



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**REGULACIÓN POR H₂O₂ DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE
CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES GENERADAS A PARTIR DE GLÍA
DE MÜLLER**

PROPUESTA DE PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

AMABILE ALICIA VELO SILVESTRE

TUTOR PRINCIPAL

DR. LENIN DAVID OCHOA DE LA PAZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
FACULTAD DE MEDICINA

DRA. MÓNICA LAMAS GREGORI
CINVESTA SEDE SUR

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen

La participación de la glía de Müller en la retina de mamíferos como fuente de células progenitoras bajo condiciones patológicas ha sido descrita en los últimos años por distintos grupos de investigación, sin embargo, este proceso aún es poco entendido. Algunas retinopatías como la degeneración macular asociada a la edad (AMD) o la retinopatía diabética, están asociadas a condiciones de estrés oxidativo en el ambiente ocular. Por otro lado, se sabe que la glía de Müller responde a condiciones de estrés oxidativo. Por lo tanto, es probable que estas condiciones de estrés regulen la generación de células progenitoras a partir de la glía de Müller.

Es por esto que en el presente trabajo investigamos el efecto del H_2O_2 sobre la diferenciación de las células progenitoras obtenidas a partir de células de Müller. Para esto se generaron neuroesferas a partir de células de Müller de retina de ratón. Estas neuroesferas fueron expuestas a H_2O_2 (150 μM) durante 2 horas, posteriormente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la expresión de marcadores gliales (CRALBP), y de progenitoras neurales (nestina y Sox2).

Los resultados obtenidos muestran que la exposición de las neuroesferas al H_2O_2 genera una disminución en la expresión de marcadores para células progenitoras (nestina y Sox2), sin embargo, para el caso del marcador glial (CRALBP), se observa un incremento en su expresión. En conclusión, el estrés oxidativo generado por una alta concentración de H_2O_2 incrementa las células con características gliales a partir de la desdiferenciación de las células de Müller, por tanto, considerando un ambiente fisiopatológico el estrés oxidativo solo estaría propiciando el proceso de gliosis, posiblemente con el objetivo de amortiguar las condiciones excitotóxicas.

Abstract

The role of Müller cells in the retina as a source of progenitor cells has been described by different groups, however, the response of these progenitor cells to oxidative stress has been poorly described. Oxidative stress is produced by reactive oxygen species, which are constantly produced in the intraocular environment.

In this work, we sought to evaluate the effect of H₂O₂ on the differentiation of progenitor cells obtained from Müller cells. For this, Müller cells were dedifferentiated, thus obtaining neurospheres where immunofluorescences were performed to evaluate the expression of markers that indicate that the cells acquired progenitor properties. These neurospheres were exposed to H₂O₂ at a concentration of 150 µM for two hours, and the expression of glial markers (CRALBP) and neural progenitors (nestina and Sox2) genes were compared against the control.

We found that exposure to oxidative stress led to a decrease in nestina and Sox2 immunoreactive progenitor cells and an increase in the expression of Cralbp, a specific Müller cell marker. We can speculate that oxidative stress leads the progenitor cells to differentiate into Müller's glial cells. This suggests that in a pathological environment in which oxidative stress increases the undifferentiated Müller cells would differentiate into Müller glia.

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación y la calidad de la enseñanza que me brindó desde la preparatoria, la licenciatura y ahora en el posgrado.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Lenin David Ochoa de la Paz, por la oportunidad de realizar mi posgrado, agradezco su confianza en mí y su apoyo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Neurobiología Molecular y Celular de la Glía del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM y de la unidad de investigación UNAM-APEC Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes”. Agradezco al programa de la maestría en ciencias (Neurobiología) por acercarme al conocimiento científico, al pensamiento crítico y aumentar mi capacidad de análisis.

Agradezco a las instituciones que hicieron posible esta investigación, al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido (N. de beca 479808). A los donativos de los proyectos DGAPA-PAPIIT (IA208116 e IN221820) DGAPA-PAPIME, al presupuesto interno de la Facultad de Medicina, y al apoyo en infraestructura por parte de la Unidad de Investigación de la Asociación Para Evitar la Ceguera en México I.A.P. Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes” (UNAM-APEC).

A los miembros de mi comité tutorial, la Doctora Selva Rivas y la Doctora Mónica Lamas, por sus contribuciones a mi trabajo, a su tiempo y sus consejos.

Agradezco también al M en C Eduardo Daniel Aguilar, al Lic. Miguel Ángel Guzmán Montoya y al pasante Guillermo Guerrero Sánchez, por sus enseñanzas en las técnicas utilizadas en la presente tesis.

Agradezco a la MVZ Claudia Verónica Rivera Cerecedo, jefe de la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por el apoyo otorgado al suministrar animales para los experimentos realizados en este trabajo.

Agradecimientos a título personal

Agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio UNAM-APEC, Jessica, Guillermo, Miguel, Diana y Alan por su amistad, consejos y apoyo, son de lo mejor que me deja esta experiencia. Gracias a Daniel Aguilar, amigo y apoyo desde el principio.

Agradezco al Coro de la Facultad de Medicina y a su director Oscar Herrera, por ser el momento de catarsis, sin la música y sin los ensayos y conciertos esta etapa no hubiera sido igual de satisfactoria.

A mis padres Pedro Velo y María Elena Silvestre, por su cariño, comprensión y apoyo en todos y cada uno de mis sueños, sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí. A mi hermana Jazmín (Mina), por su soporte, su tiempo de escucharme, su paciencia y su capacidad de calmarme.

A Adrián Cruz, por todo su amor y apoyo.

Indice

Resumen	II
Abstract	III
1. INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
1.1 Anatomía Ocular	2
1.1.1 Estructura de la Retina	3
1.1.2 Célula de Müller	5
1.2 Estrés Oxidativo	9
1.2.1 Estrés Oxidativo Ocular	11
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo General	16
4.2 Objetivos Particulares	16
5. MÉTODOS Y METODOLOGÍA	17
5.1 Sujetos	17
5.2 Cultivo primario de células de Müller	17
5.3 Desdiferenciación y Obtención de Neuroesferas	18
5.4 Exposición a H ₂ O ₂	18
5.5 Prueba de viabilidad celular por ensayos de actividad metabólica	19
5.6 Caracterización de las Células por Inmunofluorescencia	19
5.7 Preincubación con α -tocoferol	20
5.8 Análisis estadístico	21
6. Resultados	21

6.2 Obtención de Neuroesferas	23
6.3 Caracterización de Neuroesferas	23
6.4 Exposición a H ₂ O ₂	26
Curva dosis-respuesta H ₂ O ₂	26
6.5 Inmunofluorescencias de las células expuestas a H ₂ O ₂	27
6.6 Exposición a α-tocoferol	33
6.7 Efecto de H ₂ O ₂ sobre cultivos de neuroesferas	39
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIÓN	43
9. REFERENCIAS:	44
10. ÍNDICE DE FIGURAS	50

Abreviaturas

CCL2	Proteína Quimioatrayente De Monocitos 1
CDN	Células Disgregadas de Neuroesferas
CXCL1	Ligando De Quimiocinas 1
CXCL10	Proteína 10 Inducida Por Interferón Gamma
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Mixture F-12
DNA	Acido Desoxirribonucleico
EFG	Factor De Crecimiento Epidérmico
FADH•	Nucleótido De Flavina Totalmente Oxidado
Fe	Fierro
FGF	Factor De Crecimiento De Fibroblastos
GFAP	Proteína Fibrilar Acida Glial
GSH	Glutación Reducido
GSSG	Glutación Oxidado
H ₂ O	Agua
NADH	Dinucleótido De Nicotinamida Y Adenina,
O ₂	Oxigeno
O ₂ ⁻	Anión Superoxido
OH	Radical Hidroxilo
PBS	Buffer Fosfato Salino
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno; por sus siglas en inglés: reactive oxygen species
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervioso Central

1. INTRODUCCIÓN

La identificación de nichos neurogénicos, constituidos por células progenitoras en el sistema nervioso ha sido tema de múltiples investigaciones. Hasta el momento se han identificado dos áreas en el cerebro con una alta actividad neurogénica que se mantiene a lo largo de la vida del organismo, la primera es la zona subventricular y la segunda es el giro dentado del hipocampo¹.

En la retina, estudios recientes han descrito la capacidad de obtener células con características de progenitoras a partir de las células de Müller, la célula glial más abundante de la retina. La glía de Müller participa de manera importante en el correcto funcionamiento del sistema visual; se considera la principal unión anatómica y funcional entre las neuronas de la retina, proporciona soporte estructural, provee de factores neurotróficos y nutrientes, remueve los residuos metabólicos, es responsable de mantener la homeostasis iónica en la retina y en los últimos años se le han atribuido una importante participación durante la angiogénesis y de la regulación del flujo sanguíneo hacia la retina²

La idea de considerar a la glía de Müller como una fuente neurogénica se sustenta en estudios recientes realizados en modelos vertebrados mamíferos y no mamíferos en donde se demostró que la capacidad de regeneración retinal en caso de daño es mediada por la inducción de proliferación y migración de células de Müller hacia el sitio del daño³. Tras un daño químico o mecánico en la retina de los mamíferos, se activa un proceso denominado gliosis, en el cual las células de Müller son capaces de proliferar y migrar hacia las zonas afectadas, en donde forman cicatrices gliales². Aún se desconoce la razón por la cual únicamente en anuros y reptiles se presenta una capacidad de desdiferenciar, proliferar y generar células progenitoras en la retina mientras que en mamíferos esta capacidad es muy limitada o inexistente.

Diversos autores han señalado la participación de las especies reactivas de oxígeno o ROS (por sus siglas en inglés: reactive oxygen species) en el proceso de proliferación y de diferenciación de células con características de progenitoras neurales en

organismos adultos^{4,5}. Considerando esto, el objetivo de este proyecto es investigar el efecto del H₂O₂ como generador de ROS sobre la diferenciación de células progenitoras derivadas de células gliales de Müller cultivadas *in vitro*

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, en presencia de H₂O₂, las células progenitoras obtenidas a partir de glía de Müller de ratón tienden a mantener su naturaleza glial, lo cual podría sugerir que el estrés oxidativo modula de manera negativa la capacidad de la glía de Müller para generar células con características de progenitoras neurales.

ANTECEDENTES

1.1 Anatomía Ocular

El ojo es un órgano sensorial encargado de captar la luz que pasa a través de los medios refringentes: córnea, humor acuoso, cristalino y humor vítreo⁶, permitiendo que la luz incida enfocada en la retina, la cual se encuentra en la parte posterior del ojo. En la retina, la luz es procesada en señales bioquímicas, para ser enviada a través del nervio óptico, como señales eléctricas, al cerebro.⁷

Anatómicamente el ojo se puede dividir en tres capas de acuerdo a sus características (Fig. 2). La primera es la túnica exterior compuesta por una capa fibrosa que comprende la esclerótica, formada por tejido fibroso rico en colágena y que ayuda a dar forma al globo ocular debido a su resistencia, y la córnea, cuya función es ser un medio refringente transparente que permite el paso de la luz.^{6,8}

La segunda capa es la túnica vascular o capa media, altamente pigmentada llamada coroides en el polo posterior, sus funciones son vasculares y además absorbe el exceso de fotones (luz) incidentes en la retina. Hacia el polo anterior la coroides se especializa para formar el iris y el cuerpo ciliar cuya función es de diafragma que regula el paso de la luz así como la acomodación. La tercera capa o túnica nerviosa está formada por la retina que se encuentra localizada en el polo posterior del ojo, es la encargada de convertir el estímulo luminoso en impulsos nerviosos mediante la fototransducción, así esta información visual es transmitida al cerebro a través del

nervio óptico formado por los axones de las células ganglionares de la retina y la vía visual.^{9,10}

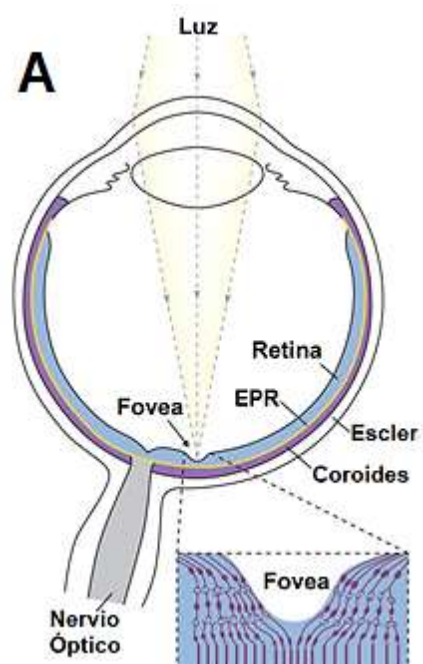


Fig. 1 Estructura del globo ocular. Esquema con las capas del ojo: esclera, coroides, y retina, así como el epitelio pigmentado de retina (EPR). Además señala la fovea, área de mayor agudeza visual en la retina, y el nervio óptico.

1.1.1 Estructura de la Retina

La retina es una extensión del SNC y es la encargada de la captar la luz y transformarla en estímulos químicos para, posteriormente, transmitir esta información como impulso nervioso (estímulos eléctricos) al cerebro. El 80% de la información sensorial que capta el ser humano es a través del sistema visual, específicamente con la retina. Esa información es procesada por cerca de un tercio del encéfalo siendo así el 30% de las señales sensoriales que llegan al cerebro^{6,8}

Histológicamente, la retina está compuesta por 10 capas en las cuales encontramos 6 tipos de células neuronales denominadas: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células horizontales y células ganglionares, y 3 tipos de células gliales: microglía, astrocitos y células de Müller.⁹

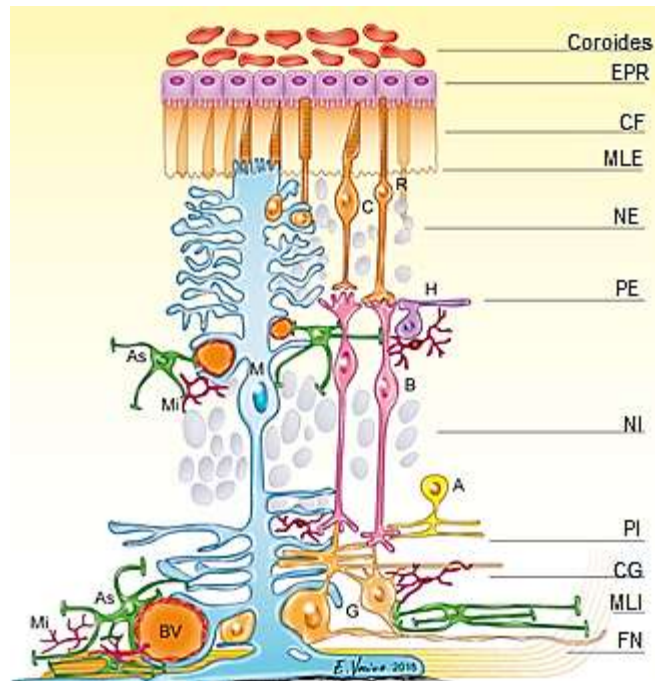


Fig. 2. Representación histológica de las capas y las células que conforman la retina. Epitelio Pigmentado de Retina (EPR); Capa de Fotorreceptores (CF); Membrana Limitante Externa (MLE); Capa Nuclear Externa (NE); Capa Plexiforme Externa (PE); Capa Nuclear Interna (NI); Capa Plexiforme Interna (PI); Capa de Células ganglionares (CG); Membrana Limitante Interna (MLI); Fibras Nerviosas (FN). Podemos encontrar neuronas: Fotorreceptores de dos tipos: conos (C) y bastones (R); bipolares (B); amacrinas(A); Horizontales (H); Ganglionares (G); Así como podemos encontrar células gliales: Astrocitos (As); microglía (Mi) y células de Müller (M).¹¹

Como otros sistemas sensoriales, el ojo posee células encargadas de captar la información del ambiente. Estas células se encuentran en la retina y son llamadas fotorreceptores, capturan la información sensorial externa (luz) y la transforman en impulsos químicos, a través de neurotransmisores, los cuales actúan en las células bipolares y por último en las células ganglionares que transmiten esta información como impulsos eléctricos a través de sus axones, que conforman el nervio óptico, hasta la corteza visual en el cerebro, en donde es procesada en imágenes coherentes.¹⁰

Además de las neuronas en la retina encontramos 3 tipos de células gliales:

- Astrocitos, se encuentran en la retina interna, entre las fibras nerviosas y las células ganglionares, rodean los vasos sanguíneos y forman un soporte para las fibras nerviosas y los capilares de la retina. Proveen de metabolitos neurotróficos y contribuyen al mantenimiento de la barrera hematorretiniana.
- Microglía, que a diferencia de los astrocitos y la glía de Müller tiene un origen embriológico mesodérmico. Se encuentra distribuida en todas las capas de la retina y es la encargada de la respuesta inmune.
- Célula de Müller, considerada como la glía radial del ojo, participa en el mantenimiento homeostático de la retina a través de diferentes funciones fisiológicas que se discutirán posteriormente y es objeto de estudio en la presente tesis.¹¹

1.1.2 Célula de Müller

La célula de Müller constituye la glía más abundante en la retina, encontrándose alrededor de 12,000 células/mm² es decir, de 8 a 10 millones en el humano mientras que en roedores es 1 millón¹². Abarca longitudinalmente casi la totalidad de la retina y mantiene contacto con todos los tipos celulares retinianos. En la figura 3 se muestran diferentes funciones de la células de Müller, sin embargo, entre las funciones más destacables se encuentran:

- Soporte estructural a las neuronas y a los capilares de la retina. Cada célula de Müller constituye el núcleo de una columna de neuronas retinianas que representa la unidad funcional más pequeña para el procesamiento de la información
- Soporte metabólico de las neuronas, provee de energía en forma de ATP y retira los desechos metabólicos.
- Moviliza el exceso de iones potasio y de agua para mantener el equilibrio osmótico, hacia el espacio extrarretinal, vítreo y vasos sanguíneos. Esta capacidad de sifoneo, se debe a que la membrana de la célula de Müller es altamente permeable a este catión.¹³

- Se encarga de la recaptura de neurotransmisores durante la actividad sináptica, los cuales son removidos del espacio perisináptico¹⁴.
- En este punto es importante señalar que, entre los neurotransmisores recapturados se encuentra el glutamato, el cual es utilizado para la producción de glutatión¹⁵. El glutatión es un tripéptido sintetizado a partir de glutamato, cisteína y glicina cuya función en la retina es antioxidante, por esta razón la célula de Müller provee de una protección contra el estrés oxidativo. El glutatión es liberado por la célula de Müller e internalizado por las neuronas, estimándose una concentración intracelular de 3 a 5 mM, mantiene el control del estado de equilibrio oxidación-reducción en las células neuronales, al eliminar los radicales libres, debido a la reducción del H_2O_2 a H_2O , evitando de esa forma un aumento en el estrés oxidativo.¹⁶
- Recientemente, se ha descrito que tiene la capacidad de conducir la luz a través de las capas de la retina hasta los fotorreceptores evitando distorsiones o bloqueos de los fotones.¹⁷
- Secreta factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (bFGF) y Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF). Sin embargo cuando la célula de Müller está expuesta a algún tipo de daño como el aumento en la presión intraocular o la hipoxia, se estimula la producción de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), de c1 Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y de Factor de Necrosis Tumoral ($TNF-\alpha$)¹⁸.

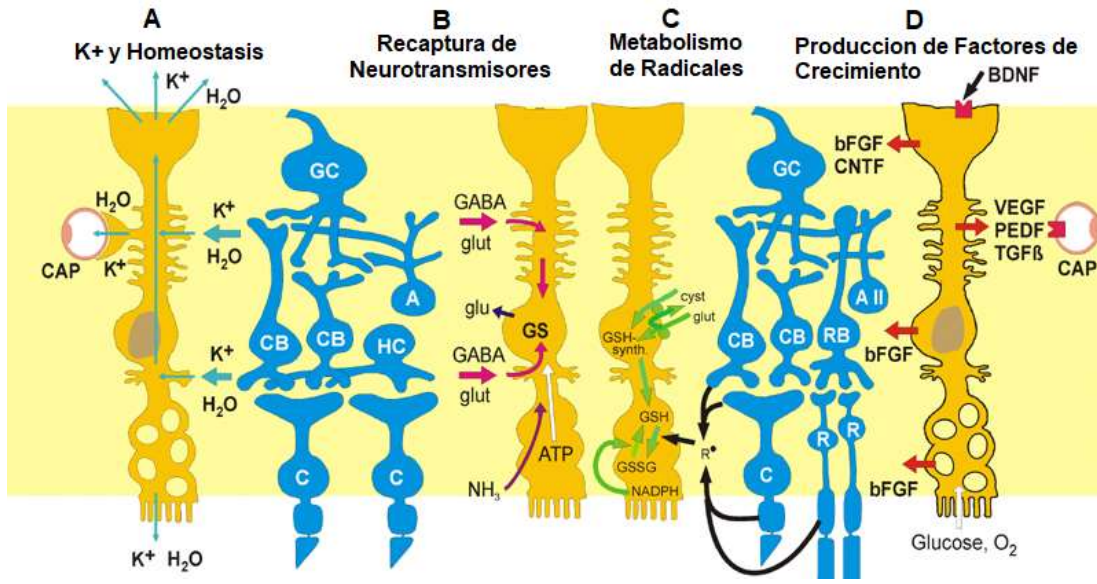


Fig. 3 Algunas de las funciones de la célula de Müller. A) Exporta el exceso de K⁺ fuera de la retina acompañados por una molécula de agua, con lo cual también cumple una función osmótica, retirando el exceso de agua generado por el metabolismo aeróbico de las neuronas retinales. B) Recaptura de neurotransmisores los cuales son removidos del espacio perisináptico. C) Liberación de glutatión, el cual mantiene el control del estado redox de las células neuronales al eliminar los radicales libres, reduciendo el H₂O₂ a agua. D) Secreta factores de crecimiento. (modificado de Giume et al. 2007)

La evidencia experimental reciente sugiere que las células de Müller tienen características de células progenitoras latentes, ya que en respuesta a un daño mecánico o químico, se desdiferencian, proliferan y generan células progenitoras con capacidad neurogénica. Esta capacidad es clara en la retina de organismos como peces, ranas, y otros anfibios^{19,20}, en especial en el pez cebra, cuya célula de Müller es capaz de reprogramar su información génica y adquirir características de células progenitoras, expresando el gen Pax6, importante en el desarrollo embrionario del sistema nervioso, olfatorio y el ojo. Además de Pax6, se expresa el mensajero Crx que codifica la proteína "cone rod homeobox" necesaria para el correcto desarrollo de los fotorreceptores²¹.

La propiedad proliferativa y la obtención de características de progenitoras de células de Müller también se ha observado en retinas de pollo, en donde posterior a una inyección intraocular de FGF, la célula de Müller activa su ciclo celular y expresa factores de transcripción usualmente presentes solo en etapas embrionarias. Un porcentaje de esas células nuevas se diferencian a neuronas y otro grupo da lugar a nuevas células de Müller, pero la mayoría se mantiene como células indiferenciadas con expresión de Pax6 y Chx10, este último es un gen necesario para la proliferación de células progenitoras durante la retinogénesis^{20,22}. En otro estudio con progenitoras derivadas de células de Müller de rata describen cambios en la proliferación posterior a la activación de los receptores de glutamato (NMDA)²³.

Por otro lado, se han obtenido *in vitro* la formación de agregados multicelulares o neuroesferas a partir de cultivos de glía de Müller de mamíferos usando factores de crecimiento, tales como EGF.²⁴ Estas neuroesferas generadas en cultivo expresan marcadores de células progenitoras como Nestina: proteína que conforma los filamentos intermedios del citoplasma de las neuronas primordiales en embriones y está relacionada con funciones como la proliferación, la diferenciación y la migración²⁵; Sox2: encargado de la auto renovación de células embrionarias no diferenciadas y de la inducción de pluripotencialidad de las células madre²⁶; y Pax6: el cual desempeña un papel importante en el desarrollo del ojo, el cerebro y la medula espinal²⁷. Algunos reportes indican la obtención de células con características de progenitoras a partir de células de Müller humanas. Estas células expresan marcadores de progenitoras neurales como Nestina, Ciclina D (proteína expresada en la mayoría de células proliferativas y que regula el ciclo celular), y marcadores como Sox2, Pax 6, Chx10 y Notch1, que participan en el crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis.²⁸

Sin embargo, la adquisición de características de células progenitoras no se observa *in vivo* en la retina de los mamíferos cuando se presenta un daño. En este caso, la célula de Müller recibe las señales de daño e inicia un proceso de proliferación o gliosis, que solo forma cicatrices gliales.²⁹

En la gliosis se observan tres respuestas de la célula de Müller: 1) hipertrofia celular, 2) proliferación y 3) sobre-expresión de proteínas como GFAP, Nestina y Vimentina. Asociado a estos procesos, se ha observado el daño fotooxidativo promueve la producción de interleucina 1- β producida por la microglía, lo cual está asociado con la progresión de patologías retinales, y además promueve la expresión de quimiocinas proinflamatorias Cxcl1, CCL2 y Cxcl10, por parte de células de Müller y el EPR. Estos eventos, contribuyen a la formación de cicatrices gliales, ocasionando la muerte de los fotorreceptores.³⁰ Algunos estudios muestran que en el SNC la gliosis contribuye a la neurodegeneración, además de impedir los procesos de regeneración^{31, 32}

Sin embargo, hasta el momento no se tiene claro porqué la célula de Müller del pez cebra tiene capacidad regenerativa mientras que en los mamíferos es limitada y solo genera una reacción inflamatoria y cicatricial (gliosis).

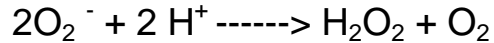
1.2 Estrés Oxidativo

El oxígeno es un gas esencial para la vida tal como la conocemos hoy día, las células anaerobias primigenias producían ATP por medio de la fermentación para así obtener energía. La presencia del oxígeno se convirtió en un agente tóxico forzando a las células a desarrollar mecanismos que permitieran metabolizarlo y contrarrestar su toxicidad. Dentro de estos mecanismos de acción se encuentran enzimas como las catalasas, peroxidasas y la superóxido dismutasa que, al contacto con los radicales productos del oxígeno, los convierten en agua y compuestos inocuos. De esta forma, evolutivamente se da paso al desarrollo de las células aerobias que consumen O_2 y lo reducen a H_2O con los e^- procedentes de la oxidación de nutrientes (NADH, FADH₂).³³

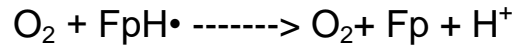
La reducción univalente del oxígeno da como resultado el anión superóxido O_2^- y puede formarse directamente durante el metabolismo mitocondrial o enzimáticamente por la xantina oxidasa y el citocromo P450 las cuales son enzimas citoplasmáticas. Este metabolismo oxidativo se realiza en la mitocondria, en el retículo endoplásmico y en el citoplasma, a través de las siguientes reacciones.³⁴

Mitocondria:

A partir de la dismutación del O_2^- , catalizada por la superóxido dismutasa.

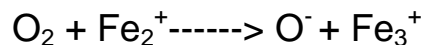


Por la oxidación de la flavina de la NADH deshidrogenasa (FpH•)



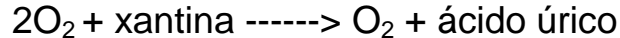
Retículo endoplásmico:

A través del citocromo P450 y de la flavoproteína NADPH – citocromo P450 reductasa:

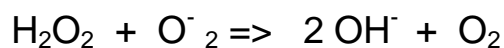


Citosol:

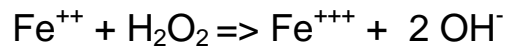
Por acción de la enzima xantina oxidasa:



Para proteger a la célula del posible daño causado por el anión superóxido, la superóxido dismutasa actúa como antioxidante catalizando la dismutación del superóxido en H_2O_2 . Sin embargo, aunque el H_2O_2 no es en sí mismo un ROS, puede producir otras especies reactivas de oxígeno al presentar una reducción univalente en presencia del Hierro (Fe), llamada reacción de Fenton. Esta reacción genera radicales OH^- , que en comparación con el O_2^- son más reactivos³⁵, debido a que interacciona de forma inespecífica causando un mayor daño a nivel tisular. Además, las células no cuentan con un sistema antioxidante contra el OH^- ³⁶. Su formación está dada por la reacción del radical superóxido con el peróxido de hidrogeno a través de la reacción Haber-Weiss



Y por la unión de iones de metal como hierro (Fe), llamada Reacción de Fenton:



Ante la toxicidad que representa la generación de las ROS, los organismos han desarrollado sistemas de defensa antioxidante para prevenir la oxidación de moléculas como lípidos, proteínas o incluso DNA. Estos sistemas incluyen la superóxido dismutasa que cataliza la dismutación del O_2^- a H_2O_2 , el cual puede ser metabolizado por la catalasa o la glutatión peroxidasa a nivel mitocondrial.³⁷

La catalasa tiene como función la degradación del H_2O_2 en agua y oxígeno mientras que la glutatión peroxidasa reduce el H_2O_2 en agua utilizando el glutatión reducido (GSH) como un cofactor, que resulta en la formación de glutatión oxidado (GSSG).³⁸

1.2.1 Estrés Oxidativo Ocular

La retina presenta una alta tasa metabólica debido al proceso de fototransducción que se lleva a cabo en el segmento externo de los fotorreceptores y consiste en la captación de fotones y su transformación en señales químicas y eléctricas. Este proceso genera altas concentraciones de las ROS; por lo tanto, es necesaria una activa protección antioxidante. La generación de ROS, aunado a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados o PUFAS (por sus siglas en inglés) en el segmento externo de los fotorreceptores puede desencadenar una reacción de lipoperoxidación, degradándolos y causando así daño membranal en los fotorreceptores. Por lo tanto, cualquier desbalance en la producción de ROS conlleva a alteraciones en la fototransducción y en consecuencia efectos citotóxicos a nivel celular³⁹. Desde el punto de vista fisiopatológico, el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de múltiples enfermedades oftálmicas como la catarata, la degeneración macular, la queratitis o el glaucoma.³⁹

La capa de los fotorreceptores y el epitelio pigmentario de retina son las zonas más propensas a sufrir daño por estrés oxidativo. El nivel de este daño dependerá de la intensidad y el tiempo de exposición factores de daño, por ejemplo: la exposición

prolongada a la luz que aumenta la producción de H_2O_2 en la membrana nuclear externa de fotorreceptores dando como resultado un proceso de lipoperoxidación.⁴⁰

La lipoperoxidación es la degradación oxidativa de los lípidos, en especial de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) que forman parte de los fosfolípidos de la membrana celular, y se da cuando el radical OH se combina con un hidrógeno de los lípidos presentes en las membranas celulares, dando como resultado agua y un ácido graso radical, el cual es una molécula no estable que reacciona con el oxígeno molecular, creando un radical ácido graso peroxil, que es capaz de reaccionar con otro ácido graso, para producir H_2O_2 o peróxido cíclico y otro ácido graso radical, iniciando de esa forma un ciclo el cual se detiene cuando dos radicales libres se encuentran y producen una especie no radical, esto es posible cuando la cantidad de ROS es lo suficientemente alta para que se de este encuentro, o bien cuando encuentran una molécula antioxidante⁴¹. Es importante señalar que esto ocurre en especial cuando hay presencia de PUFAS debido a que en ellos se encuentran dobles enlaces, los cuales contienen grupos metileno que poseen hidrógenos más reactivos. La lipoperoxidación produce alteraciones morfológicas como la disrupción de membranas, aumento de gránulos de lipofuscina en el epitelio pigmentado de retina.⁴²

Por otro lado, algunos estudios han determinado un aumento en el estrés oxidativo asociado a patologías, como la degeneración macular relacionada a la edad o AMD (por sus siglas en inglés), caracterizada por una ruptura de las estructuras de la macula y pérdida de la visión central. Entre sus causas se han descrito factores genéticos y ambientales como la peroxidación de los lípidos membranales que genera una acumulación de lipofuscina en el epitelio pigmentado de retina, proceso que se relaciona con la progresión de la enfermedad.

Como ya se comentó, la célula de Müller juega un papel preponderante en el soporte antioxidante de la retina, ya que utiliza el glutamato para producir glutatión peroxidasa,

inactivando el H_2O_2 . En respuesta al estrés oxidativo esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Estudios realizados en línea MIO-M1, células de Müller humanas inmortalizadas, en donde evalúan su capacidad de responder al estrés oxidativo, muestran una reducción en el metabolismo mitocondrial y un cambio en el potencial de membrana, sin embargo la viabilidad celular no se ve afectada pues a las pocas horas, se muestra una recuperación de la actividad mitocondrial lo cual evita que se vea afectada la viabilidad celular^{43, 44}. Esto sugiere, que las células de Müller presentan una gran capacidad de amortiguamiento frente al estrés oxidativo.

Se sabe que los ROS participan en la fisiología de las células progenitoras de la zona subventricular y del giro dentado del hipocampo en el sistema nervioso central (SNC). Por ejemplo, cambios en la concentración intracelular de H_2O_2 modulan los procesos de activación y proliferación de estas células progenitoras⁴⁵. Algunos reportes señalan que la producción endógena de H_2O_2 mantiene el crecimiento y la proliferación de las células progenitoras en el SNC⁴⁶. Por otro lado, se ha observado un efecto diferenciador del estrés oxidativo en neuroesferas obtenidas de la zona subventricular⁴⁷. Sin embargo, a pesar de estas evidencias experimentales aún no es claro el mecanismo por el cual el H_2O_2 regula el proceso de neurogénesis en las células progenitoras del SNC.

En cuanto a los mecanismos por los cuales el H_2O_2 genera los efectos antes descritos, Perez-Estrada y su grupo de trabajo, sugieren que la proliferación y la diferenciación pueden verse modificados en cultivos de células progenitoras neurales mediante la sobreexpresión de Sirt2, lo cual llevaría a las células a diferenciarse hacia oligodendrocitos. Sirt2 es una proteína que participa en el control de ciclo celular. Así mismo encontraron que la exposición a peróxido disminuyó la expresión de genes B-III tubulina y Ngn2, relacionados con la diferenciación hacia neuronas⁵. Por su parte Le Belle y su equipo, describen que los efectos de las ROS sobre las células progenitoras

de la zona subventricular son dependientes de la señalización de la vía PI3k/Akt, la cual está siendo regulada negativamente por la exposición al H_2O_2 lo cual parece mantener la autorrenovación y la neurogénesis⁴⁵.

Como consecuencia de un daño químico o mecánico en un tejido, se presenta un incremento en la producción de las ROS⁴⁸. Inclusive, algunos reportes recientes señalan la participación de ROS en las respuestas tempranas de procesos de reparación o regeneración de tejidos en respuesta a un daño⁴⁹. Sin embargo, aún no hay reportes del efecto que tiene el H_2O_2 sobre las células progenitoras obtenidas por el proceso de desdiferenciación de las células de Müller.

2. JUSTIFICACIÓN

El balance entre los procesos de proliferación y diferenciación a través del desarrollo embrionario de la retina se debe principalmente a la participación de factores intrínsecos y extrínsecos⁵⁰. La mayoría de los estudios se centran en el entendimiento de los mecanismos intrínsecos que regulan los procesos de desdiferenciación, proliferación y diferenciación celular^{51,52}. Sin embargo, esta misma evidencia experimental señala la participación de factores ambientales o extrínsecos que pudieran participar en estos procesos celulares. Diversos trabajos de investigación reportan un efecto del estrés oxidativo en el proceso de neurogénesis de células progenitoras neurales y oligodendrocitos^{5,44,46}. Sin embargo, es muy escasa la información acerca de la posible relación entre el estrés oxidativo y los procesos de desdiferenciación de células progenitoras provenientes de células de Müller. Dilucidar esta posible interacción nos permitirá conocer más a fondo los mecanismos celulares que participan en el proceso de desdiferenciación de células progenitoras derivadas de glía de Müller en un modelo *in vitro*.

3. HIPÓTESIS

La exposición a estrés oxidativo modula el proceso de desdiferenciación en las células progenitoras derivadas de la glía de Müller de retinas de mamíferos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Investigar si el estrés oxidativo, generado por la exposición a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), modula el proceso de desdiferenciación de células progenitoras retínales cultivadas *in vitro* y obtenidas a partir de glía de Müller de retina de ratón.

4.2 Objetivos Particulares

- Establecer si la exposición a H_2O_2 regula el proceso de desdiferenciación de las células progenitoras, derivadas de células de Müller.
- Determinar si las células expuestas a H_2O_2 preservan su naturaleza progenitora o se diferencian.

5. MÉTODOS Y METODOLOGÍA

5.1 Sujetos

Todos los ensayos fueron llevados a cabo *in vitro*, empleando células de Müller obtenidas de la retina de ratones de la cepa CD-1, de 6 a 8 días de nacidos, de sexo indistinto, del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Número de proyecto 083-602-17.

5.2 Cultivo primario de células de Müller

Para realizar los cultivos primarios de células de Müller de retina de ratón, los animales fueron sacrificados por decapitación, para posteriormente extraer los globos oculares que se incubaron en medio "Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12" suplementado con penicilina/estreptomicina 1% (PenStrep, Gibco #15140-122) y suero fetal bovino al 10% (SFB, Gibco #26140-079) durante toda la noche a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación constante.

Pasado este tiempo, se retiró el medio y los globos oculares fueron incubados por 15 minutos a 37° C en la incubadora en tripsina-verseno (Tripsina 0.05% Verseno 0.05% In Vitro #180206) y colagenasa 2% (sigma, C0130-100MG 2.5 mg/mL) para posteriormente hemisectar el globo ocular y retirar la retina, la cual fue disociada de forma mecánica. El homogenizado se cultivó en DMEM-F12 suplementado con SFB 10% y Factor de Crecimiento Endotelial 4 ng/mL (hEGF, Roche 11376 454 001) en la incubadora a 37° C con un 5% de CO₂ en cajas Petri de 60 (Corning CO101353001). A las 72 horas se realizó un cambio de medio (DMEM-F12 suplementado SFB 10%) para retirar células muertas y al quinto día, o con una confluencia mayor al 85%, se realizó la resiembra del cultivo (R1).

Para realizar la resiembra, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con buffer salino de fosfatos (PBS pH7.4 1x Gibco #10010-023), posteriormente se levantó el cultivo utilizando tripsina-verseno, 750 µL por 15 minutos en la incubadora. Pasado este tiempo se inhibe la tripsina con inhibidor de Tripsina (Gibco #17075-029) en DMEM-F12 al 10%. Las células se recuperan en un tubo de 15 mL y se centrifugan a

1000 rpm durante 5 minutos, se decanta el medio y se resuspenden las células con 1mL de medio DMEM-F12 y se realiza un conteo celular por cámara de Neubauer. Posteriormente, se resiembran de nuevo (R2) en una caja Petri de 60 con DMEM-F12 suplementado con SFB 10%. Posteriormente se desdiferenciaron las células de Müller a células progenitoras.

5.3 Desdiferenciación y Obtención de Neuroesferas

Para desdiferenciar las células de Müller hacia células progenitoras, los cultivos de células de Müller, después de la segunda resiembra, fueron expuestos a un medio con DMEM-F12 suplementado con B27 al 1% (B-27™ Supplement (50X), minus vitamin A Gibco #12587-010) y EFG y FGF (hFGF Roche #11120417001) en una concentración de 4 ng/mL de cada factor. Pasadas 72 horas se obtienen neuroesferas.

5.4 Exposición a H₂O₂

Para la exposición de las células progenitoras al H₂O₂ (Hydrogen Peroxide Solution; Sigma-Aldrich # H1009-500ML) se construyó una curva concentración-respuesta para determinar la concentración en la que induce un efecto sobre la viabilidad de las células progenitoras. Basados en estudios que exponen células de Müller (MIO-1) a H₂O₂ a concentraciones que no generan toxicidad, decidimos utilizar las siguientes concentraciones: 2.5µM, 50 µM y 150 µM³⁷

El tiempo de exposición de las neuroesferas al H₂O₂ fue de 2 horas, este se adicionó al medio de cultivo (DMEM-F12 + B27 1%) para posteriormente recuperar las células y resembrarlas en medio diferenciador en multipozos de 12, colocando 1X10⁴ células por pozo. Después de 48 horas se realizaron ensayos para evaluar la viabilidad de las células y de esta forma conocer la dosis segura.

Un segundo ensayo se realizó exponiendo las neuroesferas al H₂O₂ en las mismas concentraciones anteriormente usadas, por 72 horas. Una vez obtenidas las neuroesferas estas se disgregaron con tripsina y se resembraron en DMEM-F12 + B27 + factores de crecimiento (FGF, EGF) adicionando H₂O₂ en tres concentraciones 2.5, 50 y 150 µM, para posteriormente hacer ensayos para evaluar la actividad metabólica para saber la viabilidad de las células y determinar la dosis segura.

En el tercer y último ensayo se expusieron las neuroesferas al H_2O_2 por 2 horas, agregando el H_2O_2 al medio de cultivo, para posteriormente recuperarlas y hacer pruebas de viabilidad.

Una vez obtenido el tiempo y la dosis donde hay un efecto sobre viabilidad celular, las células fueron expuestas al medio de diferenciación, este proceso fue evaluado con ensayos de inmunofluorescencia.

5.5 Prueba de viabilidad celular por ensayos de actividad metabólica

La viabilidad celular se midió a través de ensayos colorimétricos basados en la acción de las deshidrogenasas celulares. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazán, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Es un método utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido y se mide a una absorbancia de 560 nm. Para esto se usó el kit Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay de Thermo Fisher Scientific.

En el caso de los ensayos con Cell Counting Kit-8 (cck-8 Sigma #96992), su principio es la reducción de sal de tetrazolio WTS-8 a través de 1-Methoxy PMS (metoxisulfato de metoxifenazina) mediante la actividad de la deshidrogenasa (NAD(P)H), esto da como resultado un colorante anaranjado cuya intensidad es directamente proporcional al número de células vivas. Se mide a una absorbancia de 460 nm.

5.6 Caracterización de las Células por Inmunofluorescencia

Se realizaron inmunofluorescencias en cultivos primarios de células de Müller obtenidas de la segunda resiembra para identificar los marcadores que expresan. Las células se sembraron en cubreobjetos de cristal tratados con 150 μ L de gelatina al 1% (sigma Aldrich #G9391) incubados a temperatura ambiente por 1 hora, pasado ese tiempo los cubreobjetos se lavaron 5 veces con 150 μ L de agua destilada estéril y se dejó secando 1 hora más, posteriormente se sembraron las células y se incubaron en dos ensayos, uno de 3 y otro de 12 horas, esto para saber si el tiempo influye en la diferenciación. Pasado ese tiempo fueron fijadas con para formaldehído al 4%, luego

fueron lavadas (3 veces, 5 minutos cada una) con PBS (solución salina tamponada con fosfato 10x, pH 7.4 Gibco # 70011044) suplementado con 0.1% de BSA (albúmina bovina sérica Equitech-Bio, Inc. #BAC62), y bloqueadas con solución de bloqueo, PBS-BSA 0.1%, SFB 10% y tritón 3% (Triton x100 Sigma x100-1L) por una hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: CRALBP 1:500 (SantaCruz #sc-376052) como marcador de células de Müller, Nestina 1:300 (Cell-Signalling #4760T) para identificar células neurales y Sox2 1:200 (SantaCruz #sc-365964) como marcador de células progenitoras. Seguido por la incubación con anticuerpo secundario por 1 hora acoplado a Alexa Fluor 488. El núcleo se tiñó con Hoechst 2 µg/mL (Hoechst 34580 Sigma 63493-5MG) por 20 minutos. Las laminillas fueron montadas con solución de montaje Fluoromount (Electron Microscopy sciences #17984) y las imágenes fueron obtenidas y analizadas utilizando el equipo Cytation 5 (BioTek™ Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader).

Para determinar los marcadores expresados en las neuroesferas obtenidas a partir de las células de Müller, así como el efecto por la exposición a H₂O₂ en la desdiferenciación, las células fueron fijadas en cubreobjetos pretratados con gelatina 1% y se incubaron por 3 y 12 horas para posteriormente fijarlas y realizar la inmunofluorescencia con el método descrito anteriormente. Se usaron los mismos marcadores, Sox2, Nestina y CRALBP.

5.7 Preincubación con α-tocoferol

Para confirmar que el efecto observado sea producido por el H₂O₂, las células se preincubaron por 24 horas en un antioxidante. En este caso usamos α-Tocoferol en una concentración de 200 µM. Una vez pasadas las 24 horas las células fueron expuestas a H₂O₂ por 2 horas, se fijaron en cubreobjetos, se incubaron por 12 horas, y se les realizaron inmunofluorescencias

5.8 Análisis estadístico

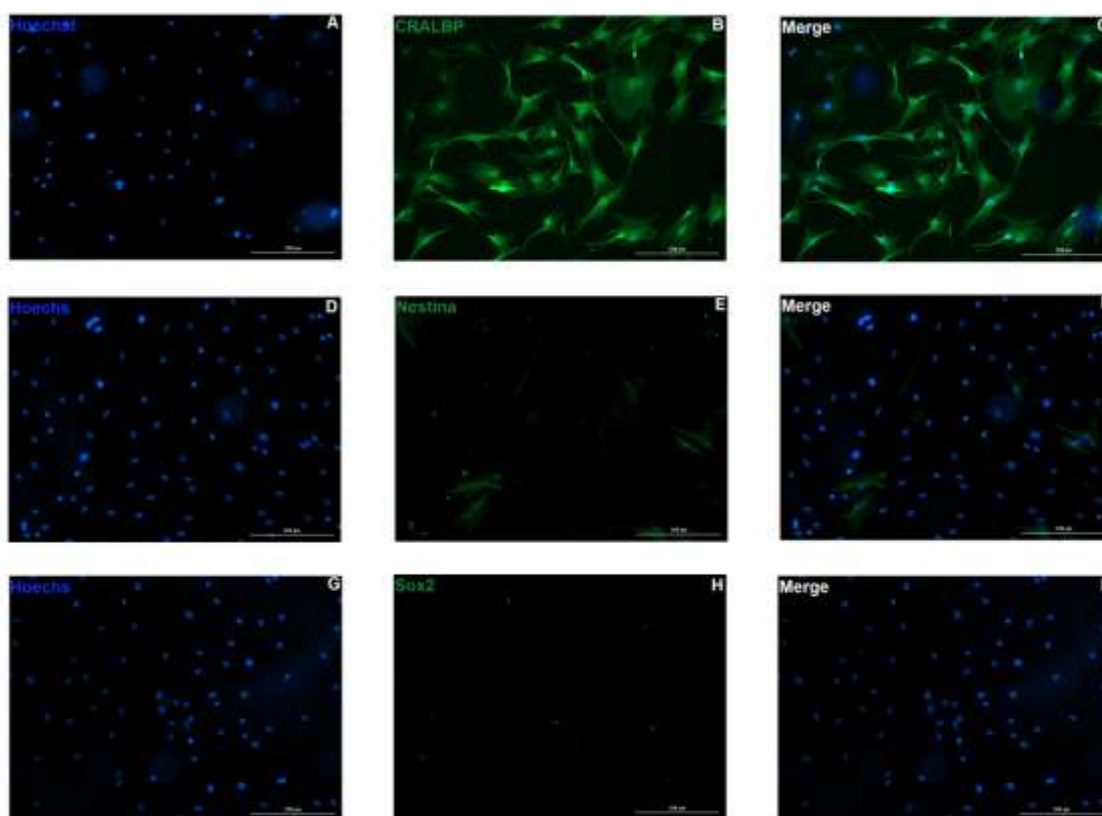
Todos los resultados son reportados con la media de al menos 3 experimentos independientes. La significancia se evaluó utilizando ANOVA de una vía, seguido de una prueba Post hoc de Bonferroni para realizar las comparaciones múltiples.

6. Resultados

6.1 Cultivos Células de Müller

Inicialmente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en cultivos primarios de células de Müller para determinar la presencia CRALBP y de marcadores para progenitores neurales, como Nestina y Sox2. (Fig. 4).

Como se aprecia en la Fig. 4 A-C, la mayoría de las células en el cultivo son CRALBP+, (96.18%), lo que sugiere que nuestro cultivo no contiene contaminación por algún otro tipo glial. En el caso de los marcadores para células progenitoras, el porcentaje de células Nestina+ es de 10.83% (Fig.4 D-F) mientras que Sox2 (Fig.4 G-I) es de un 6.73%. Estos resultados indican que algunas células de Müller en cultivo coexpresan marcadores de células progenitoras. Esta observación, reforzaría la hipótesis de las células de Müller como progenitoras latentes en mamíferos.



Marcadores Expresados en Células de Müller

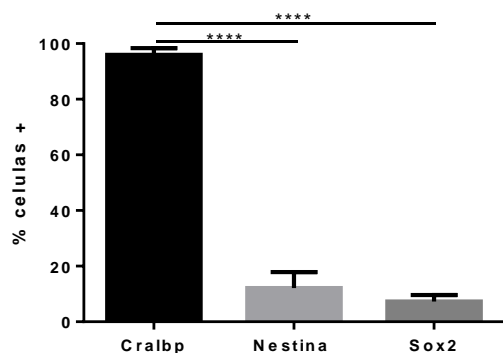


Fig 4. Expresión de marcadores celulares en glía de Müller cultivada *in vitro*. La gráfica muestra que el 96.18% son células CRALBP+ (A-C), mientras que Nestina son el 10.83% (D-F) y Sox2 del 6.73% (G-I). En azul se muestra la tinción de los núcleos con Hoechst. Barra en el panel superior: 200 μ M. . El resultado es el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde ****p <0.001, por ANOVA de una vía. Barra: 200 μ m

6.2 Obtención de Neuroesferas

Con el modelo de desdiferenciación de células de Müller, se obtuvieron neuroesferas de un diámetro de 75-100 μm (Fig. 5) a las 72 horas de cultivo. Para determinar si presentan marcadores característicos de células progenitoras, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para CRALBP, Nestina, y Sox2.



Fig.5 Fotografía representativa de neuroesferas derivadas de células de Müller obtenidas después de 72 horas de cultivo en condiciones de desdiferenciación.
Barra: 100 μm

6.3 Caracterización de Neuroesferas

Los resultados de las inmunofluorescencias muestran que las células que conforman a las neuroesferas mantienen la expresión de CRALBP (Fig.6 D-F). Por otro lado, estas neuroesferas también fueron positivas para Nestina (Fig.6 D-F) y Sox2 (Fig.6 G-I).

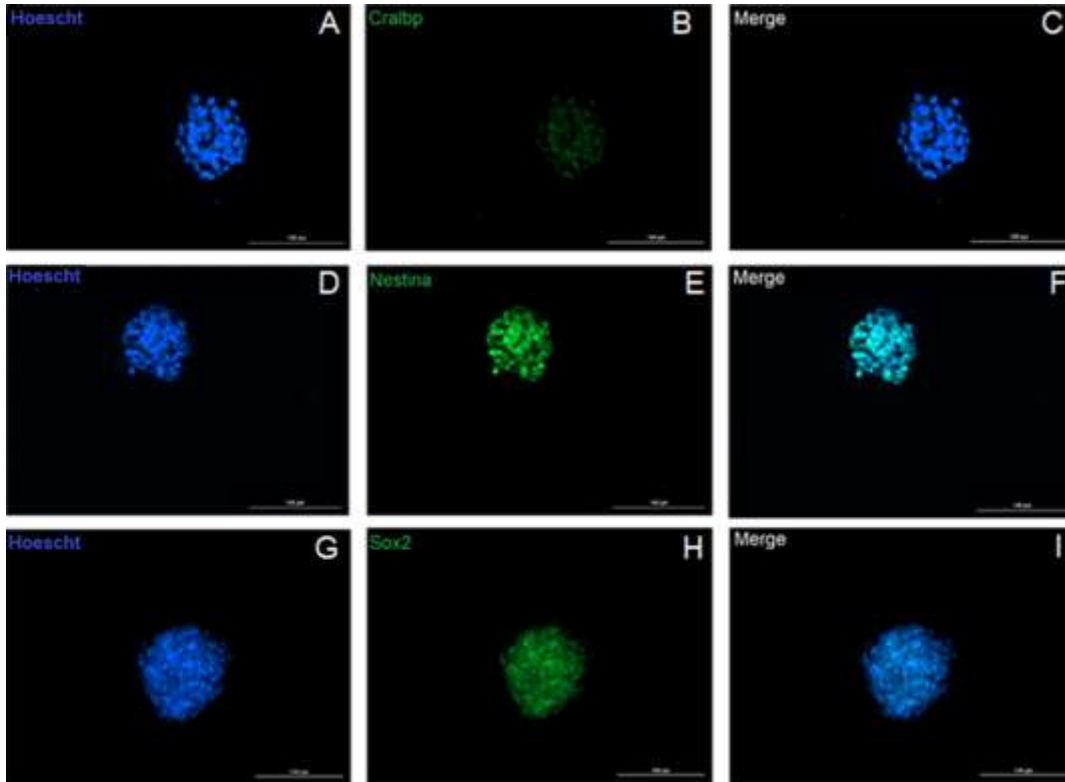


Fig.6 Ensayos de inmunofluorescencia de neuroesferas obtenidas de la dediferenciación de células de Müller en cultivo. A) Muestra neuroesferas obtenidas mayores a 100 μ M. B-I) Se observa que las neuroesferas son positivas a Nestina, Sox 2 y a CRALBP. En azul se muestra la tinción de los núcleos con Hoechst. Barra: 200 μ m.

Para determinar si esta expresión de marcadores no se debía a una inespecificidad por la forma esférica de la neuroesfera, estas se disgregaron de forma mecánica y se cultivaron como células disgregadas para posteriormente realizar la inmunofluorescencia. En la Fig. 7 se observa que, a pesar del proceso de dediferenciación, las células disgregadas de la neuroesfera (CDN) (38.90%) mantienen la expresión de CRALBP (Fig.7 A-G), sin embargo hay una diferencia significativamente menor en comparación con el cultivo de células de Müller. Por otro lado, las células positivas a Nestina (71.70%) (Fig.7 H-N) aumentaron significativamente en comparación con el cultivo de Müller (10.83%), de la misma forma Sox2 aumentó su expresión de un 6.73% en el cultivo de Müller a 72.12% (Fig.7 O-U). Estos experimentos muestran claramente el incremento en la expresión de los

marcadores de células progenitoras y una disminución en el marcador de células de Müller, reafirmando su capacidad de progenitora latente, sin embargo, estas células no pierden su naturaleza glial durante el proceso de desdiferenciación.

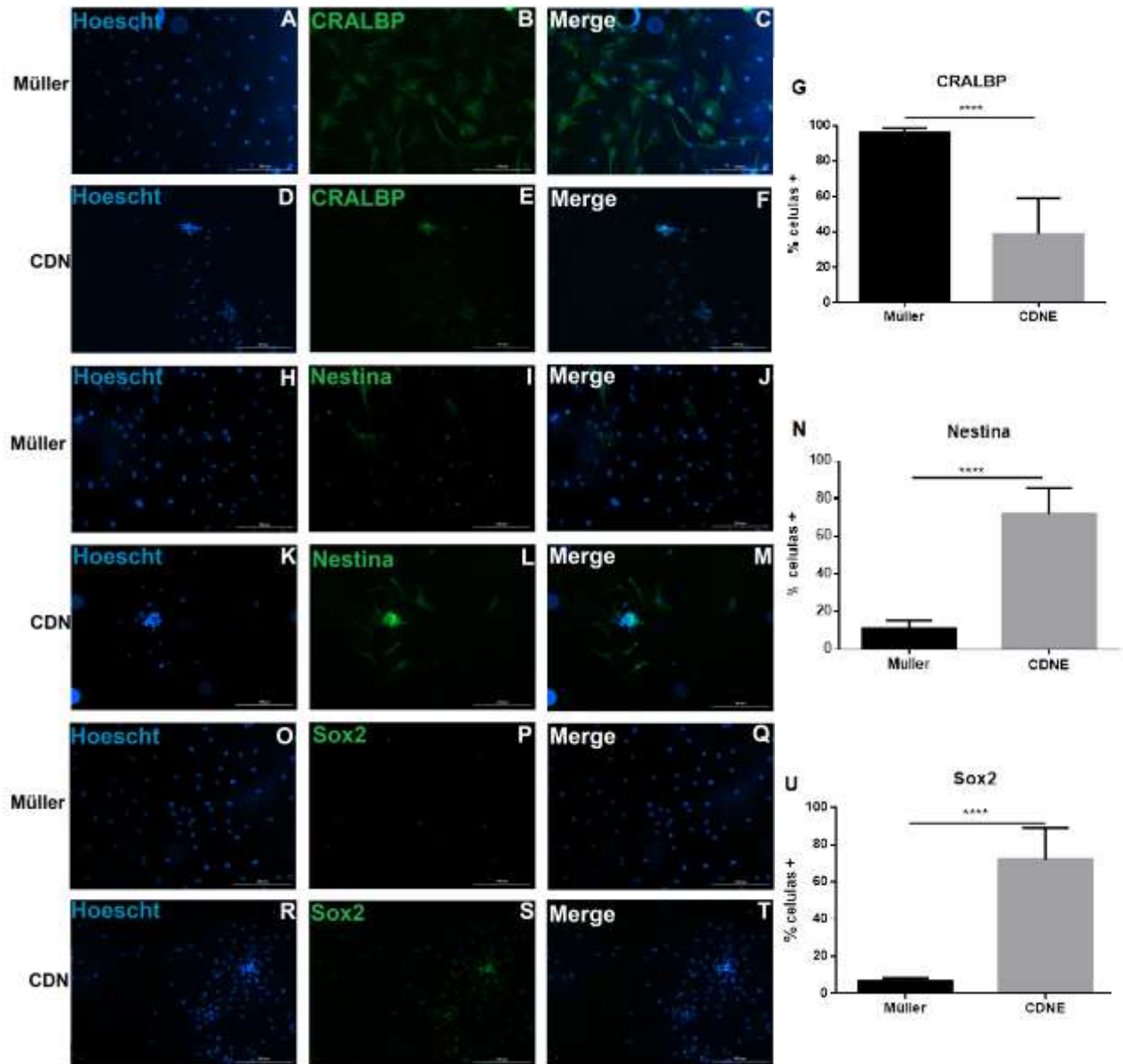


Fig. 7 Comparación de la expresión de marcadores celulares en células de Müller y células disgregadas de neuroesferas (CDN). Se muestra el porcentaje de células CRALBP+ (95.55%), Nestina+ (10.88%) y Sox2+ (6.66%) en un cultivo de células de Müller comparándola con las CDN. Se observa que la expresión de CRALBP disminuye significativamente en CDN, mientras que Nestina y Sox2 aumenta su expresión significativamente. La tinción de los núcleos fue hecha con Hoechst. El resultado es el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde **** $p < 0.001$, por ANOVA de una vía. Barra: 200 μ m

6.4 Exposición a H₂O₂

Curva concentración -respuesta H₂O₂

Para determinar la participación de ROS en el proceso de desdiferenciación de células de Müller, determinamos la concentración de H₂O₂ que produjera menor toxicidad para las células. Para esto, se realizó una curva concentración-respuesta, considerando las concentraciones previamente utilizadas por otros grupos. (Peters, S. 2017; Toft-Kehler, A. 2016). En estas condiciones, la viabilidad celular se determinó por actividad mitocondrial.

Las células fueron expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de H₂O₂ (2.5, 50 y 150µM), posteriormente fueron resembradas en medio de desdiferenciación fresco (DMEM +B27 + factores de crecimiento) sin H₂O₂ por 72 horas, para finalmente realizar ensayos de viabilidad celular. Como se observa en la figura 8, no hay diferencias significativas entre el control y las diferentes concentraciones de H₂O₂ a las que fueron expuestas las células.

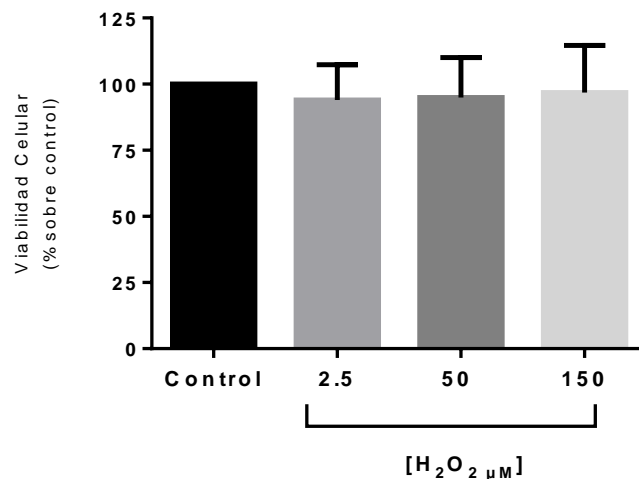


Fig. 8 Ensayo de viabilidad celular por MTT en células progenitoras expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de H₂O₂. No se observan cambios significativos, respecto al control en la viabilidad celular con ninguna de las concentraciones de H₂O₂ utilizadas. El resultado es el promedio de 3 experimentos ± SD en donde si *p<0.10, por ANOVA de una vía.

Ampliamos el tiempo de exposición al H_2O_2 a 72 horas con las mismas concentraciones. En este caso se observó un pequeño cambio significativo en la viabilidad celular, a 150 μM (Fig. 9). Estos resultados muestran que el H_2O_2 no genera ningún tipo de efecto tóxico en las células expuestas a diferentes concentraciones. Este resultado era el esperado, debido a que las células de Müller tienen un eficiente metabolismo oxidativo que le permite amortiguar condiciones de estrés oxidativo en la retina. Esta característica podría ser la responsable de mantener la viabilidad celular, e inclusive del incremento que se observó a las 72 horas de exposición con 150 μM de H_2O_2 .

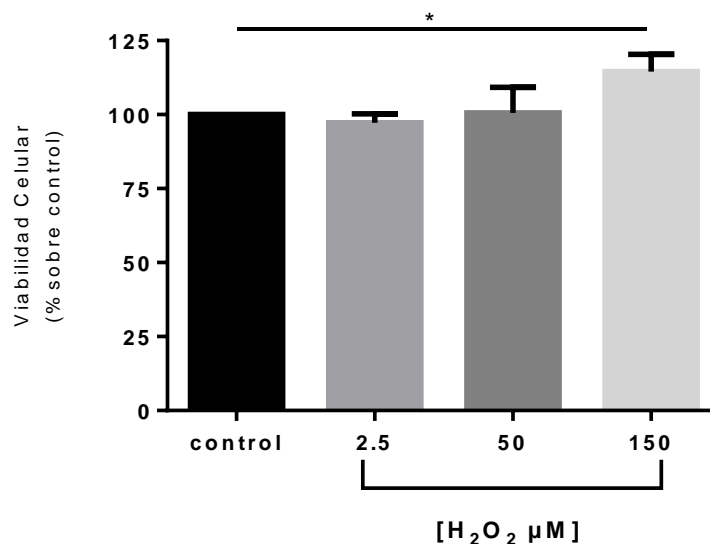


Fig.9 Ensayo de viabilidad celular en neuroesferas expuestas por 72 horas a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Se observan cambios significativos, respecto al control, con 150 μM de H_2O_2 . El resultado es el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde $*p < 0.01$, por ANOVA de una vía.

6.5 Inmunofluorescencias de las células expuestas a H₂O₂

Una vez determinada la concentración de H₂O₂ a utilizar, se investigó su efecto en el proceso de desdiferenciación. Las neuroesferas se expusieron a 150 µM de H₂O₂ por 2 horas, posteriormente fueron disgregadas mecánicamente. Las células disgregadas de neuroesferas (CDN) fueron sembradas en cubreobjetos para su diferenciación por 3 h como se describe en la metodología.

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron contra marcadores de glía de Müller (CRALBP), de células progenitoras (Sox2) y de precursores neurales (Nestina). En el caso de CRALBP se observa un incremento significativo en las células CRALBP+ (76.22%) comparado con el control (38.90%) (Fig. 10 A-G). Esto indicaría que la exposición a H₂O₂ mantiene a las células principalmente con características gliales.

Nestina (Fig. 10 H-N) presenta una ligera disminución en su expresión en presencia de H₂O₂ (61.69%) comparando el control (71.71%), sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa. Para el caso de las inmunofluorescencias contra Sox2 (Fig. 10 O-U) su expresión disminuye de manera significativa en las células expuestas a H₂O₂ (43.18%), control (72.12%). Estos datos indican que el H₂O₂ modula de forma negativa la expresión de marcadores de progenitores y precursores neuronales, disminuyendo aún más la capacidad progenitora de las células Müller bajo condiciones de estrés.

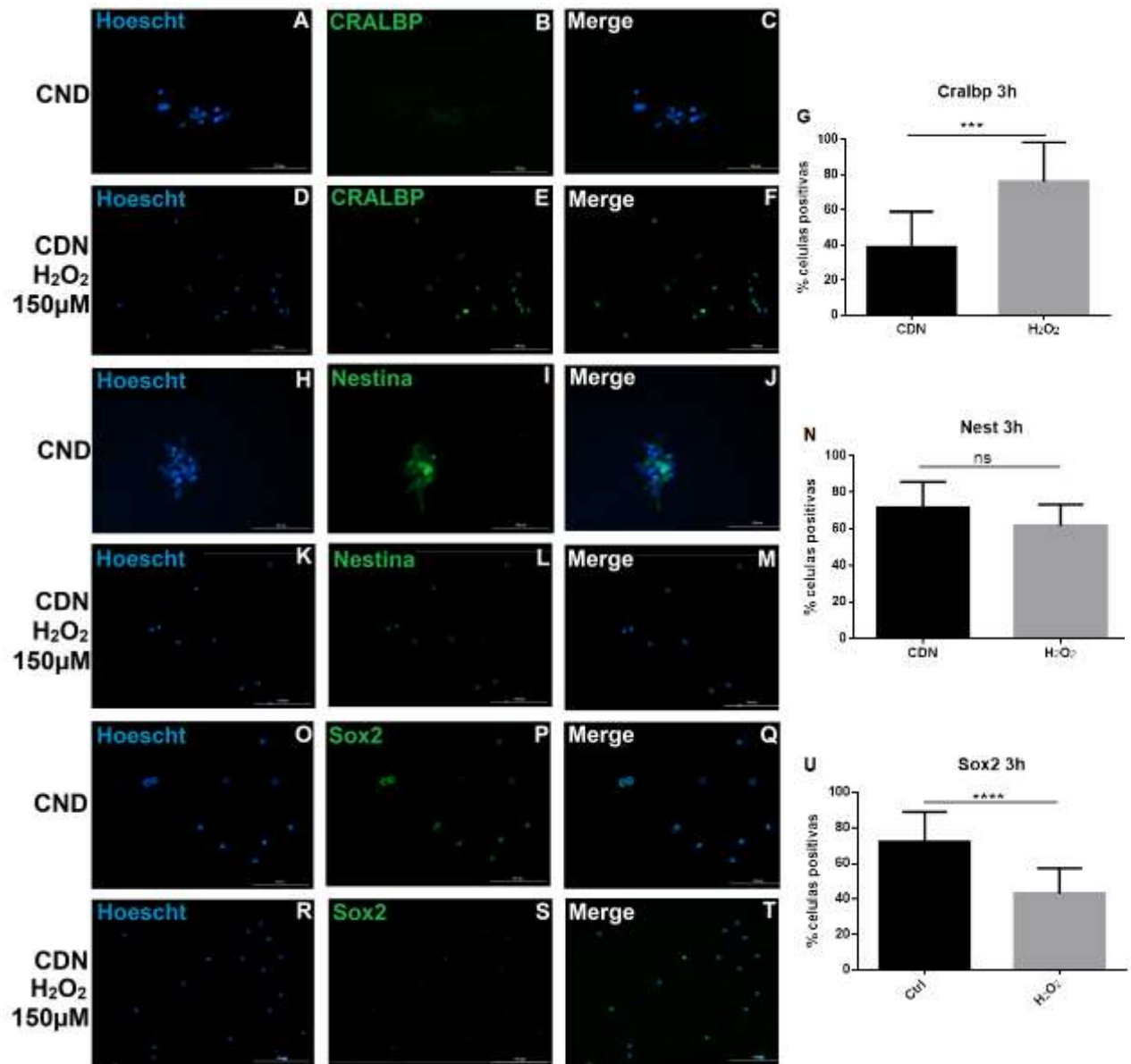


Fig. 10. Efecto del H₂O₂ en la CDN. Las CDN que fueron expuestas a H₂O₂ 150 μ M por 2 horas y expuestas por 3 horas a diferenciación, aumenta significativamente la expresión de CRALBP (A-C) en comparación con el control (D-F), mientras que la expresión de Nestina (G-I) se mantiene sin cambios significativos con respecto al control (J-L) Mientras que la expresión de Sox2 (M-O) disminuye significativamente en comparación con el control (P-R). La tinción de los núcleos fue hecha con Hoechst. El resultado es el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde * p < 0.01, por ANOVA de una vía. Barra: 200 μ m

El proceso de diferenciación celular puede aumentar con el tiempo, por esta razón, decidimos ampliarlo a 12 horas. En este caso, observamos que CRALBP (Fig.11 A-G) presenta el mismo patrón de aumento en la expresión (77.91%), significativamente diferente al control (45.76%) e inclusive mayor a la observada a las 3h de diferenciación.

Para el caso de Nestina (Fig.11 H-N) y Sox2 (Fig.11 O-U), se observa una disminución de su expresión a las 12 horas de diferenciación, esta disminución es estadísticamente significativa con respecto al control. Nestina muestra una expresión en el 49.86% en las células expuestas a H₂O₂ contra el 77.77% del control. Mientras que para Sox2 solo el 34.86% fueron células positivas después de la exposición al H₂O₂, mientras que para el control fueron el 87.79% de las células.

Estos resultados refuerzan nuestra observación acerca del efecto negativo del H₂O₂ en la expresión de marcadores para progenitores neurales en las células de Müller desdiferenciadas. Por lo tanto, podemos decir que la exposición a condiciones de estrés oxidativo, genera una pérdida de las características progenitoras que adquieren las células de Müller durante su desdiferenciación.

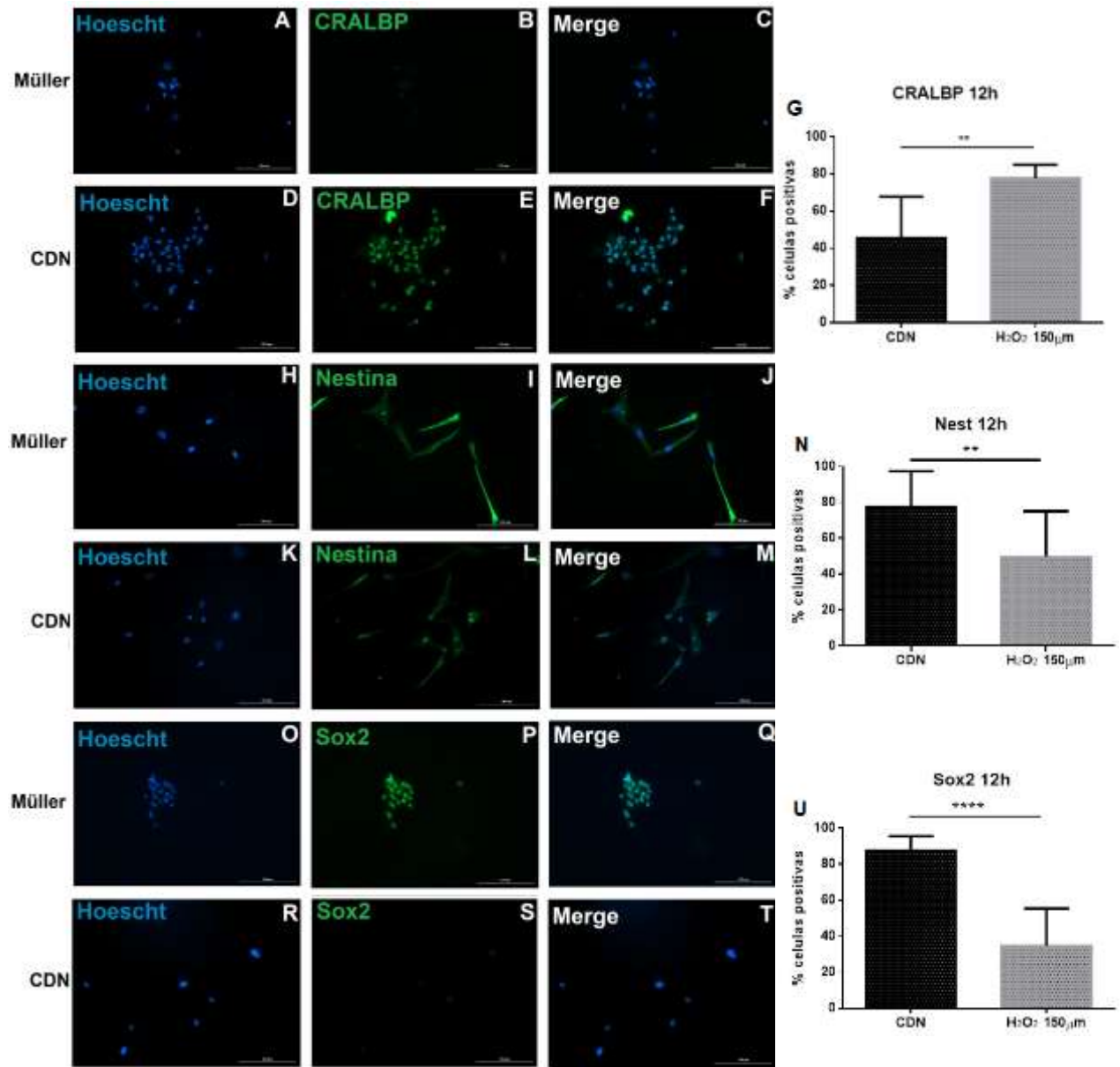


Fig. 11 Las CDN que fueron expuestas a H₂O₂ por 2 horas u diferenciadas en gelatina por 12 horas aumenta significativamente la expresión de CRALBP en comparación con el control (A-G). Mientras que se mantiene la expresión de Nestina en comparación con el control (H-N). La expresión de Sox2 en comparación con el control se reduce significativamente (O-U). La tinción de los núcleos fue hecha con Hoechst .El resultado es el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde sí *p <0.01, por ANOVA de una vía. Barra: 200 μ m

En la figura 12 se puede apreciar un comparativo en la expresión de los diferentes marcadores entre los dos tiempos de diferenciación en la matriz (3h y 12h) de las células expuestas a H₂O₂. El comportamiento para CRALBP es el mismo, un incremento de células CRALBP+ 76.22% desde las 3 horas a las a las 12 horas 77.91%.

Mientras que Nestina y Sox2 (Fig. 12 B y C) la proporción cambia, disminuyendo el número de células Nestina+ significativamente hasta las 12h, mientras que a las 3h no hay diferencia significativa. Por otro lado las células Sox2+ disminuyen desde las 3 horas (43.18%) de diferenciación con respecto al control, tendencia que continua hacia las 12 horas (34.86%). Interesantemente, las células control muestran un incremento significativo en la expresión para del Sox2, (control 3 h 70.51%; control 12 h 87.79%) (Fig.12 C) diferencia no observada en CRALBP y Nestina. Esta observación comprueba que las células progenitoras generadas a partir de células de Müller, efectivamente presentan características de progenitoras durante su diferenciación, sin embargo esta capacidad disminuye en presencia de una condición de estrés oxidativo H₂O₂.

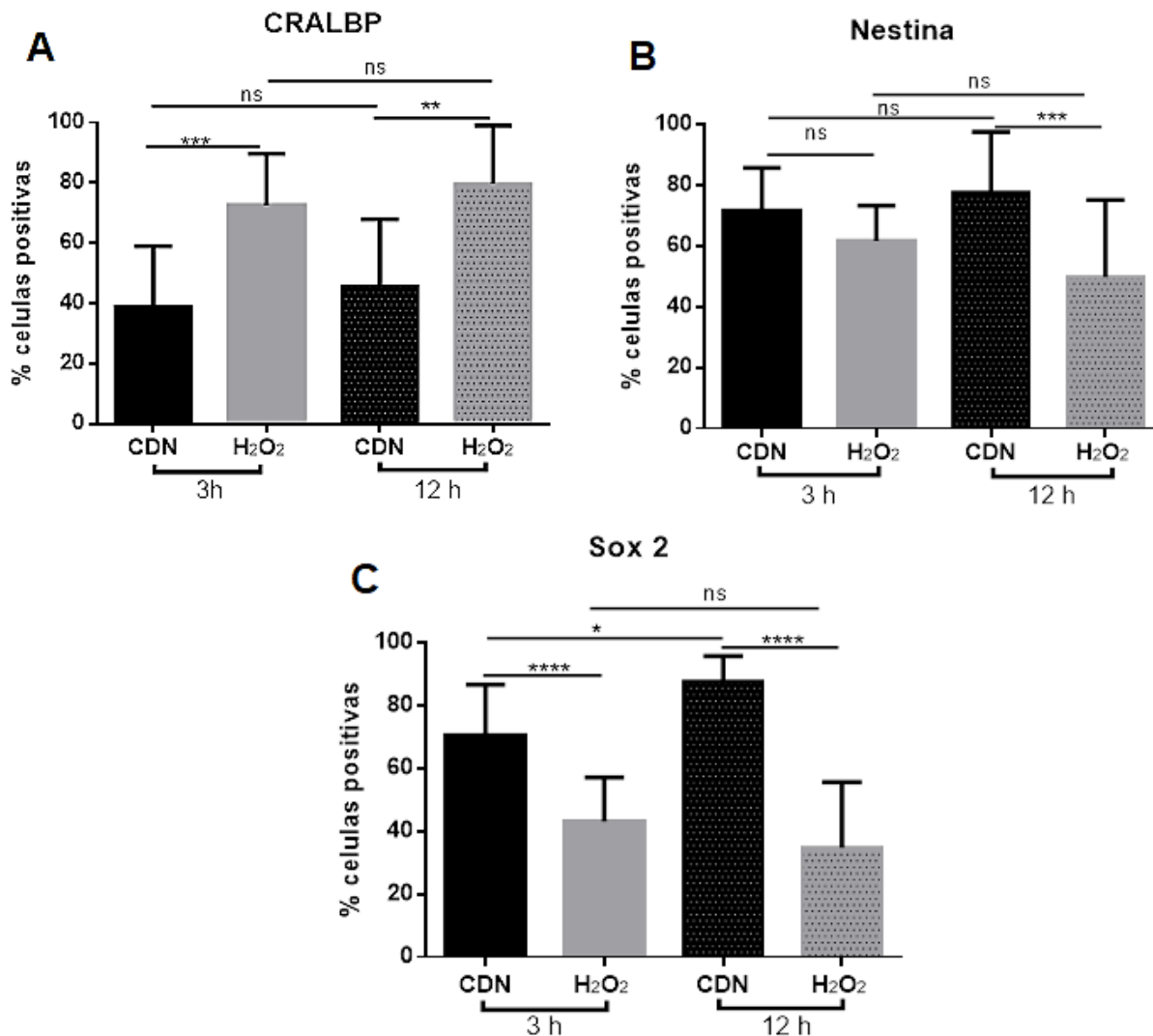


Fig. 12 Expresión de marcadores respecto al tiempo de diferenciación en CDN. A) En la expresión de CRALBP podemos observar que la diferencia con respecto al control se mantiene a las 12h de diferenciación, sin embargo no hay diferencias entre estas ni entre los controles con respecto al tiempo. B) En Nestina se observa que a diferencia de las 3 horas, la expresión muestra una disminución significativa con respecto al control a las 12 horas de incubación. C) En Sox2 se observa que la disminución en su expresión se mantiene con respecto al control en el tiempo, sin embargo es interesante resaltar que las células control muestran un incremento significativo a las 12h comparado con las 3h. El resultado es el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde sí * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$, por ANOVA de una vía

6.6 Exposición a α -tocoferol

Para confirmar que el efecto observado era producto de la exposición a H_2O_2 decidimos usar α -Toc como antioxidante (200 μ M), este compuesto se incubó durante 24 horas previo a la exposición de H_2O_2 150 μ M (2 h). Posteriormente, las células fueron diferenciadas por 12 horas, tiempo en donde observamos una diferencia significativa en la expresión de los marcadores entre control y las condiciones con H_2O_2 150 μ M. Los resultados muestran una expresión de los marcadores para progenitores neurales similar a la observada en las condiciones control.

La inmunofluorescencia en los cultivos pretratados con 200 μ M de α -Toc y expuestos a H_2O_2 muestran que el 45.51%, de las células fueron CRALBP+, mientras que para las expuestas a H_2O_2 , el 77.83% fueron CRALBP+. En el caso de las CDN, el 47.56% fueron positivas para este marcador glial, lo que no muestra una diferencia significativa con las pretratadas con α -Toc (Fig.13 A-J). Estos resultados sugieren que el antioxidante genera una disminución en la expresión de CRALBP+, en donde no hay diferencia con las células control (CDN).

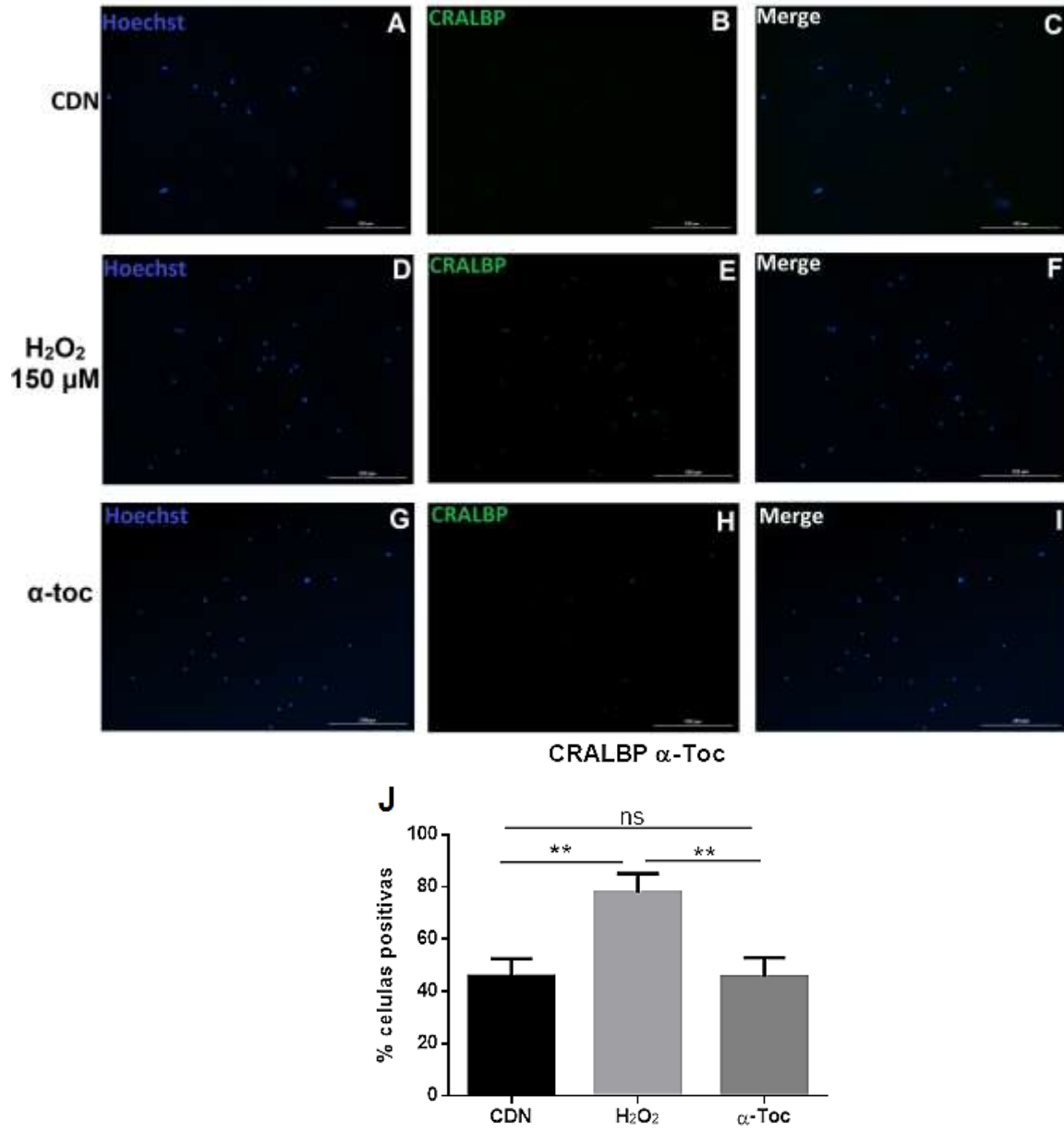


Fig. 13 Efecto del α -Toc en la expresión marcadores celulares respecto al tiempo de exposición. A-C expresión de CRALBP en células control. D-F células expuestas a H₂O₂ se observa que hay un aumento en la expresión de células positivas a CRALBP lo cual es una diferencia significativa (J). G-I células pretratadas con α -Toc, se observa que una disminución expresión parecida al control, estos resultados parecen iniciar una diferenciación hacia células gliales. La tinción de los núcleos fue hecha con Hoechst. El resultado el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde sí **p < 0.05, por ANOVA de una vía. Barra: 200 μ m

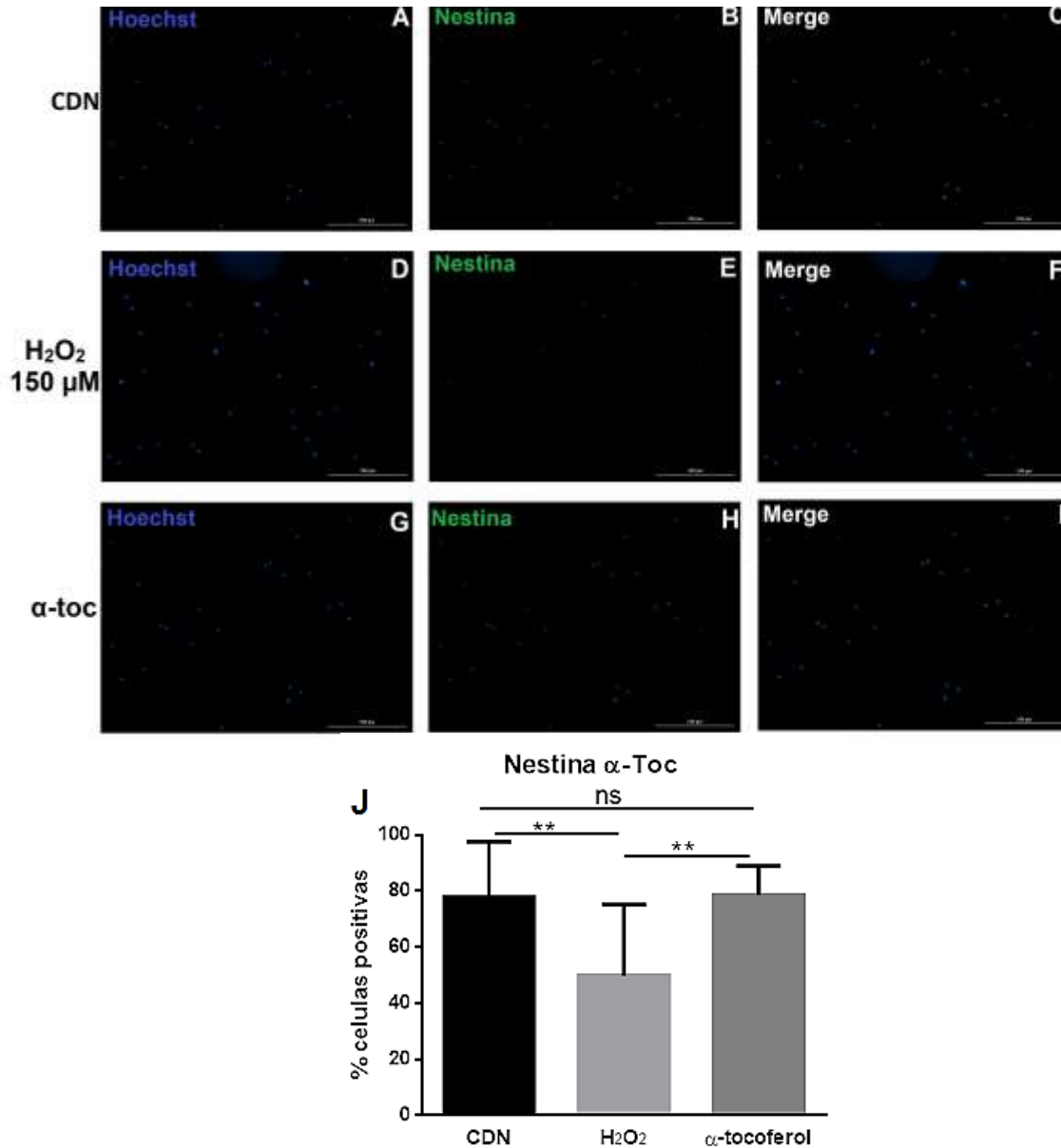


Fig. 14 Efecto del α -Toc en la expresión marcadores celulares respecto al tiempo de exposición. A-C expresión de Nestina en células control. D-F células expuestas a H₂O₂ se observa que hay una disminución en la expresión de células positivas a Nestina lo cual es una diferencia significativa (J). G-I células pretratadas con α -Toc, se observa un aumento en la expresión a niveles estadísticamente iguales a las CDN. La tinción de los núcleos fue hecha con Hoechst. El resultado el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde si **p < 0.05, por ANOVA de una vía. Barra: 200 μ m

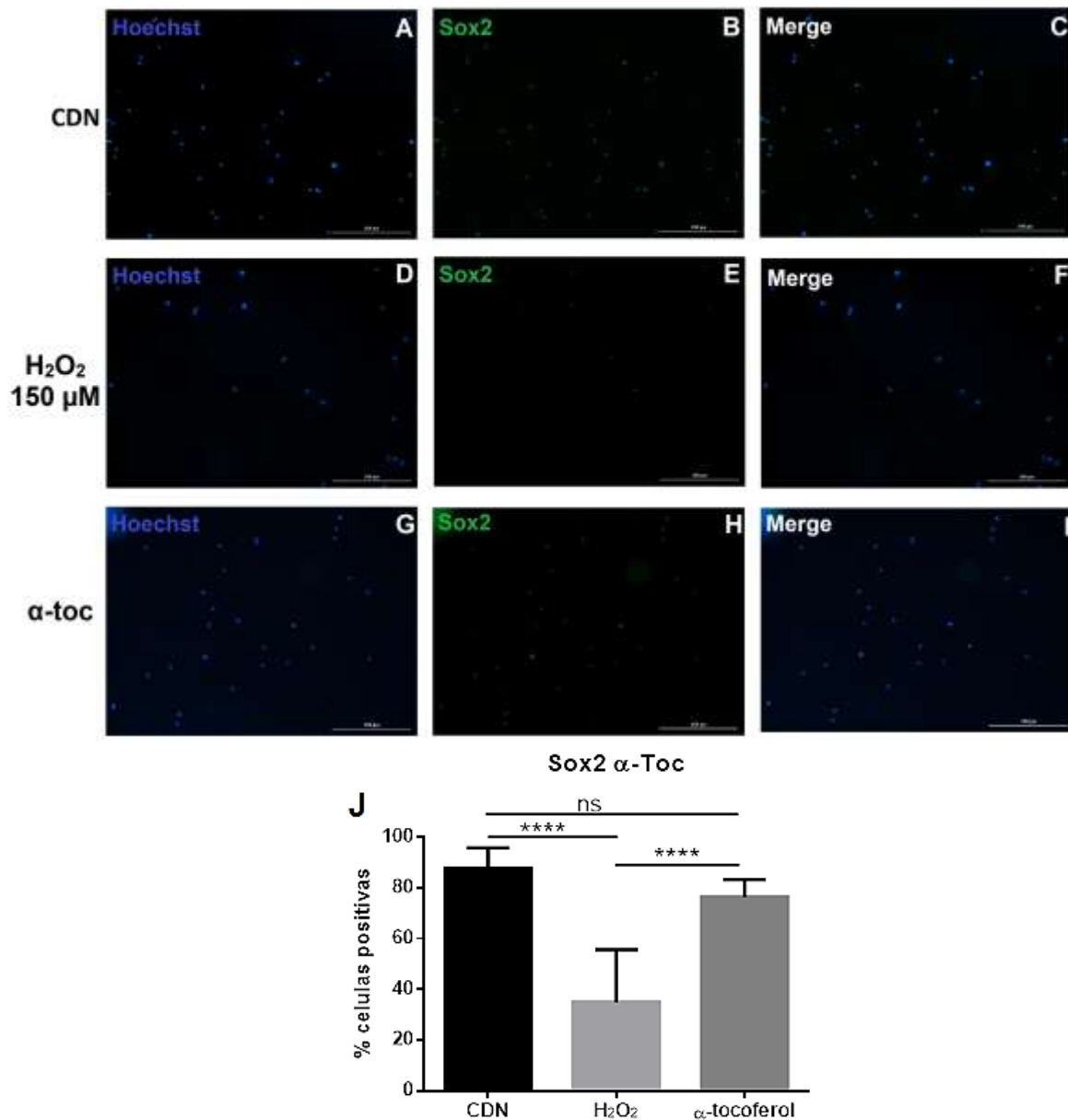


Fig. 14 Efecto de α -Toc en la expresión de marcadores celulares. (A-C) expresión de Sox2. D-F células expuestas a H_2O_2 se observa que hay una disminución significativa en la expresión de Sox2 mientras que en (G-I) las células pretratadas con α -Toc, se observa una recuperación en la expresión de las CDN. Estos resultados indican que el α -Toc protege del efecto del H_2O_2 y nos confirma que los efectos antes observados son producidos por la exposición a H_2O_2 . La tinción de los núcleos fue hecha con Hoechst. El resultado el promedio de 3 experimentos \pm SD en donde si **** $p < 0.001$, por ANOVA de una vía. Barra 100 μ m.

La expresión de los marcadores de células progenitoras, nestina y Sox2, se incrementa en las células pretratadas con α -Toc. En las figuras 13 y 14 se observa que no hay diferencia significativa en el número de células Nes+ y Sox2+ entre la condición control y las pretratadas con α -Toc, sin embargo, las condiciones con H₂O₂, disminuyen el número de células positivas para estos marcadores de la misma forma con las células.

Con estos resultados podemos sugerir que el estrés oxidativo promueve la expresión de marcadores gliales (CRALBP), manteniendo la naturaleza glial de las células desdiferenciadas, y posiblemente limitando la expresión de capacidad de generar células progenitoras neurales, que se refleja en el aumento de los marcadores para progenitores (Nestina y Sox2) en presencia del antioxidante.

6.7 Efecto de H₂O₂ sobre cultivos de neuroesferas

Una observación interesante, es el hecho de que las neuroesferas expuestas a H₂O₂, se disgregaban. Las células que quedaban en flotación al ser sembradas en medio de diferenciación no tenían la capacidad de generar neuroesferas, mientras que las células disgregadas con tripsina mantenían esta capacidad al ser expuestas al medio diferenciador (Fig.16). Una explicación, a este efecto podría ser que el H₂O₂ actúa sobre uniones comunicantes, desacoplando la neuroesfera. Este efecto se observa en cardiomiocitos cultivados in vitro y expuestos a H₂O₂⁵³, por otro lado neuroesferas obtenidas de la zona subventricular del cerebro de ratón expresan la conexina 43, que es sensible a condiciones de estrés oxidativo, por lo que probablemente las neuroesferas provenientes de células de Müller, expresen este tipo de conexina haciéndolas susceptibles al H₂O₂ como se ha reportado en cardiomiocitos⁵⁵. Este efecto de disgregación se observó también en neuroesferas provenientes de la zona subventricular de ratón, otro modelo experimental utilizado en el laboratorio, esto podría sugerir

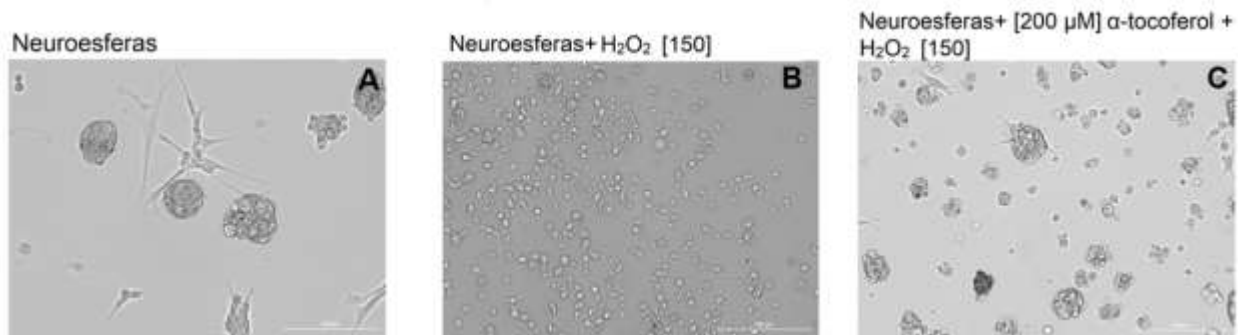


Fig. 16 Efecto del α -Toc en la disgregación de neuroesferas expuestas a H₂O₂. A) Neuroesferas en condiciones control, B) Neuroesferas expuestas a H₂O₂ 150, se puede observar células individuales en flotación y sin formar neuroesferas, C) Neuroesferas preincubadas α -toc durante 24 h y expuestas a H₂O₂, se observan neuroesferas y pocas células individuales en flotación. Barra : 200 μ m

DISCUSIÓN

El estrés oxidativo es el resultado inherente del proceso de la visión, sin embargo, se sabe que bajo condiciones patológicas este proceso se incrementa. En este modelo nosotros aumentamos el estrés oxidativo exponiendo las células a H_2O_2 , obteniendo como resultado una disminución de los marcadores de células progenitoras y aumentando la expresión de marcadores de célula de Müller. Respecto al papel del estrés oxidativo en otras células progenitoras, algunos reportes indican un incremento en la migración de células obtenidas de la zona subventricular bajo condiciones de estrés oxidativo⁴⁵. Mientras que en otras especies se ha reportado que el estrés oxidativo induce el proceso de diferenciación de células en *Xenopus laevis* y es necesario para la regeneración de la cola de los renacuajos⁴⁹. Por lo tanto, considerando que la glía de Müller es una célula progenitora latente en mamíferos^{24,26,27,28}, es fundamental entender los procesos que regulan el mecanismo de desdiferenciación de estas células. En este caso, al determinar el efecto del H_2O_2 como generador de estrés oxidativo podremos comprender un poco más el potencial de glía de Müller como una fuente endógena en la retina de células progenitoras neurales.

Los datos obtenidos muestran que la expresión de CRALBP, un marcador de células de Müller, incrementan en las neuroesferas obtenidas de células de Müller y expuestas a H_2O_2 (150 μM), sin embargo, disminuye el número de células Sox2+ y nestina+, marcadores de células progenitoras y progenitoras neurales, respectivamente. Estos resultados sugieren que posiblemente el estrés oxidativo, generado por la presencia de H_2O_2 , regula de manera negativa el proceso de desdiferenciación hacia células progenitoras neurales y mantiene a las células con características gliales, lo cual concuerda con los trabajos de diferentes grupos que han observado que la exposición de células progenitoras neurales a ROS favorece su diferenciación^{43,44,45,46,47}. Este efecto del estrés oxidativo sobre las células progenitoras, podría ser el responsable de que las células de Müller de mamífero, bajo condiciones de daño respondan a través del proceso de gliosis, limitando la capacidad regenerativa observada en otras especies. Las células que fueron incubadas con α -Toc y posteriormente expuestas a

H₂O₂ mantienen las características de células progenitoras, lo cual nos confirma que la disminución de células que expresan los marcadores para progenitores neurales es resultado del estrés oxidativo.

A pesar de que los ensayos con α -tocopherol muestran que el efecto generado por H₂O₂ es consecuencia de un aumento del estrés oxidativo, es importante mencionar que una limitante en este trabajo fue que no se realizaron ensayos para comprobar directamente la generación de ROS. Sin embargo, existen varios trabajos que indican la formación de ROS en presencia de H₂O₂ en diferentes modelos experimentales y los cuales sustentan el uso del H₂O₂ en nuestro modelo experimental.^{56, 57, 58, 59,60} Una forma de estimar los niveles celulares de ROS es mediante el uso de ensayos fluorogénicos, por ejemplo, las moléculas de superóxido (O₂⁻) pueden detectarse tras la tinción con del ensayo fluorescente con dihidroetidio (DHE). Dentro de las células, el anión superóxido oxida directamente el DHE a bromuro de etidio, el cual emite fluorescencia de 585 nm, que se considera, por tanto, proporcional a los niveles intracelulares de aniones superóxido⁶¹. Por otro lado, para medir el radical hidroxilo (-OH) se puede utilizar el ensayo de detección de radical hidroxilo mitocondrial, el cual penetra en la célula y reacciona con los radicales hidroxilo presentes en las células vivas, lo cual genera una señal fluorescente de 540nm⁶²

Recientemente, Adusumilli y colaboradores⁵⁵ demostraron que la formación de neuroesferas, tanto del giro dentado del hipocampo como de la ZSV, se ve restringida en ambientes con altos niveles de ROS. Sin embargo, la disminución de las concentraciones de ROS permite a las células de la ZSV y el giro dentado entrar al ciclo celular y promover la neurogénesis⁵⁵. Un efecto similar observamos en nuestro sistema experimental, al exponer los cultivos de células progenitoras de glía de Müller a H₂O₂, en donde fueron incapaces de generar neuroesferas, o bien las neuroesferas que proliferaban sufrían una disgregación. Esta observación podría sugerir que el estrés oxidativo no solo alteraría la capacidad neurogénica de la células de Müller, sino que también sería capaz de fomentar el desacople de las uniones comunicantes presentes en la diferentes capas retinales, principalmente en la capa de los segmentos internos de los fotorreceptores, alterando el proceso de fototransducción.

Por otro lado, se ha descrito que la matriz extracelular regula el proceso de diferenciación en algunas células activando algunas vías de señalización involucradas en este proceso como por ejemplo integrinas⁶³. El tipo de matriz extracelular más utilizada en cultivos neuronales y gliales es poli-d-lisina. En nuestro sistema experimental las células disgregadas de las neuroesferas expuestas a H₂O₂ perdieron su capacidad de adhesión, por lo que, para realizar los ensayos de inmunodetección para los diferentes marcadores celulares las células aisladas fueron cultivadas en gelatina al 1%, esta matriz permitió la adhesión de las células sin activar ningún tipo de señalización asociada a proliferación o diferenciación celular⁶³.

Ya que el aumento de la proliferación de las células de Müller en los procesos de daño es parte importante del proceso de gliosis y puede acelerar los procesos patológicos en la retina, sería importante comprobar que la exposición a H₂O₂ de las células progenitoras procedentes de células de Müller da como resultado, además de la diferenciación, un aumento en la proliferación. Para esto, se deberían utilizar formas de medición que no estén basadas en el metabolismo mitocondrial ya que el estrés oxidativo altera esas mediciones.

Otra observación importante es la resistencia que las células progenitoras obtenidas de neuroesferas muestran a las condiciones de estrés oxidativo. En este caso, las pruebas de viabilidad celular no mostraron una disminución en el número celular de los cultivos expuestos al H₂O₂. Este efecto, coincide con la capacidad antioxidante de las células de Müller, por lo que, parecería que esta característica se conserva durante la desdiferenciación y en las neuroesferas obtenidas a partir de este tipo celular.

Por último, cabe mencionar que en años recientes se han desarrollado diversas terapias para el tratamiento de diferentes retinopatías, una de ellas es la terapia de sustitución celular. Considerando las observaciones realizadas en este trabajo, es probable que el ambiente citotóxico generado por el estrés oxidativo y exacerbado en condiciones patológicas, promueva que la diferenciación de las células implantadas, desarrollen características gliales y no neuronales, lo cual podría acelerar el proceso de gliosis disminuyendo la eficiencia del tratamiento terapéutico.

8. CONCLUSIÓN

El modelo de neuroesferas para la obtención de células progenitoras a partir de células de Müller es funcional y las células obtenidas expresan marcadores propios de células progenitoras, Sox2 y Nestina, y disminuye la expresión de CRALBP.

La exposición a H₂O₂ no afecta la viabilidad celular, incluso se observa un aumento significativo en la proliferación, sin embargo, las lleva a aumentar la expresión de CRALBP y a disminuir la expresión de marcadores propios de progenitoras neurales (Sox2 y Nestina). Esto indica que a pesar de la capacidad de las células de Müller a diferenciarse a células con características progenitoras, la presencia de un ambiente de estrés oxidativo regula de manera negativa el proceso de desdiferenciación y promueve que estas se mantengan con características gliales, propias de células de Müller. Evitando de esta forma, la generación de células progenitoras neuronales que puedan resarcir la pérdida neuronal como se observa en otras especies.

9. REFERENCIAS:

1. Luskin MB. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*.11:173–89.
2. Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., Osborne, N. N., & Reichenbach, A. (2009). Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Progress in retinal and eye research*, 28(6), 423–451.
3. Ail, D., & Perron, M. (2017). Retinal Degeneration and Regeneration-Lessons From Fishes and Amphibians. *Current pathobiology reports*, 5(1), 67–78.
4. Gonzalez-Perez O, Chavez-Casillas O, Jauregui-Huerta F, Lopez-Virgen V, Guzman-Muniz J, Moy-Lopez N, et al; (2011). Stress by noise produces differential effects on the proliferation rate of radial astrocytes and survival of neuroblasts in the adult subgranular zone. *Neuroscience Research*. 70(3): 243–50
5. Pérez Estrada C1, Covacu R, Sankavaram SR, Svensson M, Brundin L. (2014) Oxidative Stress Increases Neurogenesis and Oligodendrogenesis in Adult Neural Progenitor Cells; *Stem Cells*; 23 (19), 2311-2327
6. Kaufman Paul.(2003) *Adler Fisiología del ojo*. Mosby
7. Grazyna Adamus. (2017) Impact of Autoantibodies Against Glycolytic Enzymes on Pathogenicity of Autoimmune Retinopathy and Other Autoimmune Disorders *Frontiers in Immunology*. *Frontiers in Immunology* 8: 505.
8. Rodriguez Salvador, Gallego Lago, Zarco Villarosa. (2010) *Visión y Deporte*. Capítulo 16 Motilidad Ocular y su importancia en la práctica deportiva. *Visión monocular y binocular*. Editorial Glosa
9. Lee Ann Remington, (2005) *Clinical anatomy of the visual system*. 61
10. Kanski J.J. Bowling B, (2012). *Oftalmología clínica*. Elsevier, 51
11. Vecino et al 2016, Glia-neuron Interaction in the Mammalian Metina. *ProgRetine* Vol. 51: pag 1-40
12. Greenberg, K. P., Geller, S. F., Schaffer, D. V., & Flannery, J. G. (2007). Targeted transgene expression in muller glia of normal and diseased retinas using lentiviral vectors. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(4), 1844–1852.

13. Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res* 2004; 36: 241–24
14. Reichenbach A, Bringmann A (2012) Cell biology of the muller cell. *Retina* (5) 415-432
15. Barnett NL, Pow DV, Robinson SR. Inhibition of Muller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glia* 2000; 30: 64–73)
16. Bringmann A. Reichenbach A (2010); Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina; Springer
17. Franze Kristian, (2007) Müller Cells Are Living Optical Fibers In The Vertebrate Retina; *Proceedings Of The National Academic Of Sciences Of The United States Of America* 104 (20): 8287-8292
18. Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Skondra D et al. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis* 2006; 12: 867–878
19. MacDonald, Charlton-Perkins M, Harris WA.(2017) Mechanisms of Müller glial cell morphogenesis. *Current Opinion Neurobiology*. 47:31-37
20. Fischer & Reh, (2001) Muller Glia Are A Potential Source Of Neural Regeneration In The Postnatal Chicken Retina. *Nat. Neuroscience* 4:247–252
21. Bernardos RL et al (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. *Journal Neuroscience* 27(26): 7028–7040
22. Fischer et al. (2002) Insulin And Fibroblast Growth Factor 2 Activate A Neurogenic Program In Muller Glia Of The Chicken Retina, *Journal Neuroscience* 22: 9387–9398.
23. Ramírez M, Lamas M. (2009) NMDA Receptor Mediates Proliferation And CREB Phosphorylation In Postnatal Müller Glia-Derived Retinal Progenitors; *Molecular Vision* 15: 713-721
24. Monnin J, Morand-Villeneuve N, Germaine M, Hicks D, Versaux-Botteri C. (2007) Production Of Neurospheres From Mammalian Muller Cells In Culture; *Neuroscience Letters*. 421: 22-26

25. Bernal, A., & Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 75(12), 2177–2195.
26. Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ (2008). Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 3 (7): 1180-1186
27. Phillips J, Otteson C. (2011) Differential Expression of Neuronal Genes in Müller Glia in Two- and Three-Dimensional Cultures. *Retinal Cell Biology* 52: 1439-1449.
28. Lawrence J.M (2007) MIO-M1 Cells and Similar Müller Glial Cell Lines Derived from Adult Human Retina Exhibit Neural Stem Cell Characteristics. *Stem Cells* 25(8):2033-2043
29. Bringmann A. (2009) Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research* 28 (6), 423-51
30. Natoli, R. Fernando, et al (2017). Microglia-derived IL-1 β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 31.
31. Wanner IB, Deik A, Torres M, et al. (2008) A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. *Glia* 56(15):1691–1709
32. Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. (1992) CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Prog Brain Res.*94:367–379.
33. Camps D et al. (2010) *Bioquímica del Estres Oxidativo* .Editorial Lulu
34. Corrales, Lucía Constanza, Muñoz Ariza M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213-225.
35. Ruma Banerjee; (2012) Redox outside the Box: Linking Extracellular Redox Remodeling with Intracellular Redox Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 287(7):4397–4402.
36. Halliwell B, Gutteridge J. (2000) *Free radicals in Biology and Medicine*. Tercera edición. Oxford, New York,
37. Delatre J, Bonnefont-Rousselot D. Oxidative stress, free radicals and aging. *Biotech Lab Int* 1998;3(2):21- 3

38. Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological chemistry*, 398(10), 1095–1108
39. Léveillard, T., & Sahel, J. A. (2017). Metabolic and redox signaling in the retina. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 74(20), 3649–3665
40. Yamashita, H., Horie, K., Yamamoto, T., Nagano, T., & Hirano, T. (1992). Light-induced retinal damage in mice. Hydrogen peroxide production and superoxide dismutase activity in retina. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 12(1), 59–66.
41. Vasilaki A.T., McMillan D.C. (2011) Lipid Peroxidation. In: Schwab M. (eds) *Encyclopedia of Cancer*. Heidelberg, Berlin, Springer,
42. Adibhatla RM, Hatcher JF. (2008) Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem.*;49:241-68.
43. Peters, S., Griebisch, M., Klemm, M., Haueisen, J., & Hammer, M. (2017). Hydrogen peroxide modulates energy metabolism and oxidative stress in cultures of permanent human Müller cells MIO-M1. *Journal of biophotonics*, 10(9), 1180–1188.
44. Toft-Kehler, A. K., Gurubaran, I. S., Desler, C., Rasmussen, L. J., Skytt, D. M., & Kolko, M. (2016). Oxidative Stress-Induced Dysfunction of Müller Cells During Starvation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(6), 2721–2728.
45. Le Belle, J. E., Orozco, N. M., Paucar, A. A., Saxe, J. P., Mottahedeh, J., Pyle, A. D., Wu, H., & Kornblum, H. I. (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell stem cell*, 8(1), 59–71.
46. Dickinson, B. C., Peltier, J., Stone, D., Schaffer, D. V., & Chang, C. J. (2011). Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nature chemical biology*, 7(2), 106–112.
47. Sharma, Rajesh & Zhou, Qihong & Netland, Peter. (2008). Effect of oxidative preconditioning on neural progenitor cells. *Brain research*. 1243. 19-26.
48. Van der Vliet, A., & Janssen-Heininger, Y. M. (2014). Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger?. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(3), 427–435

49. Love, N. R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., Gallop, J. L., Dorey, K., & Amaya, E. (2013). Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature cell biology*, 15(2), 222–228.
50. Cepko C (1999) The Roles Of Intrinsic And Extrinsic Cues And Bhlh Genes In The Determination Of Retinal Cell Fates. *Current Opinion in Neurobiology* 9(1): 37-46
51. Dyer, M. A., Livesey, F. J., Cepko, C. L., & Oliver, G. (2003). Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nature genetics*, 34(1), 53–58.
52. Zhang, M., Srivastava, G., & Lu, L. (2004). The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cellular & molecular immunology*, 1(2), 89–94.
53. Talaverón R. et al (2015) Neural progenitor cells isolated from the subventricular zone present hemichannel activity and form functional gap junctions with glial cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
54. Tomaselli G. (2009) Oxidant stress derails the cardiac connexon connection. *The Journal Clinical Investigation*. 266
55. Adusumilli et al., (2021), ROS Dynamics Delineate Functional States of Hippocampal Neural Stem Cells and Link to Their Activity-Dependent Exit from Quiescence. *Cell Stem Cell* 28, 1–15
56. Beltrán González AN, López Pazos MI, Calvo D. (2020) Reactive Oxygen Species in the Regulation of the GABA Mediated Inhibitory Neurotransmission. *Neuroscience*. 439:137-145
57. He MT, Lee AY, Park CH, Cho EJ. (2019). Protective effect of *Cordyceps militaris* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in vitro. *Nutrition Research and Practice* (4):279-285.
58. Park WH. (2013) The effect of MAPK inhibitors and ROS modulators on cell growth and death of H₂O₂-treated HeLa cells. *Molecular Medicine Reports* (2):557-64
59. Vilema-Enríquez G, Arroyo A, Grijalva M, Amador-Zafra RI, Camacho J. (2016) “Molecular and Cellular Effects of Hydrogen Peroxide on Human Lung Cancer

Cells: Potential Therapeutic Implications”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

60. Park WH. (2016) Exogenous H₂O₂ induces growth inhibition and cell death of human pulmonary artery smooth muscle cells via glutathione depletion. *Molecular Medicine Reports* 936-42.
61. P Ubezio and F. Civoli,(1995) “Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 16, no. 4, pp. 509–516.
62. Hongyun Nie et al (2020) Homogeneously catalytic oxidation of phenanthrene by the reaction of extracellular secretions of pyocyanin and Nicotinamide Adenine Dinucleotide, *Environmental Research*, Volume 191
63. Assis-Ribas, T., Forni, M. F., Winnischofer, S. M. B., Sogayar, M. C., & Trombetta-Lima, M. (2018). Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation. *Developmental Biology*, 437(2), 63-74.

10. ÍNDICE DE FIGURAS

- 1 Estructura del globo ocular
- 2 Representación histológica de las capas y las células de la retina
- 3 Función de las células de Müller
- 4 Inmunofluorescencias de cultivo de células de Müller.
- 5 Neuroesferas derivadas de células de Müller
- 6 Inmunofluorescencia en neuroesferas
- 7 Comparación de expresión de marcadores en neuroesferas contra células de Müller
- 8 Gráfica de viabilidad celular por MTT en células progenitoras expuestas por 2 horas a diferentes concentraciones de H_2O_2
- 9 Gráfica de viabilidad celular por MTT en células progenitoras expuestas por 72 horas a diferentes concentraciones de H_2O_2
- 10 Expresión de marcadores en células expuestas a H_2O_2 incubadas por 3 horas
- 11 Expresión de marcadores en células expuestas a H_2O_2 incubadas por 12 horas
- 12 Gráfica de comparación de expresión de marcadores con respecto al tiempo
- 13 Comparación de expresión de CRALBP en células preincubadas con α -toc
- 14 Comparación de expresión de Nestina en células preincubadas con α -toc
- 15 Comparación de expresión de Sox2 en células preincubadas con α -toc
- 16 Disgregación de las neuroesferas expuestas a H_2O_2