



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**“NANOSISTEMAS PARA TERAPIA GÉNICA
OCULAR. SEGMENTO ANTERIOR DEL OJO”**

Autor: Claudia Domínguez Moscardó

Fecha: Julio 2020

Tutor: Irene Bravo Osuna

RESUMEN

En el tratamiento de las enfermedades del segmento anterior del ojo se emplean generalmente colirios y otras formas farmacéuticas tópicas, debido principalmente a la facilidad de uso de las mismas. Sin embargo, el escaso tiempo de permanencia de la formulación en la superficie ocular y la baja permeabilidad corneal que presentan la mayoría de las sustancias activas dan lugar a una baja biodisponibilidad tras la administración tópica ocular. Todo ello lleva a la necesidad de diseñar nuevos sistemas de administración que carezcan de estas limitaciones. Los nanosistemas surgen como una importante alternativa a las formulaciones convencionales, presentando múltiples ventajas en la administración tópica oftálmica. Al mismo tiempo, los nanosistemas son vectores adecuados para la terapia génica: protegen el material genético y posibilitan su liberación de manera específica y segura. El ojo es un órgano diana ideal para la terapia génica, por lo que esta se consolida como un enfoque terapéutico de gran interés en el tratamiento de las enfermedades oculares.

Palabras clave: nanosistemas, nanotecnología, sistemas de liberación de fármacos, terapia génica ocular, segmento anterior

ABSTRACT

Generally, when treating diseases affecting the anterior segment of the eye eyedrops and other topical pharmaceutical solutions are used, given their good tolerance and ease of use. Nevertheless, the short timespan in which the formula remains on the ocular surface, and the low corneal permeability that most of the active ingredients give way to a low bioavailability after topical ocular application. This generates the need to design new means of administration that are not subject to these limitations. Thus, nanosystems emerge as an important alternative to conventional formulations, providing multiple advantages in topical ophthalmic application. At the same time, nanosystems are adequate carriers for gene therapy: they protect genetic material and enable it to be liberated in a targeted and safe manner. The eye is an ideal target for gene therapy, reason to why the insertion of this therapy is being consolidated as a very interesting therapeutic approach to treating eye diseases.

Key words: nanosystem, nanotechnology, drug delivery systems, ocular gene therapy, anterior segment

INTRODUCCIÓN

El ojo es el órgano de la visión. Esta estructura única y compleja se divide en dos segmentos, anterior y posterior. El segmento anterior constituye una fracción pequeña del ojo, aproximadamente el primer tercio frontal del mismo, y comprende la pupila, la córnea, el iris, el cuerpo ciliar y el cristalino. Un fluido, el humor acuoso, llena dicho segmento. Por su parte, el segmento posterior se compone de la retina, la coroides, la mácula, y el humor vítreo, y representa los dos tercios restantes del globo ocular. (1) En este trabajo nos centraremos exclusivamente en el segmento anterior del ojo.

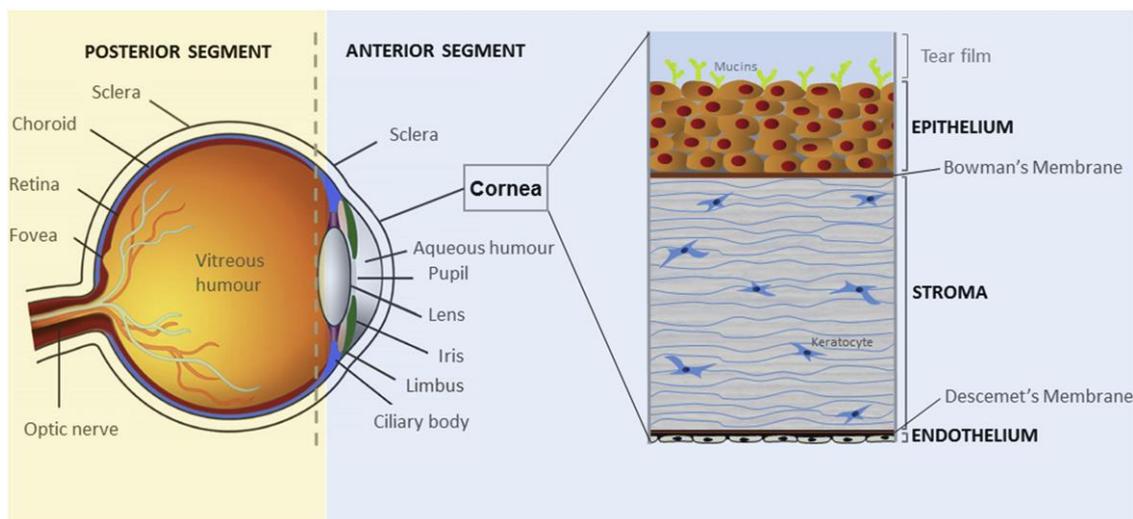


Fig. 1. Estructura del ojo y capas de la córnea (2)

Los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades que afectan al segmento anterior se administran principalmente por vía tópica mediante colirios, pomadas oftálmicas, aerosoles... Esta vía es muy poco invasiva y permite que sea el propio paciente quien se administre el medicamento. Lo ideal sería que el fármaco alcanzase el sitio deseado en una concentración suficiente y se mantuviese el tiempo necesario para ejercer su acción terapéutica. No obstante, se estima que solo entre un 1 y un 7% de la dosis administrada llega al humor acuoso. Por tanto, el número de administraciones diarias requeridas para mantener concentraciones terapéuticas es elevado, lo que puede conllevar un bajo cumplimiento terapéutico y causar posibles efectos tóxicos a nivel sistémico, como se explicará a continuación. (3,4)

La baja biodisponibilidad ocular de las formulaciones tópicas se debe, aparte de a ciertas características del principio activo, a que una serie de mecanismos y barreras preservan la integridad del ojo. El parpadeo, la película lagrimal y la estructura de la córnea, entre otros factores, confieren protección frente a agentes extraños, limitando su entrada y promoviendo su eliminación.

La primera barrera a la que se enfrentan los fármacos es la película lagrimal precorneal, que consiste en una capa externa lipídica, una capa intermedia acuosa y más gruesa, y una capa interna constituida por mucinas. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular que contribuyen a mantener la película lagrimal sana. En función de sus características se clasifican en dos categorías: mucinas secretadas, que lubrican la superficie ocular, y mucinas asociadas a membrana, que forman una cubierta sobre la superficie ocular, conocida como glicocálix,

esencial para prevenir la desecación del ojo y la adhesión e invasión bacteriana. Tras la instilación, la solución se disuelve en la película precorneal para poder ejercer su acción terapéutica. Sin embargo, un porcentaje elevado del fármaco no llega al interior del ojo: la película lagrimal se restaura en unos 2-3 minutos y la solución es eliminada rápidamente de la superficie ocular. Además, la instilación tópica promueve el parpadeo y el drenaje de la solución a través del conducto nasolagrimal. En consecuencia, el fármaco puede pasar al torrente circulatorio y producir efectos adversos a nivel sistémico. (3-6)

El fármaco que no es retirado de la superficie ocular y consigue atravesar la película precorneal debe atravesar seguidamente la córnea. Este tejido transparente y avascular está compuesto por distintas capas que suponen otra de las barreras que dificultan el acceso del fármaco al humor acuoso. El epitelio y el endotelio, que son la capa exterior e interior respectivamente, son de naturaleza lipídica e impiden el paso de fármacos hidrófilos. La capa intermedia, denominada estroma, tiene un elevado contenido acuoso y constituye un obstáculo para la difusión de fármacos lipófilos. (7)

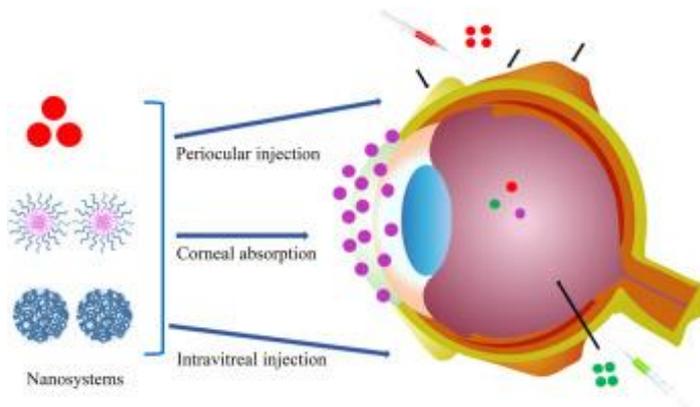


Fig. 2. Administración ocular de nanosistemas (8)

En aras de solventar los problemas derivados del uso de las formas farmacéuticas convencionales, una estrategia prometedora es el desarrollo de nanosistemas, mediante los cuales es posible llevar el fármaco a su lugar de acción utilizando un vector. La vectorización se basa en la incorporación de un fármaco en una estructura que, al alcanzar la diana terapéutica, libera la sustancia activa que contiene. De esta manera se consigue obviar en parte las barreras ya mencionadas y mejorar la biodisponibilidad ocular. (9)

En la última década, se han estudiado numerosas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas de los nanosistemas. Una de ellas es la terapia génica, consistente en introducir material genético en determinadas células o tejidos con el fin de tratar enfermedades. El ojo, dada su accesibilidad, es una de las dianas más apropiadas para este tipo de terapia. (10,11)

OBJETIVOS

Los objetivos de esta revisión bibliográfica son los que se exponen a continuación:

- Explicar en qué consiste la terapia génica y la importancia del uso de vectores para incorporar el material genético, así como las características que convierten al ojo en una diana ideal para la terapia génica.
- Determinar la utilidad y las ventajas de los nanosistemas en la administración tópica ocular de fármacos y material genético.
- Conocer el estado actual y cuáles son las perspectivas de futuro de la aplicación de nanosistemas en la terapia génica de enfermedades que afectan al segmento anterior del ojo.

METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo la búsqueda de material bibliográfico en distintas bases de datos, como PubMed, Elsevier-ScienceDirect, UpToDate y Google Académico. Como criterio de búsqueda se introdujeron términos como “ocular gene therapy”, “nanosystems”, “ocular drug delivery”, etc., seleccionando artículos lo más recientes posible y, entre estos, aquellos que más se adecuaban a los objetivos del trabajo. También se han consultado libros disponibles en la biblioteca de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Terapia génica

El tratamiento de enfermedades con terapia génica está avanzando rápida y considerablemente. En comparación con los fármacos convencionales, el material genético tiene una mayor duración de acción y es más específico, pudiendo ser liberado en el sitio diana mediante vectores virales y no virales. (12) El ojo es un órgano de elección para terapia génica local: el volumen de tejido que se trata es pequeño, la concentración terapéutica necesaria es relativamente baja y los productos activos apenas difunden a la circulación. (13) Estas y otras ventajas explican el auge de la terapia génica ocular, así como el estudio de los distintos vectores en los que se puede cargar y vehiculizar el material genético que se desea liberar en un determinado tejido ocular.

- **Generalidades**

La terapia génica es la introducción y liberación de material genético exógeno (conocido como transgén), natural o recombinante, en una célula para añadir, eliminar, corregir, silenciar o reemplazar un gen dando lugar a un beneficio terapéutico. La expresión del material genético introducido, aprovechando la maquinaria de transcripción y traducción de la célula huésped, restaura la función celular normal y revierte la deficiencia causada por el gen defectuoso. (10,11) Se puede introducir una copia sana del gen dañado que lo sustituya o lo repare, o un gen capaz de inducir el efecto deseado o una actividad que produzca dicho efecto. (14)

Atendiendo a la estrategia utilizada, la transferencia génica, también denominada transfección o transducción, puede ser *in vivo*, si el material genético se introduce directamente en las células en el interior del organismo, sin previa extracción ni manipulación de las mismas, o *ex vivo*, si las células del paciente son extraídas y aisladas, se dejan crecer en un cultivo para la posterior transferencia *in vitro* del material genético y,

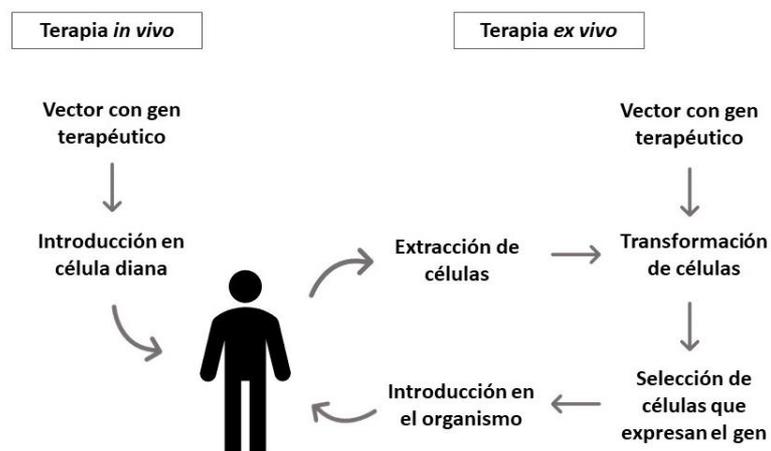


Fig. 3. Tipos de terapia génica según el lugar en el que se manipula la célula diana

finalmente, son reintroducidas en el paciente. (15) La elección de la estrategia depende de factores como la facilidad de transfección de los genes en las células, habilidad para llegar al tejido diana y rasgos fisiológicos del mismo, respuesta frente al método de transfección, etc. (16) Por otro lado, la terapia génica es germinal cuando el defecto genético corregido afecta a óvulos o espermatozoides y, por tanto, se transmite a la descendencia, y somática, cuando la corrección se realiza en cualquier otro tipo de célula. (17)

Los métodos más comúnmente utilizados en este tipo de terapia son: a) adición genética (incorporación de un gen que no está relacionado con la fisiopatología de la enfermedad, pero cuyo producto tiene un efecto beneficioso sobre la misma); b) corrección génica (se libera la secuencia correcta de un gen con objeto de inducir la recombinación homóloga y la reparación del gen mutado en su *locus*); c) reemplazo genético (un gen que ha perdido su función por una mutación es reemplazado por una copia sana); y d) silenciamiento genético (el gen o ácido nucleico liberado inhibe la expresión de un gen cuya función se ha visto alterada). (10,18)

Como material genético se utilizan copias de ADN complementario (obtenidas a partir de ARN mensajero; codifican proteínas de interés terapéutico), oligodesoxinucleótidos antisentido (inhiben la expresión génica tras hibridarse a la cadena complementaria codificadora de ARN en el interior celular), ribozimas (moléculas de ARN que catalizan la escisión específica de otras moléculas de ARN, produciendo un ARN mensajero incompleto e inestable que inhibe la expresión proteica), iRNA o interferencia por ARN (forma de silenciamiento génico postranscripcional cuyas funciones son la defensa frente a ácidos nucleicos foráneos y la regulación génica), siRNA o ARN interferentes pequeños (regulan la expresión de genes individuales), etc. (11,19)

- **Vectorización**

La vectorización se define como la liberación selectiva de un agente terapéutico, en este caso material genético, en aquellos órganos, tejidos o células en los que se requiere su actividad farmacológica. Los vectores son indispensables para el proceso de transferencia génica, influyendo en gran medida en la eficiencia transfectiva. (16)

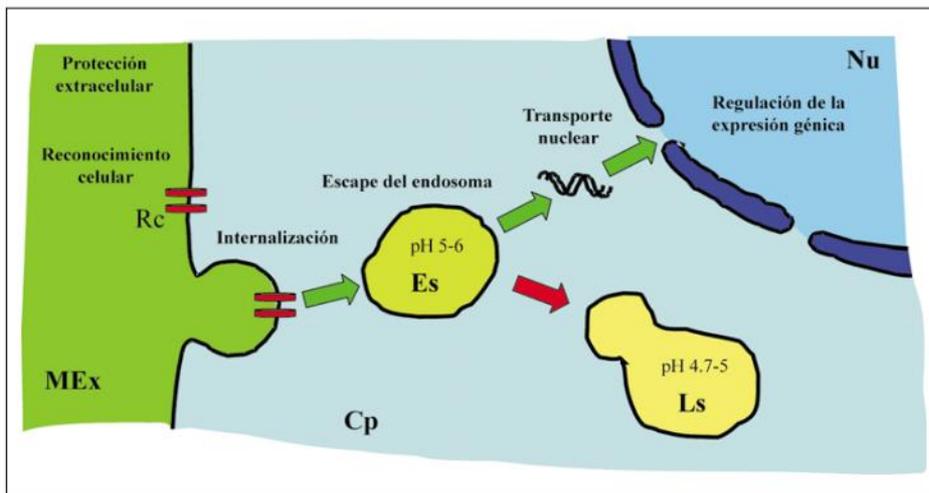


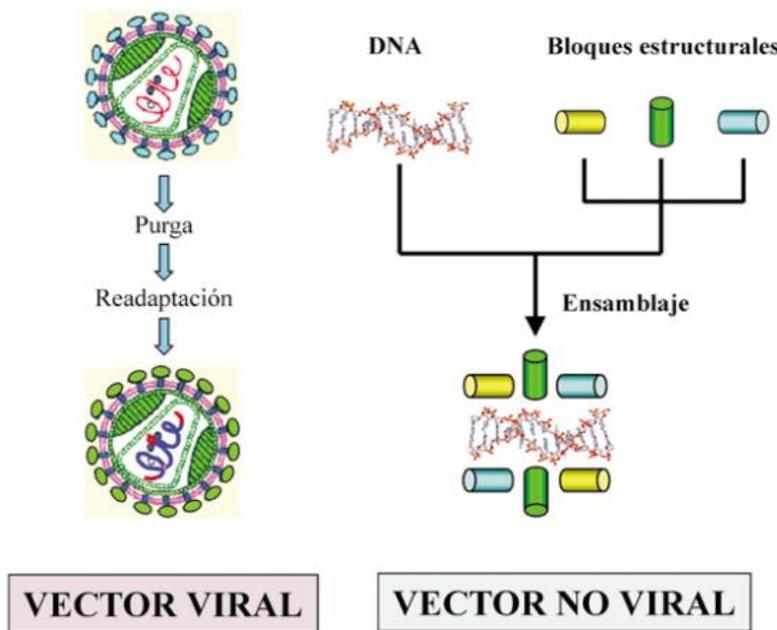
Fig. 4. Barreras a las que se enfrenta el vector: 1) estabilidad en el medio extracelular (MEx), evitando la eliminación; 2) reconocimiento mediante un receptor específico (Rc); 3) internalización en la célula por endocitosis (Es); 4) escape de la degradación por lisosomas (Ls); y 5) entrada al núcleo (Nu), donde se regula la expresión génica. (14)

Con objeto de evitar la rápida degradación enzimática por parte de endonucleasas, el material genético se incorpora en un vector que permite la introducción de este en la célula correspondiente. Los vectores actúan como vehículos y transportan el transgén hasta su diana, asegurando su estabilidad y evitando las barreras biológicas que se encuentren a su paso. Seguidamente, el transgén es liberado en el núcleo celular, se integra en el ADN, y corrige el gen defectuoso. (14,20)

Para ello, interesa que el vector empleado posibilite la integración de secuencias de ADN o ARN sin restricción de tamaño, así como el reconocimiento y la actuación sobre células específicas. Paralelamente, el vector debe ser estable e inocuo, carente de elementos que puedan inducir respuesta inmune, de fácil producción y coste razonable. Aunque todas estas características son ideales y ningún vector disponible las presenta en su totalidad, conocerlas resulta de gran utilidad a la hora de diseñar y elegir el vector más adecuado para cada situación. (14)

- **Vectores virales y no virales**

Los vectores empleados en la terapia génica se clasifican en dos categorías muy diferenciadas: vectores virales y vectores no virales o sintéticos. Los primeros se obtienen a partir de virus: se eliminan los genes responsables de su replicación y otros genes no esenciales,



sobre todo aquellos que puedan causar daños en la célula, y se sustituyen por el gen terapéutico que se desea transferir. De esta manera, el virus se convierte en un vector recombinante que mantiene intacta la capacidad de infectar células, habiendo bloqueado previamente su propagación y multiplicación. La eficiencia de transfección con vectores virales es muy alta, aunque presentan importantes limitaciones relacionadas con su seguridad e inmunogenicidad. (15) Como vectores se suelen utilizar los virus adenoasociados (AAV), los adenovirus (AV) y los lentivirus (LV).

Fig. 5. Esquema de obtención de vectores virales y no virales (14)

La síntesis de vectores no virales ofrece la posibilidad de optimizar el diseño y de alcanzar mejores resultados en la administración. Aunque con estos vectores la transfección es menos eficiente y no se consigue expresión génica a largo plazo, destacan sus múltiples ventajas: son seguros, no limitan el tamaño del material genético que pueden transferir, se producen fácilmente a nivel industrial, etc. (20) Generalmente, los vectores no virales contienen un compuesto catiónico, de naturaleza polimérica o lipídica, que se une a los ácidos nucleicos, que están cargados negativamente, dando lugar a un complejo estable capaz de fijarse a la superficie de la célula diana. Algunos métodos físicos, como electroporación, iontoforesis,

microinyección, “pistola génica” (bombardeo de partículas) e inyección intersticial de ADN desnudo, también pueden utilizarse para la introducción de ADN en la célula; sin embargo, la expresión génica con estos métodos es limitada. (21)

Entre los vectores no virales, los nanosistemas formados a partir de lípidos o polímeros, con propiedades como reproducibilidad, flexibilidad y nula patogenicidad, se han consolidado como una de las estrategias más prometedoras para la administración y liberación de material genético. (22)

	Vectores virales	Vectores no virales
Eficiencia de transfección	Alta	Baja
Especificidad celular	Baja	En algunos casos
Expresión génica	A largo plazo	A corto plazo
Restricción de tamaño	Sí	No
Inmunogenicidad	Elevada	Baja
Bioseguridad	Baja	Elevada

Tabla 1. Comparación de las principales características de vectores virales y no virales

- **El ojo como diana en terapia génica**

El ojo reúne determinadas características que lo convierten en un órgano diana ideal para la terapia génica: a) su anatomía altamente compartimentada y su estructura cerrada, aislada y de pequeño tamaño permiten la disminución de las dosis necesarias para alcanzar el efecto terapéutico, b) es fácilmente accesible, y esto posibilita la administración localizada de fármacos y el tratamiento directo del tejido afectado, c) se han identificado gran variedad de genes causantes de enfermedades oculares o implicados en ellas, d) se dispone de modelos animales para su estudio, e) los efectos y la toxicidad de los tratamientos pueden monitorizarse a nivel local, y f) cuenta con un estatus inmunológicamente privilegiado. (11,18,23) En concreto, en el segmento anterior la respuesta inmunitaria no es completa debido a que las células presentadoras de antígenos en esta fracción del ojo son escasas y la capacidad de estas para activar linfocitos T se ve limitada por la exposición a ciertos factores del humor acuoso. (24) Estas características en conjunto avalan el creciente interés en el empleo de esta terapia en diversas enfermedades oculares.

2. Nanosistemas

En las últimas décadas se han llevado a cabo grandes avances en el campo de la nanotecnología que ofrecen nuevas e interesantes perspectivas en el manejo de las enfermedades oculares. La nanotecnología es la ciencia encargada del estudio, diseño y fabricación de materiales en escala nanométrica. Su aplicación en el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades se conoce como nanomedicina. Uno de los objetivos principales de esta disciplina es el desarrollo de sistemas nanométricos que transporten y liberen fármacos de forma controlada; de hecho, aproximadamente un 75% de las ventas en nanomedicina se corresponden con este tipo de estructuras. (8,25,26) Así, la nanotecnología se consolida como una herramienta de gran utilidad en el diseño de sistemas de liberación de fármacos carentes de las limitaciones de las formulaciones oftálmicas convencionales.

- **Concepto y tipos de nanosistemas**

Los nanosistemas consisten en la asociación de una molécula activa (fármacos, ADN, ARN, etc.) a un *carrier* o transportador que sirve como vehículo hasta alcanzar la diana terapéutica, donde la molécula es liberada de forma segura y controlada. La reducción del tamaño de los materiales a la nanoescala supone un cambio radical en sus propiedades y les permite tomar ventaja de la maquinaria celular existente para facilitar la liberación de agentes terapéuticos. En comparación con los sistemas convencionales, las propiedades físicas, químicas y biológicas de los nanosistemas potencian una mayor especificidad, selectividad y control sobre sus aspectos funcionales: la nueva relación superficie-volumen redefine la eficacia de estos sistemas. (22,26,27)

De manera general, los nanosistemas se clasifican en dos grupos: nanosistemas inorgánicos, donde se incluyen nanopartículas de oro y de óxidos metálicos y sílice mesoporosa, entre otros, y nanosistemas orgánicos, como nanopartículas lipídicas y poliméricas, liposomas, niosomas, dendrímeros, nanoemulsiones y micelas. (25)

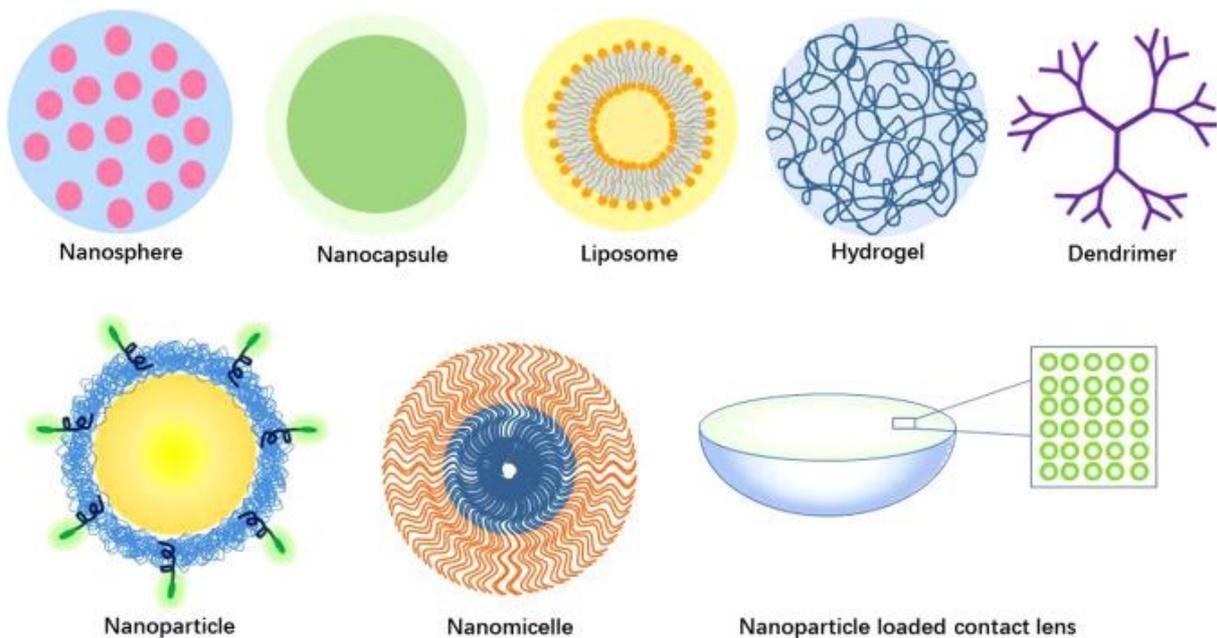


Fig. 6. Representación gráfica de la estructura de algunos nanosistemas (8)

a. *Nanoemulsiones*

Se pueden definir como sistemas heterogéneos compuestos por dos líquidos inmiscibles, de manera que uno de ellos forma gotas nanométricas, de 50-200 nm, en el seno del otro, estabilizadas por una alta concentración de surfactante para evitar los fenómenos de floculación y coalescencia. Pueden solubilizar sustancias hidrófilas e hidrófobas, mejorando la eficacia, estabilidad química y vida media de las mismas.

Los mejores resultados se obtienen con nanoemulsiones catiónicas: prolongan el tiempo de permanencia de la formulación en la superficie corneal al interactuar con las cargas negativas presentes en la mucina. No obstante, las sustancias catiónicas utilizadas en su elaboración son potencialmente tóxicas y muy pocas están aceptadas para su uso oftalmológico. (28)

b. Nanopartículas lipídicas

Estas estructuras coloidales tienen generalmente un tamaño de entre 50 y 400 nm y están preparadas a partir de lípidos sólidos o de mezclas de lípidos sólidos y líquidos. Los surfactantes que se añaden para estabilizar la formulación mejoran la penetración e incrementan la permeabilidad corneal. Las nanopartículas lipídicas actúan como un depósito que libera de forma controlada el fármaco, prolongando el tiempo de permanencia en el ojo y mejorando la biodisponibilidad. Además, posibilitan la vectorización activa a tejidos y compartimentos intracelulares específicos, lo que resulta especialmente interesante para la vehiculización de moléculas poco estables *in vivo* y con pobre captación celular, como los ácidos nucleicos. Destacan por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad física y biológica, fácil modulación de sus características fisicoquímicas y la posibilidad de esterilización por autoclave.

Las nanopartículas lipídicas sólidas o SLNs (del inglés, *solid lipid nanoparticles*) fueron las primeras en elaborarse. Están constituidas por una matriz lipídica sólida y rígida que se encuentra rodeada por una capa de surfactantes en una dispersión acuosa. Son más estables que las nanoemulsiones y requieren menor cantidad de surfactantes, lo que explica su mejor perfil de toxicidad y biocompatibilidad. Sin embargo, la capacidad de carga de fármacos es baja y puede perderse fármaco durante el almacenamiento.

El desarrollo de una segunda generación de nanopartículas lipídicas pretende solucionar las limitaciones tecnológicas mencionadas. Los transportadores lipídicos nanoestructurados o NLCs (del inglés, *nanostructured lipid carriers*) se diferencian de los sistemas anteriores en que en este caso la matriz consiste en una mezcla de lípidos sólidos y líquidos. Aunque más de un 30% de los lípidos son líquidos, no se produce cristalización y la matriz se mantiene en estado sólido. Esta modificación aumenta la capacidad de carga y evita la expulsión de fármaco durante el almacenamiento. Atendiendo al modo de producción, se distinguen tres tipos de NLCs: imperfectas, en las que la adición de pequeñas cantidades de lípidos líquidos altera la cristalización; amorfas, con una matriz sólida pero no cristalina; y múltiples, en cuya preparación se utiliza una mayor cantidad de lípidos líquidos que se mezclan con lípidos sólidos.

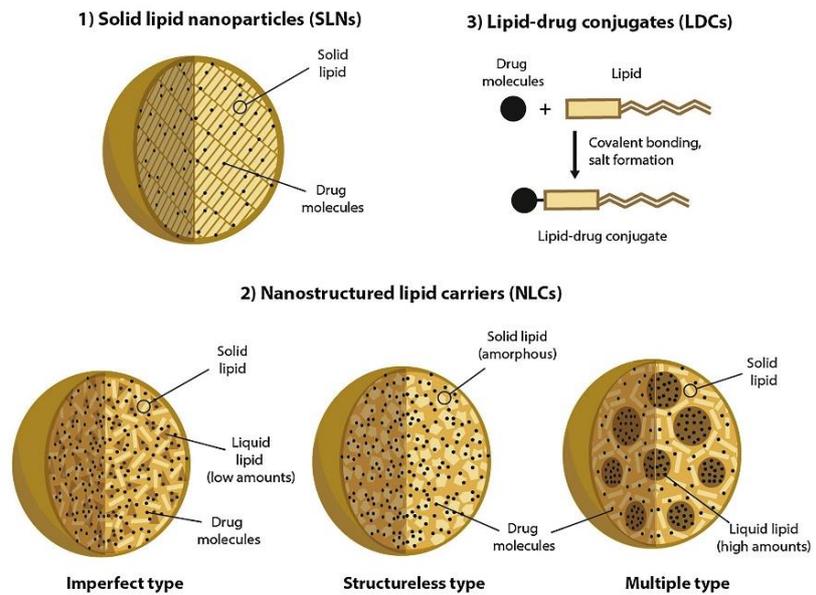


Fig. 7. Tipos de nanopartículas lipídicas (29)

Las nanopartículas conjugadas de lípidos y fármacos mejoran la limitada capacidad de carga de fármacos hidrófilos de las SLNs y las NLCs. Para ello, el fármaco se transforma en una sustancia liposoluble gracias a la formación de sales con ácidos grasos o mediante el establecimiento de uniones covalentes con grupos éster y éter. (29,30)

c. Liposomas

Los liposomas son estructuras vesiculares con un diámetro nanométrico, altamente organizadas y compuestas generalmente por fosfolípidos, por lo que son muy similares a las membranas biológicas. Están constituidos por bicapas lipídicas concéntricas separadas por compartimentos acuosos. Debido a su morfología y a sus propiedades anfifílicas, pueden incorporar sustancias lipófilas, que se asocian a las bicapas lipídicas, e hidrófilas, que se localizan en los espacios acuosos. (28) El tamaño y la composición del liposoma, la fluidez de la membrana y las cargas superficiales pueden modificarse para mejorar la eficacia terapéutica según la naturaleza y las aplicaciones de la molécula que se pretende encapsular.

Los lípidos que conforman el liposoma pueden estar cargados positivamente e interactuar con las cargas negativas de la superficie corneal, mejorando la retención de los fármacos en la córnea. Sin embargo, la inestabilidad, degradabilidad, agregación y baja capacidad de carga de fármacos restringen el uso de liposomas en enfermedades corneales, a pesar de que mejoran la retención corneal y posibilitan la liberación sostenida de las moléculas incorporadas en ellos.

Los liposomas catiónicos tienen gran potencial como transportadores eficientes de ADN y ARN debido a las interacciones electrostáticas que establecen entre sí. Los complejos formados por el liposoma y el ácido nucleico se denominan “lipoplexes”, y se utilizan frecuentemente como transportadores en la terapia génica de enfermedades oculares. (31,32)

d. Niosomas

Estas estructuras vesiculares están formadas por surfactantes no iónicos, que son moléculas anfifílicas que se disponen en forma de bicapa. Al igual que los liposomas, pueden encapsular moléculas hidrofóbicas e hidrófilas. Destacan por encima de otros sistemas vesiculares por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, nula inmunogenicidad, fácil manipulación y menor toxicidad por la naturaleza no iónica de los surfactantes. Además, mejoran la biodisponibilidad y permiten la liberación controlada y dirigida del fármaco. (33)

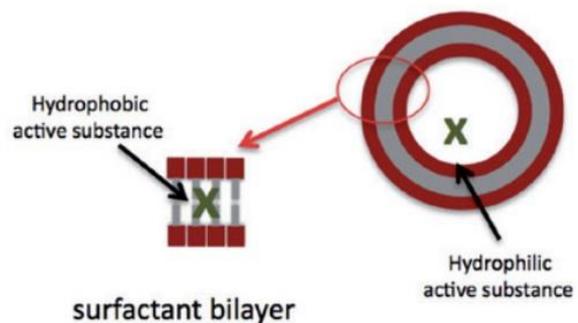


Fig. 8. Estructura de un niosoma (32)

e. Nanopartículas poliméricas: nanosferas y nanocápsulas

Las nanopartículas poliméricas tienen un diámetro de entre 1 y 1000 nm, y se elaboran a partir de polímeros naturales, como albúmina, alginato, colágeno, gelatina, quitosano, o sintéticos, entre los que destacan el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), la poli-ε-caprolactona (PCL), el poli β-hidroxibutirato (PHB) y el ácido poli β,L-málico (PMLA). Estos sistemas coloidales se subdividen en dos grupos: nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas reservorio con una pared polimérica que rodea un núcleo líquido o sólido en el que se disuelve la sustancia activa. Por su parte, las nanoesferas son sistemas matriciales en los que las sustancias se pueden encontrar adsorbidas en la superficie o encapsuladas en el interior de la red polimérica.

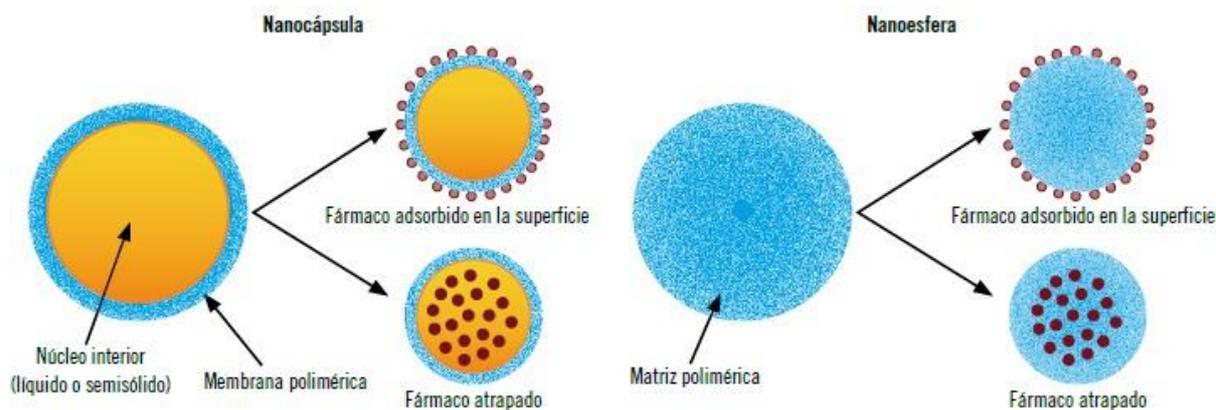


Fig. 9. Tipos de nanopartículas lipídicas (35)

Características como la biodegradabilidad, biocompatibilidad y escasa toxicidad, junto con la capacidad de mucoadhesión al interactuar con la mucina presente en la superficie ocular (modificación de las propiedades superficiales mediante revestimiento de las partículas con polímeros mucoadhesivos), convierten a las nanopartículas poliméricas en sistemas adecuados para la administración oftálmica. La mucoadhesividad de los polímeros minimiza el drenaje de la formulación e incrementa el tiempo de retención. Como resultado, mejora la biodisponibilidad ocular y la cantidad de agente terapéutico en el sitio de acción es mayor, disminuyendo la dosis necesaria y la aparición de efectos adversos como visión borrosa. No obstante, los productos formados en la degradación de los polímeros y los solventes orgánicos que se utilizan en su elaboración pueden ser tóxicos. (34)

Se ha demostrado la utilidad de este tipo de sistemas en la administración *in vitro* de transgenes en células epiteliales y endoteliales de la córnea, además de la liberación *in vivo* de genes en las córneas de roedores sin efectos adversos significativos. (31)

f. Micelas poliméricas

Son sistemas coloidales formados por el autoensamblaje de moléculas anfifílicas, como surfactantes y polímeros, cuyo tamaño y forma varía en función de las moléculas empleadas para su fabricación. En concreto, las micelas poliméricas esféricas tienen gran potencial en la administración ocular de fármacos debido a su capacidad para difundir a través de las distintas capas del ojo. Constan de un núcleo hidrofóbico rodeado por una pared polimérica, idóneo para la carga y la liberación sostenida de moléculas poco solubles en agua. Las formulaciones de micelas poliméricas mejoran la biodisponibilidad en los tejidos del segmento anterior del ojo, tienen una estabilidad relativamente alta y mínima citotoxicidad. (36)

g. Dendrímeros

Los dendrímeros son macromoléculas tridimensionales, globulares y altamente ramificadas, de tamaño nanométrico, y con un núcleo central donde el fármaco puede ser atrapado, encapsulado o conjugado. La fácil funcionalización de su superficie y la capacidad para encapsular sustancias hidrofóbicas hacen de los dendrímeros sistemas atractivos para la liberación de fármacos oculares. Los dendrímeros de poliamidoamina o PAMAM son los más estudiados: mejoran el transporte de moléculas terapéuticas a través de los tejidos oculares e incrementan el tiempo de permanencia, la penetración corneal y la biodisponibilidad. (31,36)

La interacción de las cargas positivas presentes en la superficie de los dendrímeros con oligonucleótidos da lugar a los dendriplexes, que son estructuras capaces de proteger a los ácidos nucleicos de la degradación y de mejorar la transfección en comparación con el oligonucleótido desnudo. Por ello, los dendriplexes son considerados en la actualidad vectores no virales muy prometedores para su uso en terapia génica. (32)

h. Incorporación de nanopartículas en lentes de contacto

Las lentes de contacto son discos curvos y delgados, formados por materiales poliméricos, que se adhieren a la capa lagrimal que cubre la superficie ocular. La incorporación de nanopartículas en la matriz de las lentes de contacto mejora la capacidad de carga y la liberación de fármacos durante un tiempo prolongado. La impresión molecular de lentes consiste en la creación de cavidades con alta afinidad por fármacos específicos. Para ello, se incluyen en la mezcla de polimerización uno o más monómeros funcionales junto con las moléculas que sirven como molde o plantilla. Los monómeros se ensamblan alrededor de esta plantilla mediante enlaces covalentes o puentes de hidrógeno, creándose la cavidad. Tras la polimerización, las moléculas son eliminadas y queda formado un bolsillo con memoria molecular, capaz de reconocer el fármaco. Posteriormente, la lente puede impregnarse con una solución del fármaco, prolongando la duración de liberación del fármaco cargado. (28)

i. Nanogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales reticuladas capaces de absorber gran cantidad de agua sin disolverse debido a los enlaces formados entre sus cadenas. Se forman por reacción entre uno o más monómeros o mediante la asociación de polímeros a través puentes de hidrógeno o de interacciones electrostáticas. Cuando su tamaño es inferior a 1000 nm, se denominan nanogeles. Estas estructuras combinan características de los hidrogeles y de las nanopartículas.

En comparación con otros sistemas coloidales, los nanogeles se caracterizan por su grado de hinchamiento, que permite la liberación de agentes terapéuticos en función de condiciones ambientales externas, como pH y temperatura, o de parámetros relacionados con la propia estructura del nanogel, como grado de reticulación, densidad de carga y estructura química del monómero o polímero. Los nanogeles pueden encapsular fármacos, péptidos, proteínas, genes y otras moléculas para permitir su administración y liberación controlada y dirigida. También se ha estudiado la preparación de nanogeles cargados con nanopartículas, sirviendo como plantillas para la síntesis, almacenamiento y transporte de las mismas. Por otro lado, los nanogeles preparados con polímeros mucoadhesivos pueden resultar útiles en el diseño de nuevos vehículos para la administración de fármacos. (37)

- **Nanosistemas y administración ocular**

Por su simplicidad y comodidad, la instilación tópica es la vía de administración preferida para el tratamiento de enfermedades oculares, especialmente de aquellas que afectan a las estructuras que componen la superficie ocular. Sin embargo, la administración por esta vía no está exenta de inconvenientes: las barreras anatómicas y fisiológicas presentes en el ojo y la activación de mecanismos de defensa tras la instilación, como el parpadeo y la lacrimación, promueven una rápida eliminación del fármaco de la superficie ocular, de manera que este no se absorbe adecuadamente. El escaso tiempo de contacto con los tejidos oculares y la baja permeabilidad corneal de la mayoría de las sustancias activas llevan a la necesidad de aumentar la frecuencia de administración de las mismas para alcanzar niveles terapéuticos en el ojo. (28)

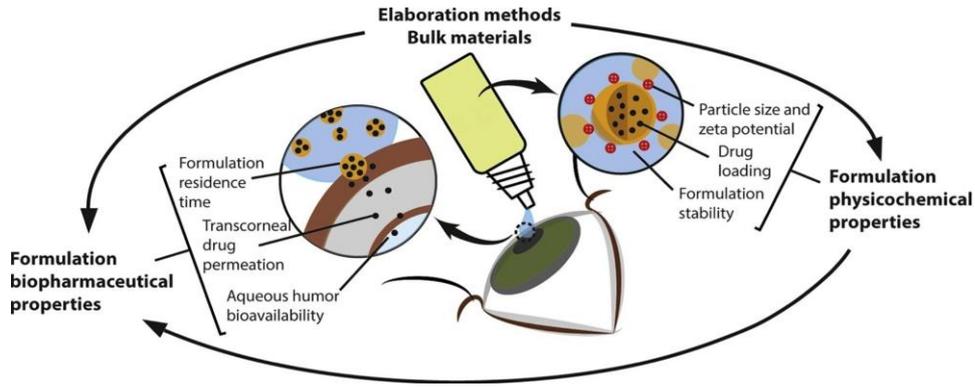


Fig. 10. Esquema de la administración tópica ocular de nanopartículas y propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de la formulación (30)

El desarrollo de nanosistemas para la terapia de enfermedades oculares surge con el propósito de mejorar la eficacia de la administración de fármacos. Los nanosistemas han sido ampliamente estudiados para su aplicación en la administración de fármacos oculares para aprovechar las siguientes ventajas:

- a) Elevada capacidad de incorporación de fármacos, ADN, ARN, anticuerpos, péptidos, etc.
- b) Posibilidad de vectorización activa o pasiva gracias a la fácil modificación y funcionalización de su superficie.
- c) Liberación dirigida y controlada del agente terapéutico que vehiculizan, incluso durante semanas o meses.
- d) La molécula activa llega a su diana específica en concentraciones suficientes para ejercer su efecto farmacológico. Paralelamente, se evita o reduce la aparición de efectos adversos sistémicos.
- e) La encapsulación de las moléculas en nanosistemas transportadores mejora significativamente la permeación a través de las membranas biológicas y la internalización celular.
- f) Protección del fármaco o del material genético encapsulado o adsorbido, sobre todo frente a la degradación enzimática.
- g) Biodegradabilidad y biocompatibilidad, con nula o escasa toxicidad.

La liberación selectiva de concentraciones terapéuticas en el tejido dañado durante periodos de tiempo prolongados se traduce en un aumento de la biodisponibilidad ocular. Asimismo, se reduce la frecuencia de administración y la dosis necesaria para que se produzca el efecto farmacológico, mejorando el cumplimiento y la comodidad del paciente. (34,36)

Enfermedades	Sistemas de liberación
Inflamación ocular	Microemulsiones, nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas, nanopartículas poliméricas, hidrogeles, lentes de contacto
Síndrome de ojo seco crónico	Microemulsiones, nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas,
Neovascularización coroidea	Nanoemulsiones, dendrímeros

Glaucoma	Microemulsiones, nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, hidrogeles, lentes de contacto
Enfermedades degenerativas de la retina	Liposomas
Infecciones intraoculares	Nanopartículas lipídicas sólidas, hidrogeles, lentes de contacto
Prevención de rechazo de aloinjerto corneal	Microemulsiones
Cáncer de ojo	Nanopartículas poliméricas

Tabla 2. Resumen de enfermedades oculares susceptibles de ser tratadas tópicamente con nanosistemas. Adaptado de Souza et al., 2014 (28)

3. Aplicación de nanosistemas en terapia génica ocular

Cuando se considera el desarrollo de un nuevo tratamiento clínico, como la terapia génica, el ojo presenta varias ventajas como órgano diana. La transparencia del ojo ayuda a la observación de los efectos de la intervención, y su pequeño tamaño facilita la accesibilidad para la aplicación de nano-tratamientos, ya sea en forma de colirio tópico o como inyección. Además, en algunos ensayos clínicos uno de los ojos sirve como control para demostrar que la intervención realizada es mejor que otras prácticas clínicas.

La administración de sustancias activas en el ojo mejora cuando estas se disuelven o encapsulan en nanosistemas, por lo que el estudio de estos *carriers* para aplicaciones oftalmológicas resulta prometedor. Mediante el uso de nanosistemas es posible conseguir concentraciones sostenidas de la sustancia que se administra, así como un aumento significativo de la biodisponibilidad ocular en comparación con las formulaciones más comúnmente utilizadas. Además, estas estructuras también son útiles como vehículos en terapia génica, permitiendo la liberación de material genético de manera específica, eficiente y segura. El uso clínico de nanosistemas para la administración de material genético presenta numerosas ventajas y carece de los inconvenientes característicos de los vectores virales, aunque la eficiencia de transfección de estos sea mayor. (38) La incorporación de ADN o ARN en nanosistemas evita las barreras extracelulares (parpadeo, fluido lagrimal, endonucleasas) e intracelulares (difusión a través del citoplasma, degradación lisosomal, entrada en el núcleo tras atravesar la envoltura nuclear) a las que se suele enfrentar la liberación y expresión del material genético en el sitio diana. (39)

- **Estudios en el tratamiento de enfermedades corneales**

Factores como la accesibilidad, transparencia y estabilidad *ex vivo* de la córnea la convierten en una diana ideal para terapia génica. (39) Mediante el uso de vectores apropiados es posible administrar material genético en la córnea, con la subsecuente expresión de las proteínas transgénicas estructurales (por ejemplo, colágeno) o funcionales (citoquinas, enzimas, factores de crecimiento) capaces de modular enfermedades congénitas o adquiridas.

La terapia génica en la córnea ha sido ampliamente estudiada en modelos animales, aunque por ahora los ensayos clínicos en humanos son escasos. Algunas de las enfermedades

susceptibles de ser tratadas con terapia génica son las mucopolisacaridosis tipo IV (Síndrome de Maroteaux-Lamy) y tipo VII (Síndrome de Sly), cicatrización corneal, neovascularización corneal, rechazo de injerto corneal, algunas distrofias anteriores y estromales ligadas a mutaciones genéticas, y el mantenimiento de la densidad celular del endotelio corneal. (21)

Enfermedad	Tratamiento	Posible terapia génica
Neovascularización corneal	Trasplante de membrana amniótica, administración tópica de AINEs y corticosteroides, cauterización, diatermia, terapia fotodinámica	Inyección intraestromal de plásmido de ADN desnudo que codifica VEGF, inyección subconjuntival de endostatina recombinante-AAV, micelas, poliplejos, inyección intraestromal de un plásmido conteniendo pSEC.shRNA frente a VEGF-A
Queratitis por VHS-1	Administración tópica de antivirales y corticosteroides, antivirales orales	Oligonucleótidos antisentido, siRNA, ribozimas, aptámeros, meganucleasas, CRISPR/Cas9 editing
Rechazo de injerto corneal	Fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores, reimplantación de la córnea	Enfoques antiangiogénesis (inhibición o regresión de vasos sanguíneos), modulación de respuesta inmunológica (transferencia génica mediada por vector viral de Ig-CTLA4, IL-10 o IL-12), estrategias anti-apoptosis (liberación génica, usando lentivirus como vector, de p35 baculoviral, Bcl-xL mamífero o PD-L1)
Síndrome de Sjogren	Lágrimas artificiales, agentes antiinflamatorios, estimuladores de secreción lagrimal	Administración de citoquinas mediante vectores virales, inhibición de TNF α mediante transferencia adenoviral
Mucopolisacaridosis tipo VII (Síndrome de Sly)	Terapia hematopoyética con células madre	GUSB humano expresado en adenovirus administrado en la cámara anterior o dentro de la región intraestromal

Tabla 3. Tratamiento y posible terapia génica de algunas enfermedades corneales. Adaptado de Di Ioro et al., (40)

a. Neovascularización y rechazo de injerto corneal

La neovascularización siempre es patológica y puede ocurrir en cualquiera de las capas de la córnea. La aparición de nuevos vasos cambia el microambiente de la superficie ocular y puede llegar a provocar opacidad corneal. La neovascularización tiene un rol importante en la respuesta inflamatoria, lo que explica que se trate de un factor de riesgo para el rechazo de

trasplantes corneales. Debido a la limitada eficacia de los fármacos antiinflamatorios, antimicrobianos e inmunosupresores en el tratamiento de la neovascularización corneal y a fin de evitar técnicas quirúrgicas invasivas, claramente es necesario realizar nuevos enfoques terapéuticos. (39)

El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) promueve la migración de células endoteliales, por lo que está implicado en la angiogénesis corneal y constituye una diana importante en la terapia génica de la neovascularización. En un estudio realizado por Qazi *et al.* en 2012 se demostró la efectividad de nanopartículas de PLGA cargadas con plásmidos pSEC.shRNA-VEGF-A en la regresión de la neovascularización corneal inducida en modelos murinos. Las nanopartículas elaboradas con PLGA son biodegradables, mejoran la captación celular y posibilitan la liberación sostenida en el sitio de administración. La carga de estas nanopartículas con plásmidos que contienen un *cassette* de expresión frente a VEGF-A constituye una estrategia prometedora de terapia génica *in vivo* para conseguir la regresión de la neovascularización de forma eficaz, sostenible y no inmunogénica. (41)

En 2012 se publicó un estudio de Cho *et al.* en el que elaboraron nanopartículas a partir de PLGA y se cargaron con Flt23k, una construcción recombinante de los dominios de unión 2 y 3 de VEGFR-1 (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, también conocido como Flt-1), junto con el péptido señal KDEL (secuencia de lisina-aspártico-glutámico-leucina), que se une a los receptores de retención del retículo endoplasmático e impide la secreción de las proteínas endógenas acopladas a KDEL. Así se consigue que los intraceptores Flt23k se unan a VEGF con alta afinidad en el interior celular, secuestrándolo dentro del retículo endoplasmático e inhibiendo su secreción. Estas nanopartículas anti-VEGF fueron administradas a ratones sometidos a trasplante corneal mediante inyección intraestromal, y se comprobaron sus efectos en la disminución de la neovascularización y de la linfangiogénesis. También se determinó que podían contribuir a la mejora de los resultados de los injertos corneales, especialmente en combinación con acetónido de triamcinolona, un glucocorticoide que suele emplearse para reducir el rechazo de injertos. (42)

b. Queratitis por VHS-1

La queratitis herpética estromal es una infección provocada generalmente por el virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1). Tras la infección, el virus queda latente en el ganglio del nervio trigémino, y cuando se reactiva puede llegar a otras partes del organismo, incluyendo la córnea. La inflamación corneal crónica asociada con queratitis herpética estromal implica infiltración celular, edema y neovascularización, y es la principal causa infecciosa de ceguera en los países desarrollados, siendo también responsable de un 5-10% de las operaciones de queratoplastia o trasplante de córnea penetrante. (43)

La queratitis por VHS-1 puede ser tratada con terapia génica. Las posibles estrategias son: a) vacunación frente a una infección ocular primaria por VHS-1; b) prevención de episodios recurrentes

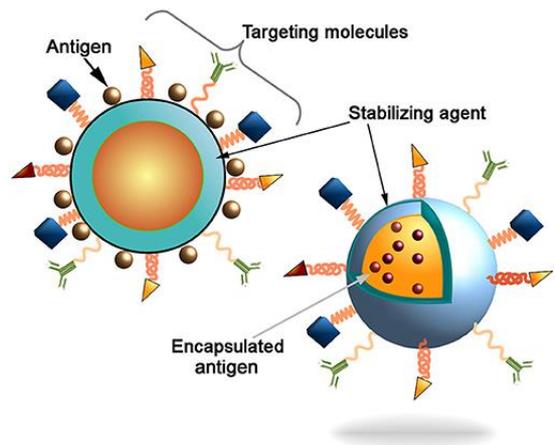


Fig. 11. Representación de antígenos conjugados en la superficie de la nanopartícula (izquierda) y encapsulados en el núcleo (derecha) (44)

de ataques virales en la córnea acompañados de respuesta inmune debido a la existencia de infección por VHS-1; y c) tratamiento de los síntomas de queratitis. (39)

En un estudio de Hu *et al.* del año 2015 en el que se tomó la infección por VHS-1 como ejemplo, se prepararon nanopartículas de polietilenimina (PEI) y magnetita (Fe_3O_4) cargadas con una vacuna de ADN y se compararon sus efectos en la prevención de infecciones corneales en función de la ruta de inoculación. Cuando se inocula una vacuna de ADN, los genes a los que se dirige son expresados y presentados en las células del huésped, imitando el proceso natural de infección. Los genes del principal antígeno de VHS-1 (glicoproteína D, gD) y de la interleucina-21 (IL-21) se insertaron en el vector pRSC, formando el plásmido recombinante pRSC-gD-IL-21. Las nanopartículas cargadas con la vacuna de ADN se prepararon mezclando nanopartículas inorgánicas de Fe_3O_4 , PEI y el plásmido pRSC-gD-IL-21. Los investigadores demostraron que la inoculación tópica de las nanopartículas proporcionaba una mayor protección frente a infecciones virales en la córnea mediante la generación de una respuesta inmune local y específica en la mucosa ocular más fuerte que la originada tras la inoculación intramuscular de las mismas nanopartículas. Por tanto, se concluyó que la inoculación tópica puede ser una ruta prometedora para la inoculación de vacunas de ADN en la prevención de infecciones corneales. (45)

- **Estudios en el tratamiento del síndrome de ojo seco**

El ojo seco o síndrome de disfunción lagrimal es una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular que origina malestar ocular, problemas visuales e inestabilidad de la película lagrimal, con lesión potencial de la superficie ocular, y cursa con un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular.

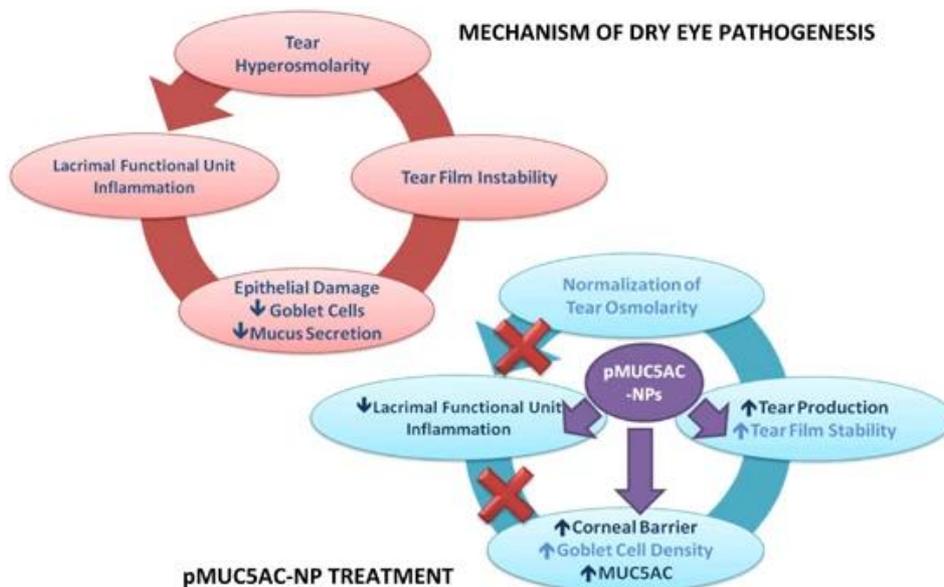


Fig. 12. Comparación entre el mecanismo patogénico del síndrome de ojo seco y los efectos del tratamiento con nanopartículas-pMUC5AC (40)

Las mucinas son un grupo heterogéneo de glicoproteínas y el principal componente de todas las secreciones mucosas. En la superficie ocular actúan como lubricantes de las superficies epiteliales de córnea y conjuntiva durante el parpadeo, estabilizan la película lagrimal y sirven como barrera física para impedir la entrada de patógenos. La alteración de la expresión de

mucinas o de su secreción por parte de las células Globet promueve el desarrollo de enfermedades de la superficie ocular, como el síndrome de ojo seco. Los cambios producidos en la capa de mucina pueden conducir a un aumento de la evaporación de la película lagrimal y, en consecuencia, a la hiperosmolaridad de la misma, que se asocia a inflamación de la superficie ocular. A su vez, los mediadores inflamatorios pueden tener un impacto negativo en la diferenciación y proliferación de células Globet y, por ende, en la secreción de mucinas.

Entre las mucinas, MUC5AC es una de las más relevantes. Debido a su importancia en la estabilidad del fluido lagrimal y a su disminuida expresión en el síndrome de ojo seco, MUC5AC puede ser una diana potencial para nuevas terapias. Partiendo de esta premisa, en un estudio de Contreras-Ruiz *et al.* del año 2013 se incorporó un plásmido codificante de MUC5AC modificada (pMUC5AC) en nanopartículas elaboradas a base de gelatina cationizada, capaces de proteger el plásmido de la degradación y de promover la internalización del mismo en las células de la superficie ocular. Las nanopartículas cargadas con pMUC5AC indujeron la expresión de MUC5AC modificada en un tejido de superficie ocular de origen murino, demostrando la seguridad de la transfección tópica en células de la superficie ocular utilizando *nanocarriers* no virales. La expresión del plásmido en ratones enfermos de ojo seco se correlacionó con una significativa reducción de la inflamación y una notable mejora de los parámetros clínicos, como mejora de la integridad de la barrera corneal epitelial, aumento de la producción de lágrima y del número de células Goblet, que son las encargadas de secretar MUC5AC, y reducción de la infiltración de células T CD4+ en la conjuntiva. Estos resultados proporcionan una evidencia sólida del uso potencial de las nanopartículas pMUC5AC como nueva modalidad terapéutica en la enfermedad de ojo seco. (46,47)

- **Ensayos clínicos**

El estudio detallado de la patogénesis genética de las enfermedades oculares realizado en los últimos años, las ventajas que presenta el ojo como órgano diana y la idoneidad de los nanosistemas en la administración ocular de material genético explican que la aplicación de nanosistemas en terapia génica ocular sea un área de investigación de gran interés. Sin embargo, del total de los ensayos clínicos de terapia génica que se llevaron a cabo en 2019, sólo un 1,2% tenían enfermedades oculares como indicación. (48) Aunque el segmento anterior del ojo es una diana atractiva, en la práctica totalidad de los ensayos clínicos se estudian terapias génicas para enfermedades que afectan al segmento posterior del ojo, y solamente en un 20% de los ensayos se utilizan vectores no virales, entre los que se incluyen nanosistemas, ADN desnudo y otros. (49)

CONCLUSIONES

En las últimas décadas se han estudiado en profundidad las propiedades de los nanosistemas en la administración oftálmica de fármacos, ADN y ARN, y al mismo tiempo la terapia génica ha emergido como una herramienta eficaz para abordar el tratamiento de las enfermedades oculares. Todo hace indicar que las ventajas que presentan los nanosistemas frente a los vectores virales impulsarán su uso como vectores de material genético; no obstante, la transfección con nanosistemas es menos eficiente que con vectores virales, motivo por el que se siguen utilizando estos últimos a pesar de su escasa seguridad y elevada inmunogenicidad.

En comparación con otras indicaciones, como oncología y enfermedades infecciosas, el número de investigaciones y de ensayos clínicos de terapia génica ocular es muy bajo. Aunque no cabe duda del potencial de la terapia génica para tratar enfermedades que afectan a las

estructuras que componen el segmento anterior del ojo, la mayoría de los estudios se encuentran todavía en niveles preclínicos y los ensayos en humanos son escasos.

A medida que se estudie con más detalle la introducción de material genético en el segmento anterior y se solventen las limitaciones características de los nanosistemas como vectores, la terapia génica ocular podría desbancar a los tratamientos convencionales. Para ello será esencial promover el uso de los nanosistemas y conocer los genes implicados en la patogénesis de las enfermedades del segmento anterior del ojo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res.* 2009;26(5):1197-1216
2. Torrecilla J, Del Pozo-Rodríguez A, Vicente-Pascual M, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A. Targeting corneal inflammation by gene therapy: Emerging strategies for keratitis. *Exp Eye Res.* 2018;176:130-140
3. Andrés Magallón S. Farmacoterapia ocular. Presente y futuro. Discurso leído en la solemne apertura del curso de la Academia de Farmacia Reino de Aragón. Zaragoza; 2014. p. 19–38
4. Janagam DR, Wu L, Lowe TL. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;122:31-64
5. Durairaj C. Ocular Pharmacokinetics. *Handbook of experimental pharmacology.* 2017: 31-55.
6. Ablamowicz AF, Nichols JJ. Ocular Surface Membrane-Associated Mucins. *Ocul Surf.* 2016;14(3):331-341.
7. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Primera. Vol. II. Madrid: Síntesis; 2013. 457 p.
8. Weng Y, Liu J, Jin S, Guo W, Liang X, Hu Z. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7(3):281-291
9. Vila Jato JL. Nanotecnología Farmacéutica. Realidades y Posibilidades Farmacoterapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXVIII. 2009. 409 p.
10. Chacón-Camacho ÓF, Astorga-Carballo A, Zenteno JC. Terapia génica para enfermedades hereditarias oftalmológicas: avances y perspectivas. *Gac Med Mex.* 2015; 151:469-78
11. Flórez, J. Farmacología humana [Internet] 6th ed. Barcelona: Elsevier; 2014. [citado el 14 de abril de 2020]. Disponible en: <https://clinicalkeymeded.elsevier.com/#/books/9788445825235/cfi/6/2!/4/2/4@0:0.117>
12. Borrás T. The Pathway From Genes to Gene Therapy in Glaucoma: A Review of Possibilities for Using Genes as Glaucoma Drugs. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2017;6(1):80-93
13. Andrieu-Soler C, Bejjani RA, de Bizemont T, Normand N, BenEzra D, Behar-Cohen F. Ocular gene therapy: A review of non-viral strategies. *American Journal of Ophthalmology.* abril de 2007;143(4):732.
14. Fominaya, JM. Vectores de transferencia en terapia génica. *6º Curso de Biotecnología Aplicada.* 2006. p. 85-100
15. Ronchera-OMS CL, González JM. Farmacia hospitalaria. 6. Terapia génica. Disponible en: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP06.pdf>

16. Cuéllar Rodríguez S. Investigación y desarrollo de fármacos biológicos. En: *Medicamentos biológicos. Innovadores y biosimilares*. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2019. p. 21-66.
17. Isamat M. Actualización terapéutica: Terapia génica. En: *Formación Continuada para Farmacéuticos de Hospital*. Disponible en: <http://www.ub.edu/legmh/capitols/isamat.pdf>
18. Colella P, Cotugno G, Auricchio A. Ocular gene therapy: current progress and future prospects. *Trends Mol Med*. 2009;15(1):23-31
19. Brown, TA. Genomas [Internet] 3th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2012. [citado el 8 de junio de 2020]. Disponible en: <http://www.medicapanamericana.com.bucm.idm.oclc.org/VisorEbookV2/Ebook/9789500605830#>
20. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(1):GE01-GE6
21. Solinís MÁ, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Rodríguez-Gascón A. Treatment of ocular disorders by gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;95(Pt B):331-342
22. Dhapte V, Pokharkar V. Nanosystems for drug delivery: Design, engineering, and applications. En: Shukla AK, Iravani S. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*. Elsevier. 2019. p. 321-345
23. Liu MM, Tuo J, Chan CC. Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(5):604-61
24. Yellepeddi VK, Palakurthi S. Recent Advances in Topical Ocular Drug Delivery. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2016;32(2):67-82
25. Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química*. Octubre de 2016;27(4):286-91
26. Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine (Lond)*. 2012;7(8):1253-1271
27. Diebold Y, Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(6):596-609
28. Souza JG, Dias K, Pereira TA, Bernardi DS, Lopez RF. Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods. *J Pharm Pharmacol*. 2014;66(4):507-530
29. Álvarez-Trabado J, Diebold Y, Sánchez A. Designing lipid nanoparticles for topical ocular drug delivery. *Int J Pharm*. 2017;532(1):204-21
30. Battaglia L, Serpe L, Foglietta F. Application of lipid nanoparticles to ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(12):1743-1757
31. Chaurasia SS, Lim RR, Lakshminarayanan R, Mohan RR. Nanomedicine Approaches for Corneal Diseases. *Journal of Functional Biomaterials*. 2015; 6(2):277-298
32. Herrero-Vanrell R, Vicario de la Torre M, Andrés Guerrero V, Barbosa Alfaro D, Molina Martínez I, Bravo Osuna I. Nano and microtechnologies for ophthalmic administration, an overview. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2013; 23(2):75-102
33. Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for ocular drug delivery. *Macromol Biosci*. 2012;12(5):608-620
34. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Silva AC, Lobo JM. Applications of polymeric and lipid nanoparticles in ophthalmic pharmaceutical formulations: present and future considerations. *J Pharm Pharm Sci*. 2014;17(3):278-293
35. Suñé-Pou M, Suñé-Negré JM. Estrategias para la vectorización de fármacos mediante nanotecnología. *En profundidad. El Farmacéutico Hospitales*. 2016;208:4-9

36. Srinivasarao, DA, Lohiya, G, Katti, DS. Fundamentals, challenges, and nanomedicine-based solutions for ocular diseases. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2019; 11:e1548
37. Escalona Rayo O, Quintanar Guerrero D. Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Rev. mex. cienc. farm* [revista en la Internet]. 2014 Sep [citado 2020 Jun 10] ; 45(3): 17-38. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000300003&lng=es
38. Thomson H, Lotery A. The promise of nanomedicine for ocular disease. *Nanomedicine (Lond)*. 2009;4(6):599-604
39. Klausner EA, Peer D, Chapman RL, Multack RF, Andurkar SV. Corneal gene therapy. *J Control Release.* 2007;124(3):107-133
40. Di Iorio E, Barbaro V, Alvisi G, et al. New Frontiers of Corneal Gene Therapy. *Hum Gene Ther.* 2019;30(8):923-945
41. Qazi Y, Stagg B, Singh N, et al. Nanoparticle-mediated delivery of shRNA.VEGF-a plasmids regresses corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(6):2837-2844
42. Cho YK, Uehara H, Young JR, et al. Flt23k nanoparticles offer additive benefit in graft survival and anti-angiogenic effects when combined with triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(4):2328-2336
43. Elbadawy HM, Gailledrat M, Desseaux C, Ponzin D, Ferrari S. Targeting herpetic keratitis by gene therapy. *J Ophthalmol.* 2012;2012:594869
44. Pati R, Shevtsov M, Sonawane A. Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2224
45. Hu K, Malla T, Zhai Y, Dong L, Tang R. Topical Administration Is a Promising Inoculating Route versus Intramuscular Inoculation for the Nanoparticle-Carried DNA Vaccine to Prevent Corneal Infections. *Ophthalmic Res.* 2015;55(2):99-110
46. Contreras-Ruiz L, Zorzi GK, Hileto D, et al. A nanomedicine to treat ocular surface inflammation: performance on an experimental dry eye murine model. *Gene Ther.* 2013;20(5):467-477
47. Baudouin C, Rolando M, Benitez Del Castillo JM, et al. Reconsidering the central role of mucins in dry eye and ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2019;71:68-8
48. The Journal of Gene Medicine. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [Internet]. [Consultado 27 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>
49. Lee JH, Wang JH, Chen J, et al. Gene therapy for visual loss: Opportunities and concerns. *Prog Retin Eye Res.* 2019;68:31-53