preciso y estable, mediante el uso de estímulos lumínicos. Debido a la gran sensibilidad de las neuronas, y al gran tamaño del plásmido, se optó por usar vectores no virales, en concreto, nanopartículas magnéticas, que en estudios previos en esta unidad (Soto Sánchez, C. et al. 2015) presentaron una excelente capacidad para transfectar neuronas, reduciendo así los problemas asociados al uso de vectores virales.

Previo a los ensayos *in vitro*, se realizó un examen mediante microscopía electrónica de transmisión que confirmó que el tamaño de las magnetopartículas correspondía con el tamaño comprobado en la bibliografía en el caso de las NeuroMag. Las FluoMag-N mostraron un tamaño (200 nm aproximadamente) y morfología uniforme similar a las NeuroMag. Estos datos revelaron que ambos tipos de magnetopartículas presentaban un tamaño uniforme y óptimo para llevar a cabo la transfección, ya que entra dentro de los rangos de diámetro de las nanopartículas.

La transfección con los magnetocomplejos en los cultivos primarios de retina y corteza resultaron exitosos y por ello, se realizaron técnicas inmunocitoquímicas y se procedió a la cuantificación. Pese a no presentar grandes diferencias significativas, el ratio 1:2 plásmido/magnetopartículas obtenía resultados ligeramente más favorables de transfección frente al ratio 1:3. Tras estos resultados, se decidió llevar a cabo un análisis mediante citometría de flujo, y el resultado obtenido en el ensayo coincide en gran medida con los contajes manuales realizados en la inmunocitoquímica. Las transfecciones realizadas con los ratios 1:2 tanto en corteza como en retina muestran un mayor número de eventos, así como una mayor media de intensidad de fluorescencia en el FITC-A respecto al ratio 1:3. No obstante, estos datos son semicuantitativos y preliminares. Para obtener datos

significativos, se debería de aumentar el número de muestras del ensayo y así valorar la relación entre ambos ratios. Finalmente, el ensayo de viabilidad muestra que las magnetopartículas no presentan toxicidad para las células en cultivo, cumpliendo así dos de los objetivos principales de este proyecto.

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo con el ratio 1:2 plásmido/magnetopartículas ya que resultó más eficaz en los ensayos *in vitro*. Además, para las transfecciones mediante inyección intravítrea en la retina de ratón se utilizaron dos tipos de magnetopartículas NeuroMag y FluoMag-N. Estas últimas emiten fluorescencia roja, lo que nos ha permitido seguir el proceso de transfección *in vivo*. La reconstrucción de las retinas enteras presentó transfección en zonas cercanas a la inyección, pudiendo ver incluso donde se localizaban las magnetopartículas FluoMag-N emitiendo fluorescencia roja. Las técnicas de inmunohistoquímica y la fluorescencia directa en la retinas enteras, mostraron expresión para la GFP principalmente alrededor de los núcleos de las células, así como en otras capas de la retina como la capa nuclear externa e interna o las capas plexiformes en las secciones verticales de retina. Para complementar estos resultados, se realizó un ensayo de citometría de flujo. El porcentaje de población con elevada intensidad para el FITC fue relativamente superior en las retinas inyectadas con los magnetocomplejos 1:2 en comparación a las retinas controles inyectadas con el plásmido desnudo o sin éste. Cabe destacar que los datos obtenidos de la citometría de flujo son semicuantitativos, y habría de aumentar el número de muestras analizadas.

En los exámenes oculares se pudieron detectar partículas en la zona más interna de la retina, así como zonas de autofluorescencia en las zonas cercanas al pinchazo que corresponderían a las partículas magnéticas FluoMag-N, facilitando el seguimiento de las transfecciones. Finalmente cabe recalcar que los exámenes oculares mostraron que las retinas de los ratones no presentaban ningún tipo de lesiones provocadas por la inyección intravítrea del magnetocomplejo, asegurando que es un método seguro y reproducible para la transfección del magnetocomplejo, cumpliendo otro de los objetivos principales de este proyecto.

Todos estos datos constituyen unos resultados preliminares muy prometedores, confirmando la capacidad de estas magnetopartículas para transfectar el sistema visual de los ratones y la capacidad de las células ganglionares y otras células de la retina, para expresar la proteína Catch, sin causar daños al sistema nervioso central, cumpliendo el último de nuestros objetivos.

## CONCLUSIONES

### **Las conclusiones de este trabajo para los ensayos *in vitro* son:**

- ✓ Los resultados de la microscopia electrónica de transmisión demostraron que el tamaño de las partículas magnéticas era uniforme y óptimo para llevar a cabo la transfección.
- ✓ Se ha comprobado la capacidad de transfección de las neuronas en cultivos primarios de corteza y retina mediante el uso de las magnetopartículas junto con el plásmido Catch.
- ✓ Se ha demostrado que la transfección de cultivos primarios de corteza y retina es más eficiente con un ratio 1:2 plásmido/magnetopartículas frente a 1:3.
- ✓ Los resultados de los ensayos de citometría de flujo corroborarían los datos obtenidos mediante los contajes manuales realizados sobre las inmunocitoquímicas en cultivos de corteza y retina transfectados.
- ✓ No se ha observado toxicidad de las magnetopartículas en cultivos primarios mediante un ensayo de viabilidad.

### **Las conclusiones de este trabajo para los ensayos *in vivo* son:**

- ✓ Se ha comprobado la capacidad de transfección en las distintas capas de la retina del sistema visual de roedores, mediante el uso de ambos tipos de magnetopartículas junto con el plásmido Catch.
- ✓ La emisión de fluorescencia roja de las magnetopartículas FluoMag-N ha facilitado en gran medida el seguimiento del proceso de transfección.
- ✓ No se han detectado lesiones oculares provocada por el tratamiento mediante tomografía de coherencia óptica confocal ni síntomas de toxicidad.

Estas conclusiones nos orientan hacia una nueva serie de objetivos a cumplir en estudios futuros. En primer lugar, se debe de aumentar el tamaño muestral para corroborar la fiabilidad de estos resultados. Se deberán realizar también estudios a largo plazo para confirmar la expresión estable de la proteína en la membrana de las neuronas. Este trabajo se ha centrado en el proceso de transfección, que es una gran parte de la optogenética. Sin embargo, una vez que el plásmido se ha insertado y la proteína se expresa, se deberían realizar estudios moleculares para ver la expresión de la proteína de interés así como estudios electrofisiológicos tanto *in vitro* como *in vivo* para comprobar la funcionalidad de las neuronas transfectadas, y comportamentales en animales transfectados.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Bernstein J.G. y Boyden E.S. "Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior". *Trends in Cognitive Sciences*, 2011, 15(12).  
DOI: 10.1016/j.tics.2011.10.003
- 2- Buerli T., Pellegrino C., Baer K., Lardi-Studler B., Chudotvorova I., Fritschy J., Medina I. y Fuhrer C. "Efficient transfection of DNA or shRNA vectors into neurons using magnetofection". *Nature Protocols*, 2012, 2(12):3090-310.  
DOI: 10.1038/nprot.2007.445
- 3- Deisseroth K. "Optogenetics" *Nature Methods*, 2011, 8(1):26-29.  
DOI: 10.1038/nmeth.f.324
- 4- Fernández E. "Retinosis Pigmentaria: Preguntas y Respuestas". 2007
- 5- Gallego A. "Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina". *Vision Research, Volume 11, Supplement 3, 1971, Pages 33–50, IN13–IN24*, 2003, 7(3).  
DOI: 10.1016/0042-6989(71)90029-0
- 6- Hao Yin, Rosemary L. Kanasty, Ahmed A. Eltoukhy, Arturo J. Vegas, J. Robert Dorkin and Daniel G. Anderson. "Non-viral vectors for gene-based therapy" *Nature Reviews Genetics* 4, 2014, 14(7).  
DOI: 10.1038/nrg3763
- 7- Marcos S., Jaén A., González D., Andreu S., Avilés M. y Fernández E. "Transdiferenciación de células mesenquimales del tejido adiposo: hacia una terapia celular para enfermedades degenerativas de la retina". *Trauma Fund MAPFRE Vol 19 nº3:183-190*, (2008)
- 8- Kleinlogel S., Feldbauer K., Dempski R. E., Fotis H., Wood P. G., Bamann C. and Bamberg E. "Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca<sup>2+</sup>-permeable channelrhodopsin Catch." *Nature Neurosciences*, 2013, 13(3).  
DOI: 10.1038/nn.2776
- 9- Kolb H. "How the Retina Works". *American Scientist, Volume 91*. 2004.
- 10- Mattis J., Tye K.M., Ferenczi E.A., Ramakrishnan C., O'Shea D.J. "Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins". *Nature Methods* 9, 2011.
- 11- Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., Ollig D., Hegemann P., and Bamberg E. "Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel". *PNAS*, 2003, 25(11).

- 12- Otaegi García, G. 2006. Rutas de señalización moduladoras de proliferación y diferenciación en células madre y precursoras neurales. Tesis Dr. Universidad Complutense de Madrid, Madrid. DOI:10.1038/mt.2011.115
- 13- Pan Z., Ganjawala T.G., Lu Q., Ivanova E. and Zhang Z. "ChR2 Mutants at L132 and T159 with Improved Operational Light Sensivity for Vision Resauration". PLoS ONE 9(6): e98924.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0098924
- 14- Puras G., Martínez-Navarrete G., Mashal M., Zarate J., Agirre M., Ojeda E., Grijalvo S., Eritja R., Diaz-Tahoces A., Avilés-Trigueros M., Fernández E. and Pedraz J. L. "Protamine/DNA/Niosome Ternary Nonviral Vectors for Gene Delivery to the Retina: The Role of Protamine". *Molecular Pharmaceutics*, 2015, 3(9).  
DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00422
- 15- Rodieck R. "The vertebrate retina: Principles of structure and function. W". [Book]Oxford, England: W. H. (1973).
- 16- Soto-Sánchez C., Martínez-Navarrete G., Humphreys L., Puras G., Zarate J., Pedraz J.L and Fernández E. "Enduring high-efficiency in vivo transfection of neurons with non-viral magnetoparticles in the rat visual cortex for optogenetic applications". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015, 11:835–843.  
DOI:/10.1016/j.nano.2015.01.012
- 17- Strauss O., "The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function". *Physiol Rev* 85: 845–881, 2005;  
DOI:10.1152/physrev.00021.2004.
- 18- Thomas C.E., Ehrhardt A. and Kay M.A. "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy" *Nature Reviews Genetics* 4, 2003, (5).  
DOI: 10.1038/nrg1066
- 19- Yizhar O., Fenno L.E., Davidson T.J, Mogri M, and Deisseroth K. "Optogenetics in Neural Systems". *Neuron*, 2011, 71:9-34.  
DOI: 10.1016/j.neuron.2011.06.004
- 20- Zhang F., Li-Ping W., Boyden E. S. and Deisseroth K. "Channerhodopsin-2 and optical control of excitable cells". *Nature Methods*, 2006, 21(9).  
DOI: 10.1038/NMETH936
- 21- [www.ozbiosciences.com](http://www.ozbiosciences.com)
- 22- <http://www.webvision.med.utah.edu>
- 23- <http://anatomiadelojo.blogspot.com.es/2008/05/globo-ocular.html>
- 24- <https://sqonline.ucsd.edu/2014/04/bioengineering-of-the-future-optogenetics/>

## ANEXO I

### Resultados estadísticos de los contajes manuales en cultivos primarios de corteza

#### Prueba de Normalidad

##### Resumen de procesamiento de casos

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
DIVISION	60	100,0%	0	0,0%	60	100,0%

##### Descriptivos

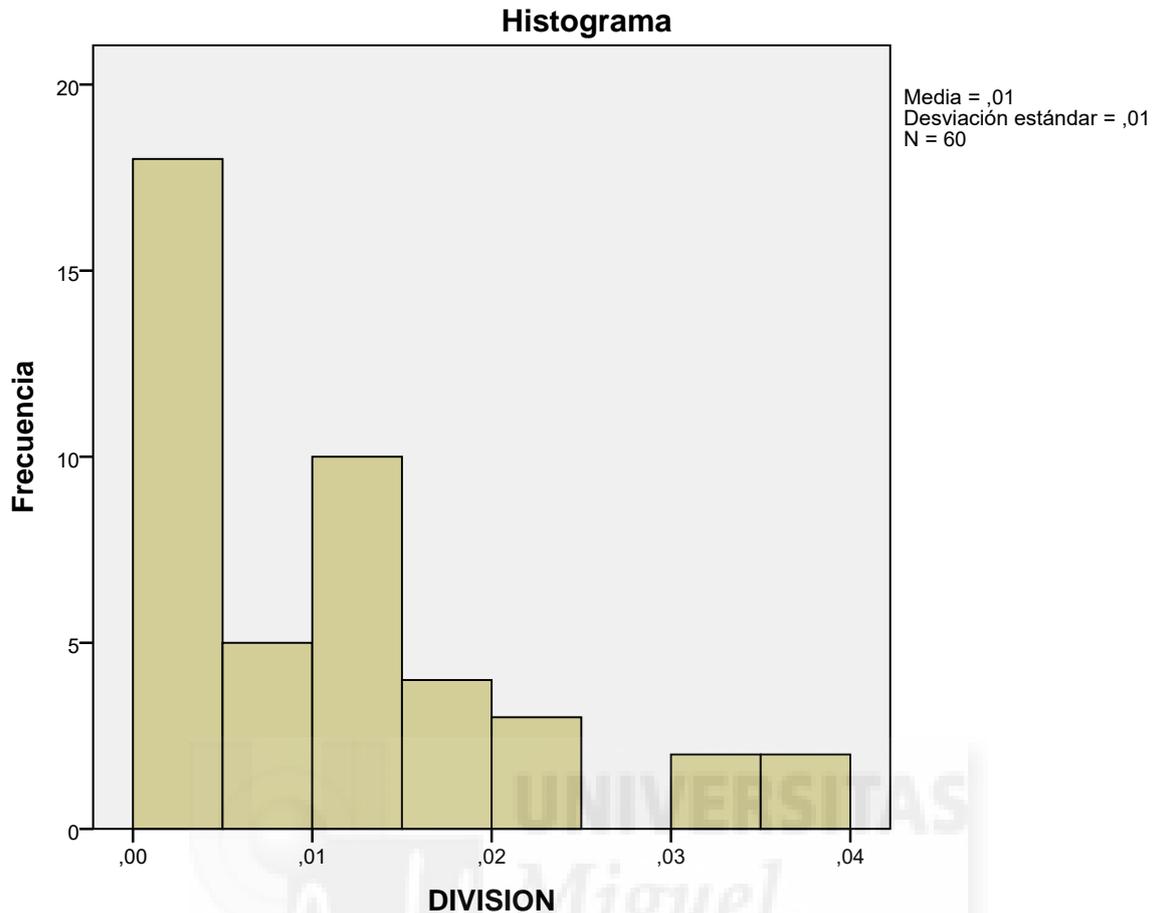
		Estadístico	Error estándar
DIVISION	Media	,0100	,00157
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	,0068 ,0132
	Media recortada al 5%	,0091	
	Mediana	,0088	
	Varianza	,000	
	Desviación estándar	,01043	
	Mínimo	,00	
	Máximo	,04	
	Rango	,04	
	Rango intercuartil	,02	
	Asimetría	1,099	,357
	Curtosis	,685	,702

##### Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DIVISION	,169	60	,003	,86	60	,00

a. Corrección de significación de Lilliefors

## DIVISION



## Pruebas NPar

### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DIVISION	60	,0100	,01043	,00	,04
ID	60	3,27	2,991	1	9

## Prueba de Kruskal-Wallis

### Rangos

ID	N	Rango promedio
DIVISION Ratio 1:2	24	30,31
Ratio 1:3	24	25,94
Control Plásmido Catch	4	7,50
Control 1:2	4	7,50
Control 1:3	4	7,50
Total	60	

### Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>

	DIVISION
Chi-cuadrado	24,206
gl	4
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DIVISION	60	,0100	,0104	,0	,04
ID	60	3,2	2,9	1	9

## Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

### Frecuencias

ID	N
DIVISION Ratio 1:2	24
Ratio 1:3	24
Total	48

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

		DIVISION
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,313
	Positivo	,125
	Negativo	-,313
Z de Kolmogorov-Smirnov		,884
Sig. asintótica (bilateral)		,415

a. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DIVISION	60	,0100	,01043	,00	,04
ID	60	3,	2,9	1	9

## Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

### Frecuencias

ID	N
DIVISION Ratio 1:2	24
Control Plásmido Catch	4
Total	28

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

		DIVISION
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,938
	Positivo	,000
	Negativo	-,938
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,677
Sig. asintótica (bilateral)		,007

a. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DIVISION	60	,0100	,01043	,00	,04
ID	60	3,2	2,99	1	9

## Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

### Frecuencias

ID	N
DIVISION Ratio 1:2	24
Control 1:2	4
Total	28

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

		DIVISION
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,938
	Positivo	,000
	Negativo	-,938
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,677
Sig. asintótica (bilateral)		,007

a. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DIVISION	60	,0100	,01043	,00	,04
ID	60	3,27	2,99	1	9

## Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

### Frecuencias

ID	N
DIVISION Ratio 1:3	24
Control Plásmido Catch	4
Total	28

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

		DIVISION
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,938
	Positivo	,000
	Negativo	-,938
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,677
Sig. asintótica (bilateral)		,007

a. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DIVISION	60	,0100	,01043	,00	,04
ID	60	3,27	2,991	1	9

## Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

### Frecuencias

ID	N
DIVISION Ratio 1:3	24
Control 1:3	4
Total	28

**Estadísticos de prueba<sup>a</sup>**

		DIVISION
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,938
	Positivo	,000
	Negativo	-,938
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,677
Sig. asintótica (bilateral)		,007

a. Variable de agrupación: ID



## Resultados estadísticos de los contajes manuales en cultivos primarios de retina

### Prueba de normalidad

#### Resumen de procesamiento de casos

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
DIVISIÓN	60	100,0%	0	0,0%	60	100,0%

#### Descriptivos

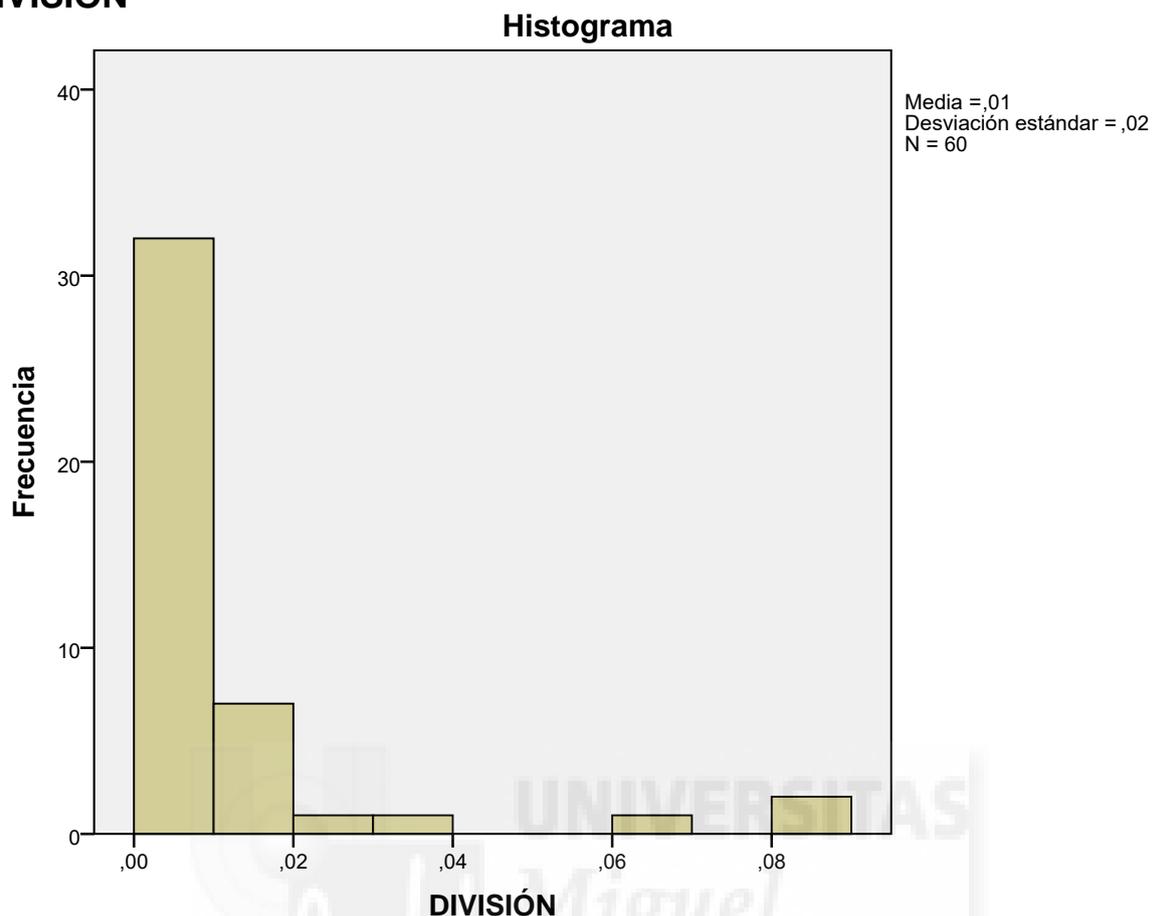
		Estadístico	Error estándar
DIVISIÓN	Media	,0103	,00296
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	,0044 ,0163
	Media recortada al 5%	,0069	
	Mediana	,0036	
	Varianza	,000	
	Desviación estándar	,01966	
	Mínimo	,00	
	Máximo	,09	
	Rango	,09	
	Rango intercuartil	,01	
	Asimetría	3,072	,357
	Curtosis	9,250	,702

#### Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DIVISIÓN	,299	60	,000	,542	60	,00

a. Corrección de significación de Lilliefors

## DIVISIÓN



## Pruebas NPar

### Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
DIVISIÓN	60	,0103	,01966	,00	,09
ID	60	3,27	2,991	1	9

## Prueba de Kruskal-Wallis

### Rangos

ID	N	Rango promedio
DIVISIÓN Ratio 1:3	24	32,25
Ratio 1:2	24	23,63
Control Plásmido Catch	4	8,00
Control 1:2	4	8,00
Control 1:3	4	8,00
Total	60	

### Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>

	DIVISIÓN
Chi-cuadrado	25,644
gl	4
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

#### Frecuencias

ID	N
DIVISIÓN Ratio 1:2	24
Ratio 1:3	24
Total	48

#### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

	DIVISIÓN	
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,500
	Positivo	,500
	Negativo	-,063
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,414	
Sig. asintótica (bilateral)	,037	

a. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

#### Frecuencias

ID	N
DIVISIÓN Ratio 1:2	24
Control Plásmido Catch	4
Total	28

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

		DIVISIÓN
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,938
	Positivo	,000
	Negativo	-,938
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,677
Sig. asintótica (bilateral)		,007

a. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

#### Frecuencias

ID	N
DIVISIÓN Ratio 1:2	24
Control 1:2	4
Total	28

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

		DIVISIÓN
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,938
	Positivo	,000
	Negativo	-,938
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,677
Sig. asintótica (bilateral)		,007

a. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

#### Frecuencias

ID	N
DIVISIÓN Ratio 1:3	24
Control Plásmido Catch	4
Total	28

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

		DIVISIÓN
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,875
	Positivo	,000
	Negativo	-,875
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,565
Sig. asintótica (bilateral)		,015

a. Variable de agrupación: ID

## Pruebas NPar

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras

#### Frecuencias

ID	N
DIVISIÓN Ratio 1:3	24
Control 1:3	4
Total	28

### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

		DIVISIÓN
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,875
	Positivo	,000
	Negativo	-,875
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,565
Sig. asintótica (bilateral)		,015

a. Variable de agrupación: ID