Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Unidad de Posgrado

Evaluación del efecto neuroprotector del secretoma de células madre mesenquimales de médula ósea en un modelo de neurodegeneración retiniana

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

Nadia Regina GALINDO CABELLO

ASESOR

Dr. Juan Atilio JIMÉNEZ CHUNGA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Galindo, N. (2023). *Evaluación del efecto neuroprotector del secretoma de células madre mesenquimales de médula ósea en un modelo de neurodegeneración retiniana*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas/Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Nadia Regina Galindo Cabello
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46434400
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8721-5220
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Juan Atilio Jiménez Chunga
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06281952
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-0128-3028
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Dan Erick Vivas Ruíz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41951131
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Wilser Andrés García Quispes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40480447
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Roger Alberto Palomino Huarcaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25841842
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.3.1 SALUD PÚBLICA
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Retina, de la Universidad de Valladolid, España.
Agencia de financiamiento	España. Agencia Estatal De Investigación «Proyectos de I+D+i» de los Programas Estatales de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema de I+D+i y de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad. PID2019-110709RB
Ubicación geográfica de la investigación	País:España, Comunidad Autónoma:Castilla y León Ciudad: Valladolid Edificio:Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)-Universidad de Valladolid Calle: Campus Miguel Delibes; Pasaje Belén, 17; 47011 Valladolid Latitud: 41.66338508740503 Longitud: -4.70455966675911
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020-2021
URL de disciplinas OCDE	Tecnologías que implican la manipulación de células, tejidos, órganos o todo el organismo https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.02 Tecnología para la identificación y funcionamiento del ADN, proteínas y enzimas y como influencian la enfermedad https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.03

Exped. Nº 229v-UPG-FCB-2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR (SUSTENTACIÓN VIRTUAL)

Siendo las 15:00 horas del día viernes 24 de marzo de 2023, en Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace -tzui-tzmeet.google.com/raui, el Jurado de Tesis conformado por:

Dr.	Dan Erick Vivas Ruíz	(Presidente)
Dr.	Wilser Andrés García Quispes	(Miembro)
Mg.	Roger Alberto Palomino Huarcaya	(Miembro)
Dr.	Juan Atilio Jiménez Chunga	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara la señorita Bachiller Doña **NADIA REGINA GALINDO CABELLO.**

Después de darse lectura al **Expediente Nº 229v-UPG-FCB-2022,** en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

"Evaluación del efecto neuroprotector del secretoma de células madre mesenquimales de médula ósea en un modelo de neurodegeneración retiniana", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

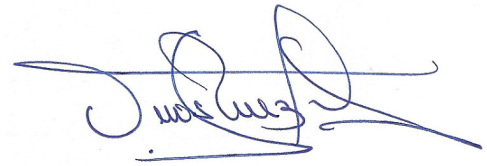
UNIDAD DE POSGRADO

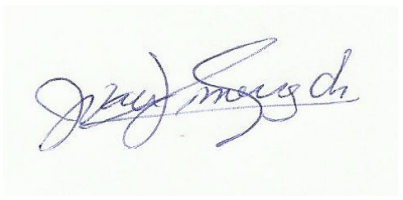
Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Excelente con la nota de 19 (Diecinueve)

A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular, a la señorita Bachiller **NADIA REGINA GALINDO CABELLO.**

Siendo las 16:35 horas se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día 23 de marzo del año 2023.





Dr. Dan Erick Vivas Ruíz
Profesor Asociado a T.C.
PRESIDENTE
dvivasr@unmsm.edu.pe
RENACYT P0004721

Dr. Juan A. Jiménez Chunga
Profesor Principal D.E.
ASESOR
jjimenezc@unmsm.edu.pe
RENACYT P0013740





.....

Dr. Wilser A. García Quispes
Profesora Auxiliar T.P.
MIEMBRO
wgarciaq@unmsm.edu.pe
RENACYT P0024295

.....

Mg. Roger A. Palomino Huarcaya
Profesor Auxiliar a T.C.
MIEMBRO
rpalominoh@unmsm.edu.pe

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

1. Facultad: CIENCIAS BIOLÓGICAS
2. UNIDAD DE POSGRADO
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad:
   Evaluadores de la originalidad de los documentos de investigación conducentes a los grados académicos de la UPG (RD N° 564-D-FCB-2018):
   _ Dra. Diana Fernanda Silva Dávila y
   _ Dra. Mónica Arakaki Makishi
4. Apellidos y Nombres de la autoridad académica: Dra. Liz Erika Cruz Pio, Directora de la Unidad de Posgrado
5. Operador del Programa Informático de Similitudes:
   _ Dra. Diana Fernanda Silva Dávila y
   X Dra. Mónica Arakaki Makishi
6. Documento evaluado: "**Evaluación del efecto neuroprotector del secretoma de células madre mesenquimales de médula ósea en un modelo de neurodegeneración retiniana**"
7. Tesis para Grado Académico de: Magíster en Biología Molecular
8. Autor del documento:
   Apellidos: GALINDO CABELLO
   Nombres: NADIA REGINA
9. Fecha de recepción de documento: 06 de setiembre de 2022
10. Fecha de aplicación del programa informático de similitud:
    06 de setiembre de 2022
11. SOFWARE UTILIZADO
    - Turnitin
12. Configuración del programa detector de similitudes
    X Excluye texto entrecomillado
    X Excluye bibliografía
    X Excluye cadenas menores a 40 palabras
    - Otros criterios (especificar)
13. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes
    - Porcentaje en letras y números: NUEVE por ciento de similitud (9%)
14. Fuentes originales de las similitudes encontradas
    - Indicarlas en decreciente y su respectivo porcentaje: Se adjunta Informe respectivo
15. Observaciones
    El archivo de la tesis paso por dos revisiones.
16. Calificación de originalidad
    - Documento cumple criterios de originalidad, según la normativa del VRIP.
17. Fecha del informe
    1° Informe: 06 de setiembre de 2022
    2° Informe: 24 de setiembre de 2022

UNMSM
Firmado digitalmente por CRUZ PIO Liz Erika FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 28.10.2022 13:43:36 -05:00

DRA. MONICA ARAKAKI MAKISHI
Miembro Evaluador

DRA. LIZ ERIKA CRUZ PIO
Directora de la Unidad de Posgrado

Dedico esta tesis a mi querida familia y amigos cercanos, quienes siempre me han mostrado su apoyo y cariño a lo largo de estos años. Este segundo paso profesional me ha llevado más tiempo del que planifiqué en un principio, y el camino que he recorrido para poder cumplirlo no ha sido fácil; sin embargo, quedo completamente complacida y satisfecha con los resultados, lo aprendido y todas las vivencias que he pasado durante estos años.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme la vida y protegerme en todo momento, además de guiarme y darme la fortaleza para mejorar cada día.

A mis amados padres Alejandro y Carmen, por darme su interminable cariño, amor, apoyo y amistad. Todo lo que estoy logrando hasta ahora es gracias a su esfuerzo como padres, gracias por ser un ejemplo de perseverancia y hacer de mi alguien independiente y risueña, espero poder retribuirles todo lo que hacen por mí.

A mi querido hermano mayor Dorian, por todo lo que haces para apoyarme y ser un ejemplo de constancia, bondad y estar siempre pendiente de todos en la familia; y a mi hermanito Fernandito, por darme tantas alegrías y cuidar de todos en casa.

A mi asesor externo, Ricardo Usategui, quien ha depositado su confianza en mí para poder ejecutar este trabajo, por sus consejos y recomendaciones para orientar mi carrera profesional; y a mi otro asesor externo, Ivan Fernandez, por apoyarme y brindarme lo necesario para poder culminar este trabajo.

A mi asesor interno, Juan Jiménez, por apoyarme durante todos estos años y siempre estar receptivo a los cambios que tuve que realizar para culminar esta tesis.

A mis jurados de tesis, por sus valiosas observaciones y recomendaciones, las cuales han enriquecido la calidad de este trabajo de tesis.

A mis amigos del grupo de Investigación de Retina del IOBA, Leticia y Kevin, por su apoyo y compartir el trabajo en equipo; además Nieves y Raquel que me hicieron sentir bienvenida en el instituto.

A toda mi familia de Andahuaylas, Lima y España, que siempre están pendientes de mí y me dan las fuerzas para seguir adelante.

A todos mis amigos del Laboratorio de Ecología Microbiana, del INS y a todos los demás, gracias por brindarme su cariño todo este tiempo.

A mis queridas Lolis, Mari, Claudia y Virginia, por estar siempre a mi lado para escucharme y apoyarme y ser parte de este viaje que he emprendido.

Finalmente, un agradecimiento a los miembros del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid, por brindar las facilidades para complementar este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS vii
ÍNDICE DE FIGURAS viii
LISTA DE ABREVIATURAS ix
RESUMEN xi
ABSTRACT xii
I. INTRODUCCIÓN 1
II. ANTECEDENTES 3
2.1 La retina y su estructura 3
2.2 Enfermedades neurodegenerativas de la retina y tratamientos actuales 4
2.3 Procesos involucrados en la neurodegeneración de la retina 5
2.4 Terapias avanzadas y uso del secretoma de MSC 8
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 11
3.1 Hipótesis 11
3.2 Objetivos 11
3.2.1 Objetivo general 11
3.2.2 Objetivos específicos 11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS 12
4.1 Células madre mesenquimales de médula ósea humana 12
4.1.1 Obtención de células madre mesenquimales 12
4.1.2 Caracterización y cultivo de células madre 12
4.1.3 Evaluación inmunohistoquímica de las células madre 13
4.2 Cultivo organotípico de explantes de neuroretina porcina. Modelo *ex vivo* de neurodegeneración retiniana 13
4.2.1 Obtención de globos oculares 13
4.2.2 Preparación de explantes de neuroretina porcina 14
4.3 Obtención del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea 16
4.4 Diseño experimental 16
4.5 Caracterización inmunohistoquímica de la morfología de la neuroretina 18
4.5.1 Procesamiento de las muestras de neuroretina 18

4.5.2 Evaluación inmunohistoquímica de las neuroretinas 18
4.5.3 Adquisición de imágenes por inmunofluorescencia 20
4.6 Análisis de expresión relativa del mRNA..... 20
4.6.1 Extracción de mRNA 20
4.6.2 Síntesis de DNA complementario 20
4.6.3 Amplificación de los marcadores de interés mediante PCR cuantitativa comparativa en tiempo real (qPCR) 21
4.7 Análisis estadístico..... 23
V. RESULTADOS..... 25
5.1 Evaluación de marcadores de superficie de células madre mesenquimales de médula ósea..... 25
5.2 Caracterización de la gliosis y la degeneración de la neuroretina..... 25
5.3 Evaluación inmunohistoquímica de la morfología de la neuroretina ... 27
5.4 Evaluación de la apoptosis..... 32
5.5 Evaluación de la necroptosis..... 34
5.6 Evaluación de la autofagia 37
5.7 Evaluación del estrés oxidativo 40
5.8 Evaluación de la inflamación..... 42
VI. DISCUSIÓN 44
VII. CONCLUSIONES..... 53
VIII. RECOMENDACIONES 54
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 55
X. ANEXOS 63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios para los explantes de retina y sus condiciones experimentales 19
Tabla 2. Programa de la síntesis de cDNA 21
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos específicos para qPCR 22
Tabla 4. Programa de la qPCR 23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las capas de la retina y sus componentes celulares. 3
Figura 2. Progresión de la degeneración de la retina 6
Figura 3. Preparación de explantes de neuroretina de los globos oculares. ... 15
Figura 4. Cultivo organotípico de explante de neuroretina. 16
Figura 5. Co-cultivo del explante de neuroretina con las bmMSC. 16
Figura 6. Condiciones experimentales 17
Figura 7. Evaluación de marcadores de superficie de células madre mesenquimales de médula ósea.. 25
Figura 8. Evaluación inmunohistoquímica de la gliosis en la neuroretina..... 27
Figura 9. Evaluación inmunohistoquímica de la morfología de la neuroretina..31
Figura 10. Evaluación inmunohistoquímica de la apoptosis en la denegeración de la neuroretina. 33
Figura 11. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados a la apoptosis. 34
Figura 12. Evaluación inmunohistoquímica de la necroptosis en la denegeración de la retina..... 35
Figura 13. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados a la necroptosis. 37
Figura 14. Evaluación inmunohistoquímica de la autofagia en la denegeración de la retina..... 38
Figura 15. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados a la autofagia. 39
Figura 16. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados con el estrés oxidativo. 41
Figura 17. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados a la inflamación. 43

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	**:**	Factor inductor de la apoptosis
ATG7	**:**	Gen relacionado con la autofagia 7
BAX	**:**	Gen de la proteína X asociada a BCL2
BCL2	**:**	Gen del linfoma de células B2
BDNF	**:**	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BECLIN1	**:**	Gen coiled-coil, proteína que interactúa con BCL2 similar a la moesina
bmMSC	**:**	Células madre mesenquimales de médula ósea humana
CASP3	**:**	Gen caspasa 3
CASP8	**:**	Gen caspasa 8
CASP9	**:**	Gen caspasa 9
cDNA	**:**	DNA complementario
CGL	**:**	Capa de células ganglionares
CNTF	**:**	Factor neurotrófico ciliar
COX2	**:**	Gen de la ciclooxigenasa 2
CT	**:**	Ciclo umbral (Threshold cycle)
CYBB	**:**	Gen del citocromo B-245 cadena beta
DAPI	**:**	4´,6-diamidino-2-fenilindol
DMAE	**:**	Degeneración macular asociada con la edad
EPR	**:**	Epitelio pigmentario de la retina
FR	**:**	Fotorreceptores
GAPDH	**:**	Gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	**:**	Proteína ácida fibrilar glial
GPX6	**:**	Gen del glutation peroxidasa 6
GPxs	**:**	Glutation peroxidasa
Grx	**:**	Glutation-glutaredoxina
hNPC	**:**	Células progenitoras neurales humanas
IL1	**:**	Gen de la interleucina 1
IL10	**:**	Gen de la interleucina 10
IL6	**:**	Gen de la interleucina 6
IL6	**:**	Interleucina 6
INL	**:**	Capa nuclear interna
IPL	**:**	Capa plexiforme interna
LC3B	**:**	Gen de la proteína relacionada con la autofagia LC3B
MHC-II	**:**	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MLKL	**:**	Proteína similar al dominio de quinasa de linaje mixto
MLKL	**:**	Gen de la proteína similar al dominio de quinasa de linaje mixto
mRNA	**:**	RNA mensajero
MSC	**:**	Células madre mesenquimales
MTOR	**:**	Gen diana de rapamicina en células de mamífero
NeuN	**:**	Proteína nuclear neuronal
NFL	**:**	Capa de fibras nerviosas

NR	**:**	Neuroretina en monocultivo
NR+MSC	**:**	Co-cultivo de explantes de Neuroretina con bmMSC
NR+S	**:**	Cultivo de explantes de Neuroretina con el secretoma de bmMSC
OPL	**:**	Capa plexiforme externa
OS	**:**	Segmento externo del fotorreceptor
p62	**:**	Proteína p62
PARP	**:**	Poli (ADP-ribosa) pilomerasa
PBS	**:**	Buffer fosfato salino
PKCa	**:**	Isoforma alfa de la proteína quinasa C
PNA	**:**	Lectina de aglutinina de maní
qPCR	**:**	PCR cuantitativa comparativa en tiempo real
Rho	**:**	Proteína rodopsina
RIPK1	**:**	Gen de la serina/treonina proteína quinasa 1 que interactúa con el receptor
RIPK3	**:**	Gen de la serina/treonina proteína quinasa 3 que interactúa con el receptor
ROS	**:**	Especies reactivas de oxígeno
SOD1	**:**	Gen de la superoxido dismutasa 1
SQSTM1	**:**	Gen del secuestrosoma 1
TGFB1	**:**	Gen del factor de crecimiento transformante beta 1
TNFA	**:**	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFA	**:**	Gen del factor de necrosis tumoral alfa
Trx	**:**	Tiorredoxina
TrxR1	**:**	Tiorredoxina reductasa 1
TXN2	**:**	Gen de la tiorredoxina 2
TXNRD1	**:**	Gen de la tiorredoxina reductasa 1

RESUMEN

La degeneración de la retina es la causa más común de ceguera a nivel mundial. Además, los mecanismos de neurodegeneración de las enfermedades de la retina son similares a nivel celular y molecular. Actualmente, estas patologías carecen de tratamientos efectivos a pesar de sus graves consecuencias clínicas, sociales y económicas. Frente a ello, la terapia celular, basada en las propiedades paracrinas de las células madre mesenquimales (MSC), está siendo muy estudiada como opción terapéutica. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del secretoma de las MSC de médula ósea humana (bmMSC), obtenida en condiciones de degeneración de retina, sobre un modelo de degeneración de retina porcina. Para ello se emplearon cultivos *in vitro* de explantes de neuroretina y se analizaron los cambios a nivel morfológico, molecular y celular durante el cultivo de los explantes de neuroretina con el secretoma de bmMSC. Los resultados obtenidos determinaron que el secretoma disminuyó la expresión de los genes pro-apoptóticos *BAX*, *CASP3*, *CASP8* y *CASP9*; y también aumentó la expresión del gen anti-apoptótico *BCL2*. Además, redujo la expresión de los genes *RIPK1, RIPK3* y *MLKL,* activadores de la necroptosis. Así mismo, moduló la autofagia incrementando la expresión de los genes *ATG7*, *BCLIN1* y *LC3B*, involucrados en la formación del autofagosoma. Adicionalmente, el secretoma aumentó la expresión de los genes activadores de procesos antioxidantes (*TXNRD1, TXN2, GPX6* y SOD1). La evidencia de este estudio sugiere que: (i) el secretoma de las bmMSC se asocia con un efecto neuroprotector sobre un modelo de degeneración de retina porcina *in vitro*, sugiriendo que no es necesaria la presencia de MSC para la neuroprotección; (ii) la capacidad neuroprotectora del secretoma de las bmMSC puede estar asociada con la activación de la maquinaria antioxidante, la modulación favorable de la autofagia y la inhibición de la apoptosis y la necroptosis durante la degeneración de la retina. La implicación de estos resultados perfilan al secretoma de bmMSC como una potencial terapia para tratar las enfermedades neurodegenerativas retinianas.

ABSTRACT

Retinal degeneration is the most common cause of blindness worldwide. Moreover, the neurodegeneration mechanisms in retinal diseases are similar at the cellular and molecular levels. Currently, these pathologies lack effective treatments despite their serious clinical, social, and economic consequences. In light of this, cell therapy, based on the paracrine properties of mesenchymal stem cells (MSC), is being widely studied as a therapeutic option. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of human bone marrow MSC secretome (bmMSC), obtained under conditions of retinal degeneration, on a porcin retinal degeneration model. To determine the effect on the bmMSC secretome, *in vitro* cell cultures of porcine retinal explants were established. After adding the bmMSC secretome to the cultures, morphological, cellular, and molecular changes were recorded. The results determined that the secretome decreased the expression of the pro-apoptotic genes *BAX, CASP3, CASP8*, and *CASP9*, and also increased the expression of the anti-apoptotic gene *BCL2*. In addition, it decreased the expression of *RIPK1, RIPK3*, and *MLKL* genes, activators of necroptosis. Likewise, it was able to modulate autophagy by increasing the expression of the *ATG7, BCLIN1*, and *LC3B* genes, involved in autophagosome formation. In addition, the secretome increased the expression of genes that activate antioxidant processes (*TXNRD1, TXN2, GPX6,* and *SOD1*). The evidence from this study suggests that: (i) the bmMSC secretome is associated with a neuroprotective effect on an *in vitro* porcine retinal degeneration model, suggesting that the presence of MSCs is not necessary for neuroprotection; (ii) the neuroprotective capacity of the bmMSC secretome may be associated with activation of the antioxidant machinery, favorable modulation of autophagy, and the inhibition of apoptosis and necroptosis during retinal degeneration. The significance of these findings highlights the bmMSC secretome as a potential therapy for retinal neurodegenerative diseases.

I. INTRODUCCIÓN

La vista es uno de nuestros sentidos más importantes para el desenvolvimiento en la vida diaria; por ello la discapacidad visual o la ceguera es una dificultad que impacta significativamente en la vida de más de 200 millones de personas en todo el mundo (Gagliardi et al., 2019).

La retina, que recubre la parte posterior del ojo y es sensible a la luz, es parte del sistema nervioso central (SNC). La retina está constituida por múltiples capas de neuronas sensoriales que responden a la luz, las cuales al sufrir daño o muerte celular ocasionan la mayoría de las formas de ceguera intratable (Kolb, 2003). Las enfermedades que afectan a la retina, incluyendo el glaucoma, la degeneración de fotorreceptores o la retionopatía diabética, afectan a 11,8 millones de personas en los EE.UU. (Pardue & Allen, 2018); y las estimaciones para el año 2040 de personas con degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) a nivel mundial serian alrededor de 300 millones (Wong et al., 2014).

La neurodegeneración retiniana es un proceso común que comparten muchas patologías de la retina (Gagliardi et al., 2019; Cuenca et al., 2014). La neurodegeneración de la retina no solo se caracteriza por procesos de muerte celular, sino también por cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos a nivel transcripcional y traduccional (Murakami et al., 2013). Además, durante la neurodegeneración de la retina, también están implicados los procesos de estrés oxidativo, inflamación y muerte celular, los cuales alteran la homeostasis de la retina (Puertas-Neyra et al., 2022). La neurodegeneración puede ser desencadenada por diferentes causas como alteraciones genéticas, variaciones en la presión intraocular, alteraciones en los niveles de glucosa, estrés o envejecimiento (Cuenca et al., 2014).

A pesar del impacto social y económico que causan estas enfermedades en la vida diaria de las personas, y debido a que el proceso de neurodegeneración es irreversible, no existen tratamientos que las curen o retarden su progresión (Cuenca et al., 2014). Actualmente, una de las nuevas opciones terapéuticas para este tipo de enfermedades es la terapia con células madre, la cual puede ser una potencial alternativa de cura. La

investigación en terapia celular para la neurodegeneración de la retina se basa en dos enfoques terapéuticos principales: el reemplazo de las células dañadas y la neuroprotección por las propiedades paracrinas que tienen las células madre (Cuenca et al., 2014; Bhattacharya et al., 2017; Gagliardi et al., 2019). Dentro de las células más estudiadas para este tipo de tratamiento se encuentran las células madre mesenquimales (MSC), las cuales pueden ser aisladas fácilmente de humanos, se expanden rápidamente, tienen capacidad inmunomoduladora y no se requiere inmunosuprimir al hospedero para ser aplicadas; además, su uso no supone problemas éticos debido a que provienen de donantes adultos que han dado su consentimiento (Nauta & Fibbe, 2007; Usategui-Martín et al., 2020).

Las enfermedades retinianas, aunque son clínicamente diferentes, comparten vías neurodegenerativas comunes (Cuenca et al., 2014). En este sentido se podría enfocar el uso de células madre destinadas a la neuroprotección basándose en la premisa de que la neurodegeneración de la retina proporciona un medio adecuado para que las células madre secreten factores destinados a la neuroprotección permitiendo que las células de la retina prolonguen su viabilidad y funcionalidad durante más tiempo (Usategui-Martin & Fernandez-Bueno, 2021). En este escenario, el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la producción de “Cocteles de secretoma de MSC” (libre de células) con características neuroprotectoras podrían ser una opción para el tratamiento de estas enfermedades; además de tener grandes ventajas para su aplicación en la práctica clínica (Vizoso et al., 2017).

Por todo lo mencionado, en el presente trabajo se busca evaluar el efecto neuroprotector del secretoma de células madre mesenquimales de médula ósea en un modelo porcino de neurodegeneración retiniana *in vitro*, además, evaluar si el secretoma es capaz de modular la respuesta retiniana a nivel celular y molecular durante el proceso neurodegenerativo.

II. ANTECEDENTES

2.1 La retina y su estructura

La retina es un tejido sensible a la luz y está formado por múltiples capas de células neuronales interconectadas que se encargan de las primeras etapas de la visión (Cuenca et al., 2014). La retina contiene al epitelio pigmentario de la retina (EPR) y a la neuroretina (Gupta et al., 2016; Vecino et al., 2016) **(Figura 1)**. A su vez la neuroretina está compuesta por seis tipos de células neuronales (dos fotorreceptores (FR): conos y bastones; células horizontales, bipolares, amacrinas y ganglionares) y por tres tipos de células gliales (astrocitos, células de Müller y microglia) (Reichenbach & Bringmann, 2019; Behar-Cohen et al., 2020).

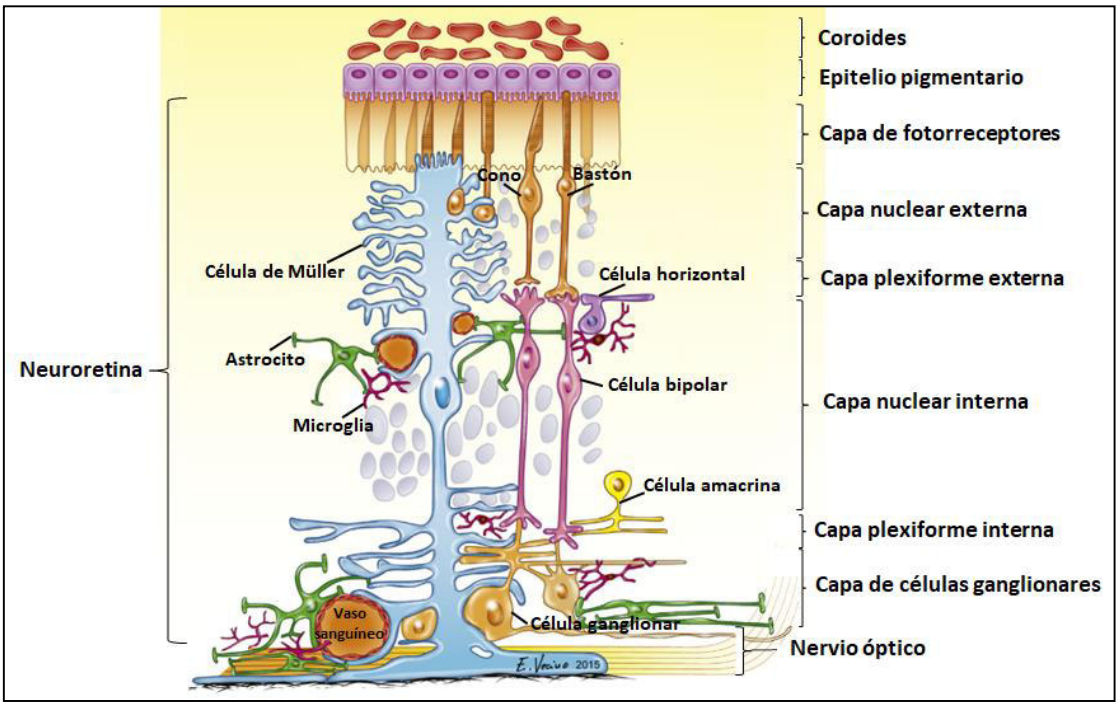


Figura 1. Las capas de la retina y sus componentes celulares. Obsérvese la distribución de los distintos tipos de células neuronales y la interacción de las células gliales con los vasos sanguíneos. Fuente: adaptado de Vecino et al., 2016.

El EPR está compuesto por células con microvellosidades apicales que interactúan con los segmentos externos de los FR, manteniendo la homeostasis de la retina mediante el transporte de nutrientes y la eliminación de segmentos de los FR que se desprenden (Ruan et al., 2020).

La neuroretina está dividida en capas; siendo la primera la de los FR, fotosensores responsables de la fototransducción. Los vertebrados, tienen al menos dos tipos de FR, los bastones que son responsables de la visión en luz tenue y representan el 95% en la retina humana, y los conos que son responsables de la visión diurna, color y brillo (Kolb, 2003; Gagliardi et al., 2019). Seguidamente, está la capa plexiforme externa (OPL), dónde las dendritas de las células bipolares, conos y bastones establecen conexiones sinápticas con las terminaciones axonales de los bastones (esférulas) y conos (pedículos), respectivamente (Cuenca et al., 2014). Luego se ubica la capa nuclear interna (INL), dónde se encuentran los cuerpos de las células horizontales y células bipolares. Posteriormente se ubican las células amacrinas, las cuales junto a las células bipolares establecen una red compleja de interconexiones sinápticas en la capa plexiforme interna (IPL), con las células ganglionares. Finalmente, la información eléctrica se transmite a las células ganglionares, que envían impulsos nerviosos a través de sus prolongaciones axonales que conectan la retina con el cerebro a través del nervio óptico (Kolb, 2003; Cuenca et al., 2014).

2.2 Enfermedades neurodegenerativas de la retina y tratamientos actuales

Los mecanismos degenerativos de las enfermedades retinianas interrumpen la interconectividad entre neuronas, ocasionan alteraciones morfológicas y del ambiente de la retina, pudiendo causar pérdida de la visión en muchos pacientes (Ikelle et al., 2020). La prevalencia de las enfermedades de la retina se está incrementando a nivel mundial, por lo tanto representan un serio problema para la salud pública, debido a su alto costo social (Micera et al., 2021), llegándose a estimar un impacto en más de 587 millones de personas para el año 2050 (Ikelle et al., 2020). En el Perú, el 30,5% de los casos de ceguera son originados por enfermedades de la retina y el nervio óptico (Campos et al., 2014), sugiriendo que se requiere desarrollar programas de detección y tratamiento en las etapas iniciales de estas enfermedades para la prevención de la pérdida de agudeza y campo visual.

Las causas de las enfermedades neurodegenerativas de la retina pueden ser diversas; por ejemplo, el glaucoma, es la principal causa de la pérdida de la visión a nivel mundial y está caracterizado por la degeneración de las células ganglionares de la retina, desencadenando un daño en el nervio óptico (Buckingham et al., 2008). La degeneración de los fotorreceptores ocurre en muchas enfermedades como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y la retinopatía diabética; además, las enfermedades genéticas como la retinitis pigmentosa, la amaurosis congénita de Leber, el síndrome de Usher y la enfermedad de Stargardt, causan ceguera irreversible a nivel mundial (Cuenca et al., 2014). Además de las enfermedades mencionadas anteriormente, el espectro de las patologías retinianas incluye otras enfermedades vasculares, inflamatorias, neoplásicas, traumatismos y enfermedades sistémicas; pudiendo producir la degeneración de los fotorreceptores (Gupta et al., 2016).

Las actuales estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina han sido poco efectivas (incluyendo la administración de factores de crecimiento endotelial anti vascular, prótesis electrónicas y tratamientos farmacológicos), debido a que sólo retardan la progresión de la neurodegeneración y no logran regenerar la retina o el EPR (Tang et al., 2017); además, no tienen efecto en las etapas tardías (cuando la disfunción celular ha desencadenado la muerte celular). Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentes de los Estados Unidos, ha aprobado una terapia génica (Luxturna™) para la retinitis pigmentosa y amaurosis congénita de Leber; pero sólo para las que son causadas por mutaciones en la isomerohidrolasa retinoide RPE65; también existe otra terapia que utiliza altas dosis de vitamina A (15000 unidades/día) y DHA, pero tiene un efecto positivo de corto tiempo y es potencialmente tóxico (Ikelle et al., 2020).

2.3 Procesos involucrados en la neurodegeneración de la retina

La neurodegeneración de la retina puede ser causada por defectos genéticos, incremento de la presión ocular, altos niveles de glucosa en la sangre, procesos de estrés o envejecimiento; desencadenando una

remodelación morfológica de la retina y cambios a nivel histológico, molecular y genético (Ikelle et al., 2020), alterando la conectividad entre las neuronas y desencadenando la muerte celular progresiva seguida de un aumento de la respuesta de las células gliales (Usategui-Martin & Fernandez-Bueno, 2021). El proceso de neurodegeneración ocurre en diferentes fases **(Figura 2)** y se ha descrito que es común en las diferentes patologías de la retina. La primera fase se caracteriza por la disfunción de los FR; en la segunda fase, el estrés celular induce la apoptosis de los conos y bastones, estimulando la migración de las células gliales; en la tercera fase se produce muerte neuronal a gran escala activando las microglias y finalmente, en la cuarta fase, la pérdida de estructura es total y se detecta la invasión por vasos sanguíneos y la migración de las células del EPR (Cuenca et al., 2014; Ikelle et al., 2020; Usategui-Martin & Fernandez-Bueno, 2021).

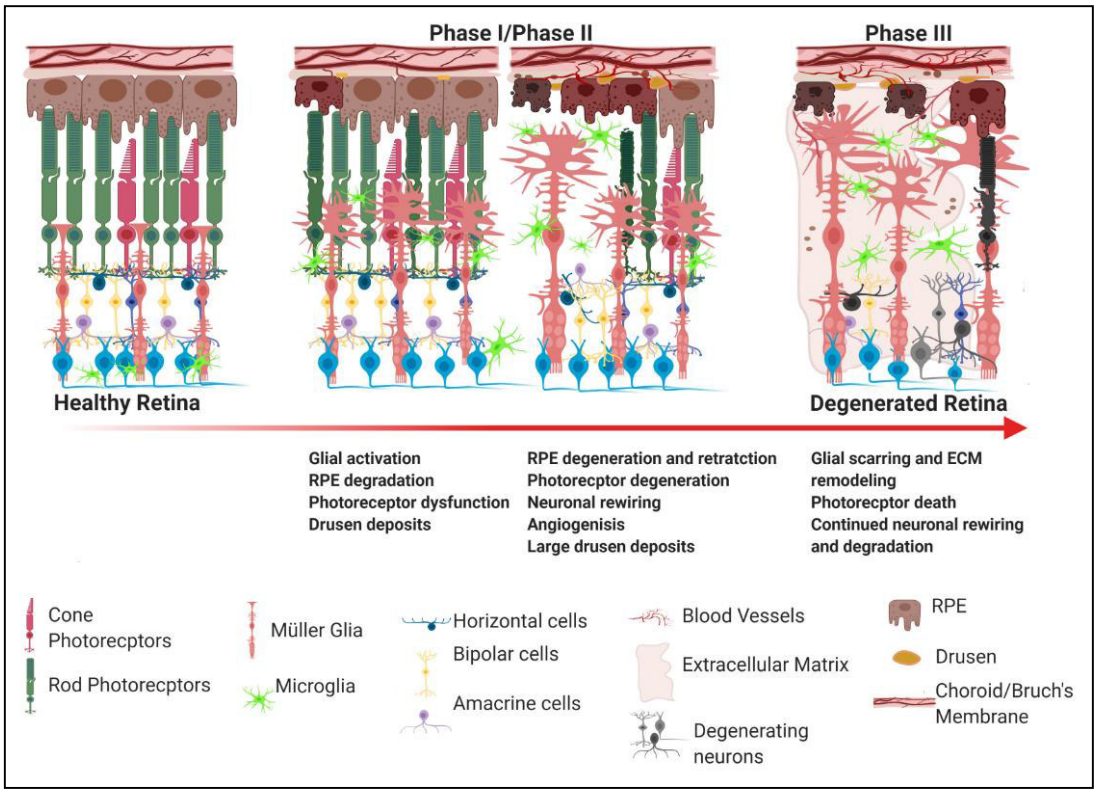


Figura 2. Progresión de la degeneración de la retina. Se observa a través de las fases la atrofia progresiva de los fotorreceptores, la remodelación glial, la degradación del epitelio pigmentario de la retina y la neovascularización coroidea. Fuente: adaptado de Ikelle et al., 2020.

Durante la neurodegeneración de la retina, los cambios no sólo se dan a nivel estructural y celular, sino también a nivel molecular; siendo reportado

un incremento en la expresión de genes pro-apoptóticos, pro-necroptóticos así como sus proteínas en el modelo de degeneración *in vitro* de la retina (Puertas-Neyra et al., 2022). Esto refuerza la idea de que la interconexión entre los mecanismos de muerte celular y autofagia puede brindar nueva información respecto a la neurodegeneración en la retina. Así mismo, la neurodegeneración es el mecanismo que está mayormente involucrado en las enfermedades de la retina (Usategui-Martín et al., 2020); sin embargo, aunque la etiología, patogenia y características clínicas sean muy diferentes, la respuesta celular y molecular a la neurodegeneración de la retina es similar, observándose que el estrés oxidativo, la respuesta inflamatoria, la gliosis reactiva, la activación de la muerte celular y la autofagia son comunes en estas enfermedades (Cuenca et al., 2014).

Durante la degeneración, el estrés oxidativo se produce por el desbalance entre la generación y eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), relacionándose los altos niveles de ROS con la degeneración neuronal, disfunción vascular endotelial y la inflamación en la retina. Además, el incremento de ROS puede promover el aumento de citocinas proinflamatorias, incluyendo la interleucina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNFa), dando como resultado la inflamación y muerte celular (Ruan et al., 2020). En la retina, la iniciación de los procesos inflamatorios y la reparación de tejidos es realizado por la microglia (Reichenbach & Bringmann, 2019). En las etapas iniciales de la neurodegeneración, las células de la microglia se activan y expresan quimioquinas y el factor TNFa, desencadenando mecanismos de reparación; sin embargo, cuando hay una activación excesiva o prolongada, esta activación puede ocasionar inflamación crónica, con efectos secundarios patológicos graves que pueden resultar en la muerte neuronal irreversible (Cuenca et al., 2014). Muchos estudios indican que no sólo las vías de apoptosis sino también las de autofagia y necroptosis están envueltas en la muerte de los fotorreceptores y que la modulación de estos mecanismos podría ser una estrategia exitosa con efecto neuroprotector para el tratamiento de estas enfermedades (Cuenca et al., 2014).

2.4 Terapias avanzadas y uso del secretoma de MSC

Las terapias avanzadas son un grupo muy diverso de medicamentos, los cuales pueden ser productos médicos basados en genes (terapia génica), en células (terapia celular somática) o en tejidos (ingeniería tisular); estos nuevos tratamientos desarrollados con tecnologías disruptivas, representan una fuente potencial para la terapia de diversas enfermedades que hasta la fecha no tienen cura (Gonçalves, 2020).

Actualmente, la evaluación de la terapia con células madre para enfermedades de la retina se puede realizar con células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas y células madre mesenquimales (Tang et al., 2017). Las MSC tienen varias ventajas ya que se encuentran fuera de dilemas éticos, son fáciles de aislar y de rápido crecimiento. Así mismo, el uso de las MSC es recomendado por no generar respuesta inmune, debido a que el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) o las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) que están involucradas en el rechazo de los trasplantes, no están expresados en su superficie. Por lo tanto, el trasplante alogénico de estas células es atractivo ya que no se requiere inmunosupresión (Usategui-Martín et al., 2020). Adicionalmente, la aplicación de estas células como alternativa terapéutica no sólo se enfoca en la reparación y reemplazo de células dañadas, sino también en la reparación de tejidos a través de la liberación se sustancias con actividad paracrina y autocrina, reportándose que cerca del 80% del efecto terapéutico de las células madre adultas está mediado por los mecanismos paracrinos los cuales pueden regular: la actividad antimicrobiana, la diferenciación de células, la construcción de la matriz extracelular, la modulación del sistema inmune, entre otros (Maguire, 2013). Además, estudios recientes han reportado que menos del 1% de las MSC sobreviven por más de una semana luego de la administración sistémica, sugiriendo que el mayor efecto de las MSC está probablemente mediado por los mecanismos paracrinos (Vizoso et al., 2017).

Por lo expuesto anteriormente, el actual enfoque de la terapia celular de las enfermedades neurodegenerativas de la retina es la neuroprotección, a través de las propiedades paracrinas del secretoma de las células madre. El secretoma se puede definir como el conjunto de moléculas bioactivas (DNA, fragmentos de RNA, microRNAs, enzimas, proteínas solubles, lípidos, factores de crecimiento, inmunomoduladores, exosomas y vesículas extracelulares) que son secretadas por las células al medio extracelular bajo determinadas condiciones (Harrell et al., 2019). Se ha reportado que varias proteínas secretadas por las células madre tienen un efecto neuroprotector, promoviendo el mantenimiento de la homeostasis celular y preservando la viabilidad celular, contrarrestando los síntomas y fenómenos asociados a las enfermedades de la retina (Labrador-Velandia et al., 2019**;** Usategui-Martin & Fernandez-Bueno, 2021); sin embargo, el mecanismo de acción del efecto neuroprotector del secretoma sobre la degeneración de la retina, aún no es claro (Usategui-Martin & Fernandez-Bueno, 2021).

Es por ello que estudios recientes enfocan su atención en la amplia gama de factores bioactivos producidos por las MSC, que pueden jugar un rol importante en la regulación de numerosos procesos fisiológicos. Por lo tanto, el secretoma de las MSC es atractivo para su uso potencial en la reparación y regeneración de tejidos (Vizoso et al., 2017); además que el secretoma derivado de este tratamiento puede presentar varias ventajas frente al tratamiento con células, en términos de producción, almacenamiento, manejo, tiempo de vida del producto y facilidad para el transporte y aplicación como un producto biológico (Vizoso et al., 2017).

En este escenario, el desarrollo de una estrategia terapéutica libre de células basada en la producción de “cócteles de secretoma de MSC” con características neuroprotectoras, con efecto antioxidante, anti-apoptótico y/o capacidad antiinflamatoria, podría ser una potencial opción terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina.

Por todo lo mencionado, el presente trabajo busca caracterizar el efecto neuroprotector del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea (bmMSC), obtenido bajo condiciones de degeneración de neuroretina, sobre el proceso de neurodegeneración de la retina y determinar

su efecto sobre la regulación de los mecanismos de muerte celular, necroptosis, autofagia, estrés oxidativo e inflamación.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El secretoma de las células madre mesenquimales humanas procedentes de médula ósea (bmMSC), obtenido bajo condiciones de degeneración de neuroretina, tiene un efecto neuroprotector sobre la neurodegeneración de la retina.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea (bmMSC), obtenido bajo condiciones de degeneración de neuroretina, sobre un modelo *ex vivo* de degeneración de retina porcina.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del secretoma de bmMSC sobre los cambios morfológicos que ocurren durante la neurodegeneración retiniana.

2. Evaluar el efecto del secretoma sobre la respuesta molecular frente al proceso neurodegenerativo a través de la expresión de genes involucrados en procesos de muerte celular programada, autofagia, estrés oxidativo e inflamación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Células madre mesenquimales de médula ósea humana

4.1.1 Obtención de células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales de médula ósea (bmMSC) fueron provistas por Citospin (Valladolid, España), la cual cuenta con la aprobación de la Agencia Española de Medicamentos en ensayos clínicos (European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials Database [EudraCT] y clinicaltrials.gov indentificador: 2011-005321-51 (NCT01586312) y 2016-003029-40 (NCT03173638)). Las bmMSC fueron obtenidas de dos donadoras sanas de 51 y 54 años y fueron producidas bajo buenas prácticas de manufactura reguladas.

4.1.2 Caracterización y cultivo de células madre

La caracterización de las bmMSC se realizó de acuerdo a los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular; siendo positivas para los antígenos de células madre mesenquimales (CD105, CD90, CD73 y CD166) y negativas para los marcadores específicos de células hematopoyéticas (CD14, CD34, CD45 y HLA-DR). La viabilidad celular y los recuentos celulares se determinaron mediante el ensayo con azul tripán (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y un contador celular automático TC20 (Bio-Rad, EE.UU.).

Las bmMSC se cultivaron en el fondo de placas de cultivo Transwell de 24 mm de diámetro (Corning Life Sciences, EE.UU.) en el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco-Invitrogen, Reino Unido), antibióticos al 1% (100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina) (Gibco-Invitrogen, EE.UU.) y L-glutamina al 1% (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Se cultivaron 30000 células/pocillo de bmMSC a 37 ºC y 5% de CO_2 durante 72 horas, y posteriormente fueron co-cultivadas con los explantes de neuroretina.

4.1.3 Evaluación inmunohistoquímica de las células madre

Las bmMSC fueron fijadas en metanol frío (Panreac Química, España) a 4 ºC por 15 minutos. La evaluación inmunohistoquímica de las bmMSC fue realizada con el kit de caracterización de MSC humanas (Millipore, EE.UU.). Las muestras se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios a una dilución de 1:500 durante toda la noche a 4 ºC:

- Cluster de diferenciación presente en Linfocitos B (CD19) (Millipore, EE.UU.).
- Cluster de diferenciación presente en Leucocitos (CD14) (Millipore, EE.UU.).
- Molécula de adhesión de células (H-CAM o CD44) (Millipore, EE.UU.).
- Molécula de adhesión de células de melanoma (M-CAM o CD146) (Millipore, EE.UU.).
- Antígeno de superficie celular Thy-1 (THY-1 o CD90) (Millipore, EE.UU.).

Seguidamente se agregó el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 verde (Molecular Probes - Eugene, EE.UU.) a una dilución de 1:200 y fue incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 10 µg/mL) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron en PBS (buffer fosfato salino) y se les agregó solución de montaje para fluorescencia (Dako, Dinamarca) y se puso cubreobjetos.

4.2 Cultivo organotípico de explantes de neuroretina porcina. Modelo *ex vivo* de neurodegeneración retiniana

4.2.1 Obtención de globos oculares

Se obtuvieron globos oculares de cerdos que tenían entre 6 y 8 meses de edad, procedentes del matadero local Justino Gutiérrez S.L. (Laguna de Duero, Valladolid, España). Luego de sacrificar los animales, se extirparon los globos oculares usando pinzas de enucleación y se conservaron en el medio de transporte DMEM suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico (10000 IU/mL Penicilina, 10 mg/mL

Estreptomicina, 25 µg/mL Anfotericina B), el cual se mantuvo en cadena de frío durante su traslado.

4.2.2 Preparación de explantes de neuroretina porcina

Los explantes de neuroretina fueron procesados durante las 2 horas posteriores a la obtención de los globos oculares, según la metodología descrita por Fernandez-Bueno & Usategui-Martín, 2021; la cual se detalla en la **Figura 3**. Los cultivos de los explantes de neuroretina se mantuvieron a 37 ºC a 5% de CO_2 en 1,5 mL de medio DMEM/Neurobasal-A suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% L-glutamina, 2% B-27 y 1% de antibiótico/antimicótico (DMEM suplementado) **(Figura 4)**.



Figura 3. Preparación de explantes de neuroretina de los globos oculares. (A) Inmersión en etanol y lavados en DMEM limpio. (B) Punción escleral en la ora serrata y (C, D) disección del globo ocular en los oculares anterior y posterior. (E, F) Extirpación del vítreo del ocular posterior. (G) Desprendimiento de neuroretina del epitelio pigmentario mediante suave cepillado y corte del nervio óptico. (H-I) Deposición de neuroretina desprendida en medio de cultivo y (J, K) corte en explantes. (L) Transferencia de explantes de neuroretina y (M) deposición en la membrana. (N) Ubicación de la neuroretina en el medio de la membrana mediante cepillado. (O) Adición de medio de cultivo a las placas que contienen la membrana con el explante de neuroretina. Fuente: tomado de Fernandez-Bueno & Usategui-Martin, 2021.

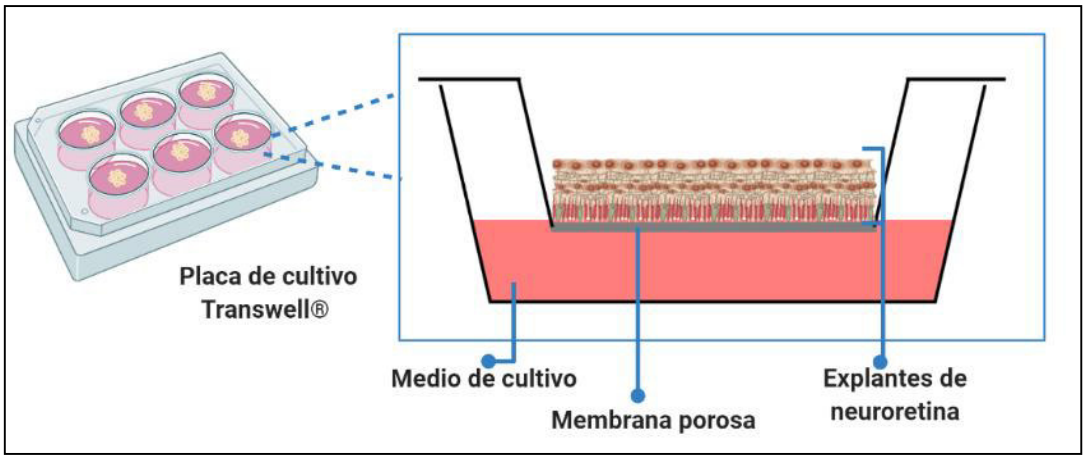


Figura 4. Cultivo organotípico de explante de neuroretina. Los explantes son cultivados sobre membranas porosas estando en contacto con el medio de cultivo. Fuente: elaboración propia.

4.3 Obtención del secretoma de las células madre mesenquimales de médula ósea

En primer lugar, se co-cultivaron los explantes de neuroretina con las bmMSC en condiciones de neurodegeneración (incubación a 37 ºC, 5% de CO_2 en 1,5 mL de medio DMEM suplementado por 72 horas, **Figura 5**). Cumplido el tiempo, se extrajo el medio de cultivo que contenía todo lo secretado por las bmMSC, el cual se denominó secretoma, y fue almacenado a – 80 ºC hasta su posterior uso.

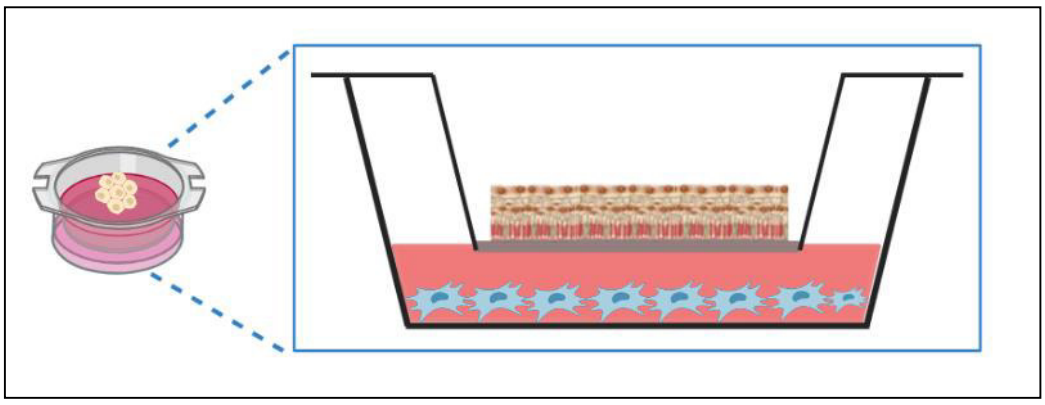


Figura 5. Co-cultivo del explante de neuroretina con las bmMSC. Obsérvese que la membrana de la placa Transwell previene la migración de las bmMSC y su integración al tejido de la retina. Fuente: elaboración propia.

4.4 Diseño experimental

Para la evaluación del efecto de cada condición sobre el proceso de la neurodegeneración de la retina se establecieron las diferentes condiciones experimentales **(Figura 6)**:

- **Grupo 1: explantes de neuroretina control (NR fresca, n=12):** control inicial antes de someter a las condiciones de cultivo. Neuroretinas analizadas recién extraídas del globo ocular.
- **Grupo 2: explantes de neuroretina en monocultivo (NR, n=12):** control del proceso de neurodegeneración en condiciones de cultivo. Se cultivaron los explantes de neuroretina únicamente con 1,5 mL de medio DMEM suplementado durante 72 horas.
- **Grupo 3: explantes de neuroterina co-cultivados con bmMSC (NR+MSC, n=12):** las neuroretinas se cultivaron durante 72 horas en presencia de bmMSC con 1,5 mL de medio DMEM suplementado.
- **Grupo 4: explantes de neuroretina cultivados con el secretoma (NR+S, n=12):** las neuroretinas se cultivaron durante 72 horas con 0,75 mL de medio DMEM suplementado y 0,75 mL del secretoma.

Las condiciones de cultivo fueron las mismas para los grupos 2, 3 y 4, siendo mantenidos a 37 ºC y 5% de CO_2 atmosférico. Una vez finalizado el experimento las muestras se procesaron para su utilización en los estudios inmunohistoquímicos y de expresión génica.

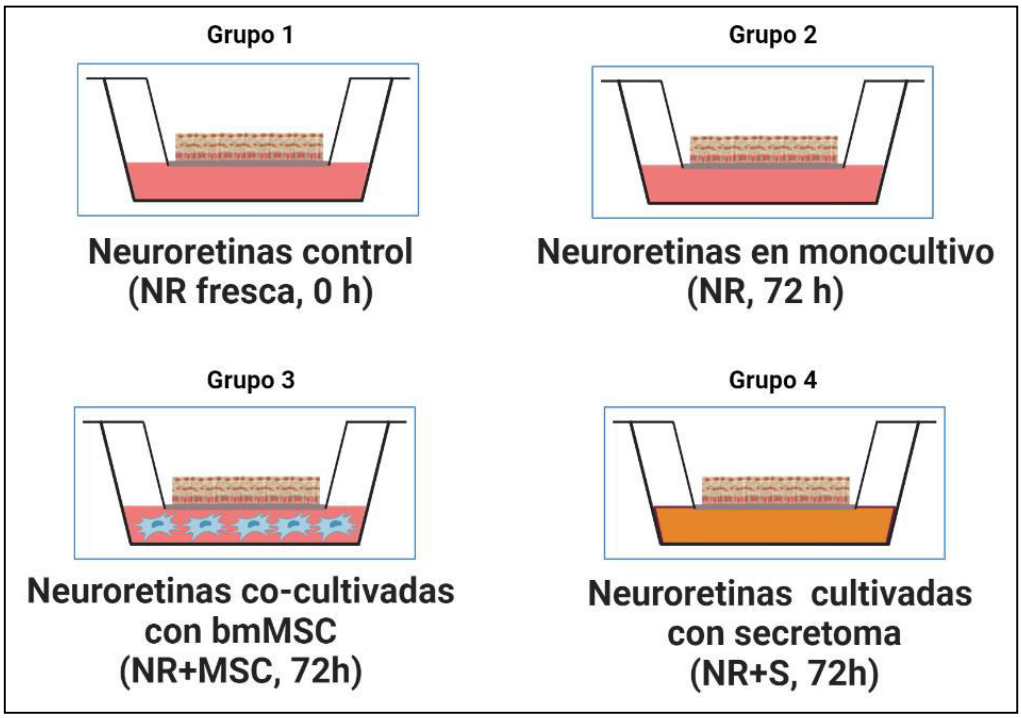


Figura 6. Condiciones experimentales. El proceso de la neurodegeneración de la retina en los cultivos de explantes *ex vivo* se evaluó en las 4 condiciones experimentales que se muestran en la figura. Fuente: elaboración propia.

4.5 Caracterización inmunohistoquímica de la morfología de la neuroretina

4.5.1 Procesamiento de las muestras de neuroretina

Los explantes de neuroretina se fijaron en paraformaldehido al 4% en PBS durante 1 hora a 4 ºC y luego fueron lavados 3 veces con PBS a 4 ºC. Seguidamente, para la criopreservación se procesaron a 4 ºC en gradiente de sacarosa al 15% en PBS por 2 horas, luego al 20% por 2 horas y al 30% por 12 horas (Fernandez-Bueno & Usategui-Martín, 2021). Al día siguiente las neuroretinas fueron incluídas en Tissue-Tek® (O.C.T.™ Compound, Países Bajos) a 4 ºC y fueron cortadas en secciones de 12 µm en el criostato (CM1900; Leica, Alemania) y puestas sobre portaobjetos tratados (SuperFrost® Plus; Alemania). Finalmente se almacenaron a -20 ºC hasta su uso.

4.5.2 Evaluación inmunohistoquímica de las neuroretinas

Para evaluar el proceso de la neurodegeneración de la retina en los explantes de cada grupo experimental, se evaluó la inmunoexpresión de las siguientes proteínas, las cuales participan en los procesos de neurodegeneración (Cuenca et al., 2014):

- Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)
- Lectina de aglutinina de maní (PNA)
- Isoforma α de la proteína quinasa C (PKCa),
- Proteína rodopsina (Rho)
- Proteína nuclear neuronal (NeuN)
- Proteína p62
- Factor inductor de la apoptosis (AIF)
- Proteína similar al dominio de quinasa de linaje mixto (MLKL)

Para la caracterización inmunohistoquímica, las muestras de neuroretina se descongelaron y lavaron con PBS, posteriormente se bloquearon con suero de cabra al 5% (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y Triton X-100 al 0,1% en PBS (Sigma-Aldrich, EE.UU.) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después se aplicaron los anticuerpos primarios en sus condiciones respectivas, según se detalla en la **Tabla 1**.

El anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 568 rojo (Molecular Probes - Eugene, EE.UU.), se usó a una dilución de 1:200 y fue incubado por 2 horas a temperatura ambiente. La tinción de los núcleos fue empleando DAPI (10 µg/mL) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron en PBS y se montaron con solución de montaje para fluorescencia (Dako, Dinamarca) y con cubreobjetos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para n = 6 por condición experimental.

Tabla 1. Anticuerpos primarios para los explantes de retina y sus condiciones experimentales

Marcador molecular	Origen del Anticuerpo	Marca	Dilución de Trabajo	Tiempo de Incubación	Temperatura Incubación	Especificidad
Proteína ácida glial fibrilar (GFAP)	Conejo	DakoCytomation inc, #n1506 (Glostrup, Dinamarca)	1:250	1 hora	Ambiente	Astrocitos, células de Müller reactivas
Lectina de aglutinina de maní (PNA)	Maní	Molecular Probes inc, #L-21458 (Oregon, EE.UU.)	1:100	1 hora	Ambiente	Segmento externo de los conos
Isoforma α de la proteina quinasa C (PKCa)	Conejo	Santa Vcruz Biotechnology, #SC-108000 (California, EE.UU.)	1:100	12 horas	Ambiente	Células bipolares de bastón
Rodopsina (Rho)	Conejo	Chemicon-Millipore, #AB9279 (California, EE.UU.)	1:100	12 horas	4 ºC	Segmento externo de los bastones
Proteína nuclear neuronal (NeuN)	Ratón	Merck-Milipore, #ABN78 (California, EE.UU.)	1:150	1 hora	Ambiente	Proteína de unión a ADN en células ganglionares
Proteína p62	Ratón	Abcam, #AB56416 (Cambridge, Reino Unido)	1:150	24 horas	4 ºC	Receptor de la autofagia en el citoplasma
Factor inductor de la apoptosis (AIF)	Ratón	Sigma-Aldrich, #HPA030611 (Saint Louis, EE.UU.)	1:100	24 horas	4 ºC	Fotorreceptores
Proteína similar al dominio de quinasa de linaje mixto (MLKL)	Ratón	Sigma-Aldrich, #SAB1408428 (Saint Louis, EE.UU.)	1:200	24 horas	4 ºC	Fotorreceptores

4.5.3 Adquisición de imágenes por inmunofluorescencia

Las muestras se observaron en el microscopio confocal LEICA TCS SP8 LIGHTNING (Leica Microsystems, Alemania) y fueron analizadas por el software LEICA LAS AF. El procesamiento y composición final de las figuras fue realizado con Pixelmator 3.8.2 Phoenix (Pixelmator Team, Lituania).

4.6 Análisis de expresión relativa del mRNA.

4.6.1 Extracción de mRNA

Los explantes de neuroretina fueron sumergidos en solución estabiliazante de RNA (Invitrogen, EE.UU.) y almacenados a – 80 ºC hasta la extracción de RNA con trizol (Invitrogen, EE.UU.) como se detalla a continuación: se homogeneizó con 1 mL de Trizol (Invitrogen, EE.UU.) en un microtubo de 1,5 mL RNAse-free (Eppendorf, EE.UU.) y se incubó 10 minutos a 4 ºC. Luego se añadieron 200 µL de cloroformo y se mezcló brevemente con vortex y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12000 g a 4 ºC durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y posteriormente se pasó a un nuevo microtubo RNAse-free. Se añadieron 500 µL de isopropanol y se agitó por inversión y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12000 g a 4 ºC durante 15 minutos, y luego se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µL de etanol al 70%. Seguidamente, se centrifugó a 7000 g durante 5 minutos a 4 ºC. Se descartó el sobrenadante con cuidado y se secó 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el RNA en 50 µL de buffer de elución. Se almacenó a -20 ºC y se pasó a -80 ºC hasta su uso. La cuantificación y pureza del RNA fue determinada por absorbancia a 260-280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo, EE.UU.).

4.6.2 Síntesis de DNA complementario

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA), se realizó una reacción de retrotranscripción usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen, EE.UU.) siguiendo el manual del fabricante para el análisis de expresión de mRNA. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µL: 2 µL de RT Buffer 10x, 0,8 µL de dNTP Mix 25x, 2 µL de

RT Random Primers 10x, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µL de inhibidor de RNAsa, 3,2 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de RNA (a la cual previamente se le ajustó la concentración para no superar los 2 µg/µL). El programa de retrotranscripción se muestra en la **Tabla 2**; finalizado el proceso las muestras se almacenaron a -20 ºC y posteriormente a -80 ºC.

El análisis de la pureza del RNA y su cuantificación fue determinada por la absorbancia de 260-280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo, EE.UU.).

Tabla 2. Programa de la síntesis de cDNA

Temperatura (ºC)	Tiempo (minutos)
25	10
37	120
85	5
4	∞

4.6.3 Amplificación de los marcadores de interés mediante PCR cuantitativa comparativa en tiempo real (qPCR)

El experimento para evaluar la expresión génica se realizó mediante la amplificación del cDNA sintetizado previamente usando PCR cuantitativa comparativa en tiempo real (qPCR). Para la reacción de qPCR se empleó SYBR Green master mix (Applied Biosystems, EE.UU.) y los oligonucleótidos que se detallan en la **Tabla 3**. La reacción de amplificación tuvo un volumen final de 10 µL: 5 µL de Master Mix SYBR Green, 1 µL de Primer´s forward y reverse 20 µM, 1,5 µL de agua libre de nucleasas, 2,5 µL de cDNA (previamente cuantificado y diluido a la concentración de 2 µg/µL).

Las condiciones de amplificación se detallan en la **Tabla 4**, la cual se realizó en el termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EE.UU.). El análisis de la curva de melting se realizó para detectar la especificidad de los primers. Por otro lado, el gen endógeno usado fue el *GAPDH* (Gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa), para realizar la normalización de los niveles de expresión del mRNA. Para cada reacción se determinó el valor del ciclo umbral “CT” (Threshold cycle) y la expresión génica se cuantificó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Todas las reacciones realizadas de qPCR se ejecutaron por triplicado para n = 6 por condición experimental.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos específicos para qPCR

Función	Gen	Primer Forward (5' – 3')	Primer Reverse (5' – 3')
Apoptosis	***BAX***	GAAGTTGAGCGAGTGTCT	AGTTGAAGTTGCCGTCAG
	BCL2	TCATGAGTGTCAACTACCTG	TTGAGGAAGAGTAGGCTGTG
	CASP3	GGATTGAGACGGACAGTG	TTCGCCAGGAATAGTAACC
	CASP8	GCATCATCTACGGCTCTG	ATAGGCTTCTGTCTGTTCTG
	CASP9	ACAGATGGATGTCCTGTGTC	ACCCATGGTCTTTCTGTTCC
Necroptosis	***MLKL***	CCCAGTTGCAGGAGGTCATT	CACGTGGCTTCACAAAAGGG
	RIPK1	GGAGCATAACGAGCAGCGGAAG	CCAGAGCACGATGGCGAAGC
	RIPK3	CATCGGGACCTCAAACCCTC	TCCCTGAAATGTGGACAGGC
Autofagia	***ATG7***	CGGGAACACTGTATAACACC	TCCTGCAAACGTCAAGAGGA
	BECLIN1	AGGAGCTGCCGTTGTACTGTTCT	TGCTGCACACAGTCCAGGAA
	LC3B	AACGAAATTCCTGGTGCCTGA	AAGGCTTGGTTAGCATTGAGCTG
	MTOR	ACTGGTTTCCAGCTCAGATG	TGGCAAATCTTCCGATTCGG
	SQSTM1	CGCTTCAGCTTCTGTTTCAG	TACGACATCGCCATCGTCAGTT
Estrés oxidativo	***COX2***	CAACACCCATGGGTGTGAAA	ACATCATGTTTGTGCCCTGG
	CYBB	TGGCGTGGATGATTGCACTT	GAGAGTGCTATTGAGTACGG
	GPX6	GACAGGCACCATCTATGAGT	CAGTTCAGGATACTGAGCTG
	SOD1	CAGTGTTAGTAACGGGAACC	ACACCATCTTTGCCAGCAGT
	TXN2	TTGTCAACAGTGAGACGCCA	TGTGTGGTCGTCGATATCCA
	TXNRD1	CCTGTATCAACAGCCATCCTGT	TTCACAAACACAACGGGCACGT
Inflamación	***IL1***	ATCAGGCAGATGGTGTCTGT	GCACGTTTCAAGGATGATGG
	IL10	GGCCCAGTGAAGAGTTTCTT	CTGGATCATCTCTGACAAGG
	IL6	AGGAACCCAGCTATGAACTC	AGTAGCCATCACCAGAAGCA
	TGFB1	CCTGGATACCAACTACTGCT	GTAGCCCTTGGGTTCATGAA
	TNFA	TCTTCTGCCTACTGCACTTC	ATACCCACTCTGCCATTGGA
Gen endógeno	***GAPDH***	GGACTCATGACCACGGTCCAT	TCAGATCCACAACCGACACGT

Tabla 4. Programa de la qPCR

Temperatura (ºC)	Tiempo	Ciclos
95	10 minutos	1
95	15 segundos	40
60	1 minutos	
95	15 segundos	Curva de Melting
60	1 minuto	
95	15 segundos	
60	15 segundos	

Los genes analizados fueron los siguientes:

- **Genes relacionados a la apoptosis:** linfoma de células B2 *(BCL2)*, proteína X asociada a BCL2 *(BAX),* caspasa 3, 8 y 9 *(CASP3, CASP8* y *CASP9*).
- **Genes relacionados a la necroptosis:** proteína similar al dominio de quinasa de linaje mixto (*MLKL),* serina/treonina proteína quinasa 1 y 3 que interactúa con el receptor *(RIPK1* y *RIPK3*).
- **Genes relacionados a la autofagia:** Gen relacionado con la autofagia 7 *(ATG7),* Coiled-coil, proteína que interactúa con BCL2 similar a la moesina *(BECLIN1),* secuestrosoma 1 *(SQSTM1),* diana de rapamicina en células de mamífero *(MTOR)*, proteína relacionada con la autofagia LC3 B *(LC3B).*
- **Genes relacionados con el estrés oxidativo:** ciclooxigenasa 2 *(COX2),* citocromo B-245 cadena beta *(CYBB*), glutation peroxidasa 6 *(GPX6),* superóxido dismutasa 1 *(SOD1),* tiorredoxina 2 *(TXN2)* y tiorredoxina reductasa 1 *(TXNRD1*).
- **Genes relacionados con la inflamación*:*** interleucina 1, 6, y 10 *(IL1, IL6 y IL10)*, factor de necrosis tumoral alfa *(TNFA)* y factor de crecimiento transformante beta 1 *(TGFB1).*

4.7 Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el paquete estadístico SPSS versión 22.0 (SPSS, EE.UU.). Primeramente, se realizó un análisis de la distribución de las variables continuas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para el

análisis de las variables que no tuvieron distribución normal se empleó la prueba de U de Mann-Whitney para la comparación entre dos grupos; mientras que, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación entre más de dos grupos. En el caso de las variables con distribución normal se usó la prueba T para la comparación entre dos grupos; mientras que, se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para la comparación entre más de dos grupos. Los resultados se consideraron significativos cuando el valor P fue menor a 0,05.

V. RESULTADOS

5.1 Evaluación de marcadores de superficie de células madre mesenquimales de médula ósea

Las bmMSC obtenidas fueron cultivadas hasta una confluencia del 80%, luego se realizó el co-cultivo con los explantes de neuroretina, mostrando una viabilidad superior al 95%. La caracterización inmunohistoquímica de la superficie de las bmMSC que se realizó a las células monocultivadas (MSC) y co-cultivadas (MSC+NR) siendo negativa para los marcadores específicos de células hematopoyéticas CD14 y CD19 y fue positiva para los antígenos de células madre mesenquimales CD44, CD90 y CD146 **(Figura 7)**.

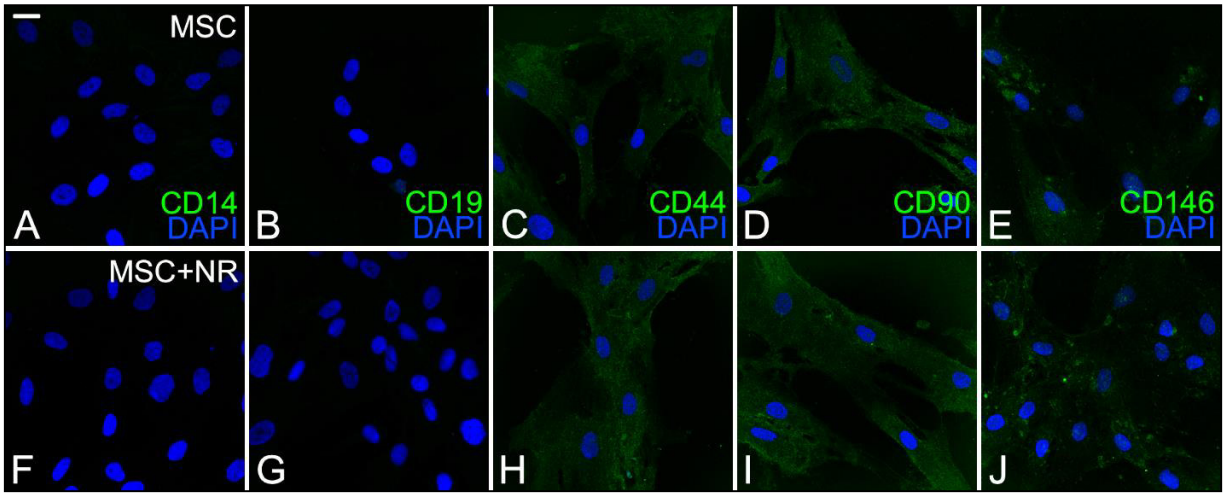


Figura 7. Evaluación de marcadores de superficie de células madre mesenquimales de médula ósea. (A-E) Obsérvese las MSC de monocultivo luego de 72 horas de cultivo, siendo negativas para los marcadores de células hematopoyéticas CD14 (A) y CD19 (B); y mostrando fluorescencia positiva de color verde para los marcadores de MSC CD44 (C), CD90 (D) y CD146 (E). (F-J) Obsérvese las MSC en co-cultivo con los explantes de neuroretina luego de 72 horas de cultivo, siendo negativas para los marcadores de células hematopoyéticas CD14 (F) y CD19 (G); y mostrando fluorescencia positiva de color verde para los marcadores de MSC CD44 (H), CD90 (I) y CD146 (J). DAPI (azul): núcleos. Barra de escala: 25 µm.

5.2 Caracterización de la gliosis y la degeneración de la neuroretina

En la retina, las células gliales como las células de Müeller, astrocitos y microglias, están involucradas en la supervivencia de las neuronas y en el mantenimiento de la homeostasis de la retina. Cuando existen lesiones en este tejido, se desencadena la activación de las células gliales, las cuales son caracterizadas por la secreción de factores proinflamatorios y la fagocitosis (Cuenca et al., 2014).

Para evaluar la degeneración retiniana a través del nivel de gliosis, se estudió la inmunoexpresión de la GFAP, la cual es una proteína fibrosa que forma filamentos intermedios en el citoesqueleto de las células gliales (Cuenca et al., 2014). El resultado de la inmunoexpresión de GFAP en los explantes de neuroretina control **(Figura 8-A)** fue la menor de todos los grupos, localizándose en la capa de células ganglionares y en la capa de fibras nerviosas (NFL). En el caso del monocultivo de neuroretina **(Figura 8-B)**, la inmunoexpresión de GFAP fue la mayor de todos los grupos, debido al proceso de neurodegeneración, evidenciándose una pérdida de estructura de las capas de la neuroretina, además de la invasión de prolongaciones citoplasmáticas de las células gliales tanto en la capa nuclear interna y externa. En contraste, en el co-cultivo NR+MSC **(Figura 8-C)**, la estructura de las capas del tejido se mantuvo y la presencia de la proteína GFAP fue elevada en la capa de células ganglionares, pero baja en la capa plexiforme interna y en algunas partes de la capa nuclear interna. Del mismo modo, el tratamiento con el secretoma NR+S **(Figura 8-D)** mantuvo la estructura de la capa externa de la retina, pero las prolongaciones citoplasmáticas de las células gliales invadieron la capa nuclear interna, haciendo que esta pierda en menor medida su estructura; además se observó una mayor inmunoexpresión de GFAP en la capa de fibras nerviosas y células ganglionares **(Figura 8-D)**.

Los resultados evidencian una disminución de la producción de la GFAP y mantenimiento de la morfología del tejido en los grupos dónde los explantes de neuroretina se co-cultivan con bmMSC o sólo con el secretoma; relacionándose con la disminución del avance del proceso de neurodegeneración.

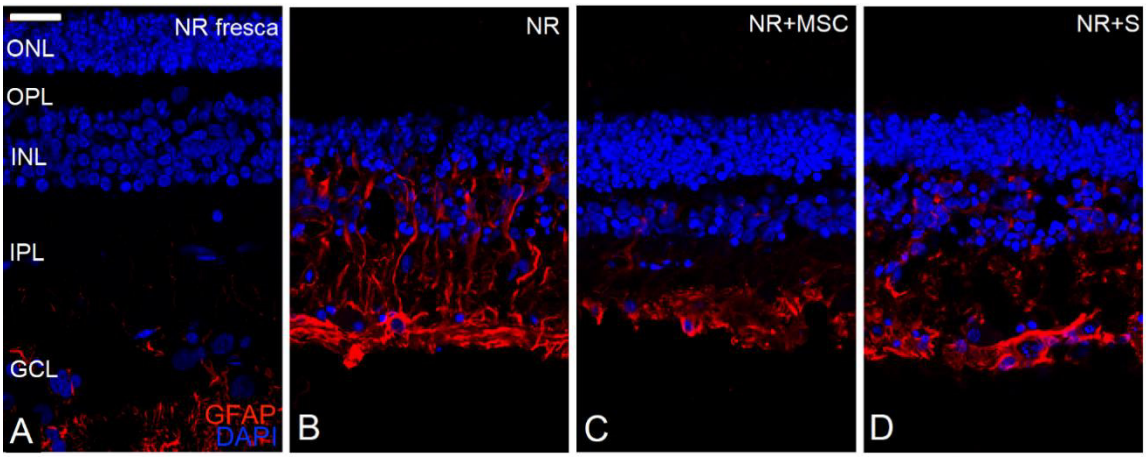


Figura 8. Evaluación inmunohistoquímica de la gliosis en la neuroretina. (A) Neuroretina control (NR fresca); (B) monocultivo de explante de neuroretina con expresión marcada de GFAP en todas las capas de la retina (NR); (C) co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); (D) cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). (ONL) Capa nuclear externa; (OPL) capa plexiforme externa; (INL) capa nuclear interna; (IPL) capa plexiforme interna; (GCL) capa de células ganglionares. Barra de escala: 25 µm.

5.3 Evaluación inmunohistoquímica de la morfología de la neuroretina

Para evaluar el proceso de degeneración en los explantes de neuroretina de cada grupo experimental, se usaron distintos anticuerpos primarios:

En primer lugar, se usó la lectina (PNA) para identificar y evaluar el estado de los conos **(Figura 9 A-D)**, debido a que la PNA se une a la matriz extracelular del segmento externo (OS) de los conos (Garlipp et al., 2012). El resultado de la inmunoexpresión de la lectina PNA en la neuroretina control **(Figura 9-A)** fue la mayor de todos los grupos, teniendo una distribución uniforme en el segmento externo de los conos. En el caso del monocultivo de neuroretina **(Figura 9-B)**, la inmunoexpresión de la lectina PNA fue casi nula, debido a la marcada degeneración de los conos; además, se evidenció pérdida de estructura de las capas nuclear interna y externa de la neuroretina. En contraste, en el co-cultivo con NR+MSC **(Figura 9-C)** la inmunoexpresión de lectina PNA se evidenció en el segmento externo, siendo muy parecida a la neuroretina fresca; pero se observó una disminución de núcleos en la capa nuclear interna. De la misma manera, el tratamiento con el secretoma NR+S **(Figura 9-D)** también se observó la inmunoexpresión de

lectina PNA en el segmento externo de los conos, pero en menor cantidad; además se evidenció una mayor disminución de núcleos en la capa nuclear interna.

Los resultados demuestran que las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma, mantienen la matriz extracelular de los conos a pesar del proceso de neurodegeneración; sin embargo, se evidencian daños en los conos y en la estructura del tejido.

Para identificar y estudiar los bastones se analizó la inmunoexpresión de la proteína rodopsina (Rho) **(Figura 9 E-H)**, la cual es transportada por los cilios de conexión hacia los discos de membrana recién formados en la base de los segmentos externos de los bastones (Athanasiou et al., 2013). Los resultados obtenidos muestran que en la neuroretina control **(Figura 9-E)** la inmunoexpresión de Rho fue la mayor de todos los grupos, localizándose en el segmento externo de los bastones. Por otra parte, en el monocultivo de neuroretina **(Figura 9-F)** la inmunoexpresión de Rho fue casi nula y sólo se detectó en segmentos degenerados cercanos a la capa nuclear externa, además se evidenció pérdida de la estructura de las capas nuclear interna y externa. Al contrario, en el co-cultivo con NR+MSC **(Figura 9-G)** la inmunoexpresión de Rho se observó en el segmento externo de los bastones, con una intensidad similar a la neuroretina fresca. Del mismo modo, el tratamiento con el secretoma NR+S **(Figura 9-H)** también mostró la inmunoexpresión de Rho en el segmento externo de los bastones con una intensidad similar a la neuroretina fresca y al co-cultivo NR+MSC; además se evidenció el mantenimiento de la estructura de las capas de la neurotenia.

Los resultados demuestran que las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma, preservan las estructuras de los bastones a pesar del proceso de neurodegeneración; siendo similar a lo ocurrido con los conos.

Para el análisis de la morfología de las células bipolares de bastón, se determinó la inmunoexpresión de PKCa **(Figura 9 I-L)**, que es abundante en los botones sinápticos y cumple un rol modulador en la función de las

células bipolares de bastones, acelerando la transducción y terminación de la señal impulsada por el glutamato (Ruether et al., 2010). La inmunoexpresión de PKCa en la neuroretina control **(Figura 9-I)** se distribuyó uniformemente a lo largo de las células bipolares a través de la capa nuclear interna y las capas plexiformes interna y externa (IPL y OPL), observándose una mayor intensidad en los botones terminales de las células bipolares en la capa plexiforme interna y externa. En el caso del monocultivo de neuroretina **(Figura 9-J)**, la distribución de la inmunoexpresión de la PKCa fue menor que el control, pero se mantuvo en las terminales de las células bipolares en la capa plexiforme externa; además se evidenció pérdida de la estructura de las capas nuclear interna y externa. Los resultados del co-cultivo con NR+MSC **(Figura 9-K)** evidencian la una distribución de PKCa similar al control, acentuando la presencia de PKCa en las terminales de las células bipolares en la capa plexiforme externa; además, no se presentó pérdida de la estructura de las capas de la neuroretina. Del mismo modo, el tratamiento con el secretoma NR+S **(Figura 9-L)** también mostró la distribución de PKCa similar al obtenido con el co-cultivo de NR+MSC, teniendo una mayor presencia de PKCa en las terminales de las células bipolares en la capa plexiforme externa; sin embargo, si se observó una disminución de las células de la capa nuclear interna.

Los resultados demuestran que las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma, mantienen una inmunoexpresión similiar de PKCa dentro de las capas de la neuroretina a pesar del proceso de neurodegeneración.

El análisis de las células ganglionares se realizó con el anticuerpo para la proteína nuclear neuronal-específica (NeuN) **(Figura 9 M-P)**, la cual es una proteína de unión a DNA que identifica poblaciones neuronales maduras de las células ganglionares (Buckingham et al., 2008). El resultado de la inmunoexpresión de la proteína NeuN en la neuroretina control **(Figura 9-M)** fue la mayor de todos los grupos, mostrando fluorescencia concentrada en algunas zonas de la capa de las células ganglionares. En contraste, NeuN casi no se detectó en el monocultivo de

neuroretina **(Figura 9-N**), además se evidenció una pérdida total de la estructura de las capas interna y externa de la neuroretina. Los resultados del co-cultivo con NR+MSC **(Figura 9-O)** muestran una menor expresión de NeuN con respecto al control; además de la perdida de estructura en la capa nuclear interna. Del mismo modo, en el tratamiento con el secretoma NR+S **(Figura 9-P)** también tuvo una inmunoexpresión de NeuN similar a lo obtenido con el co-cultivo de NR+MSC; pero, se detectó pérdida de la estructura de la capa nuclear externa.

Los resultados demuestran que las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma, tienen una inmunoexpresión de NeuN menor que la del control, pero que es similar entre ambas, frente al proceso de neurodegeneración.

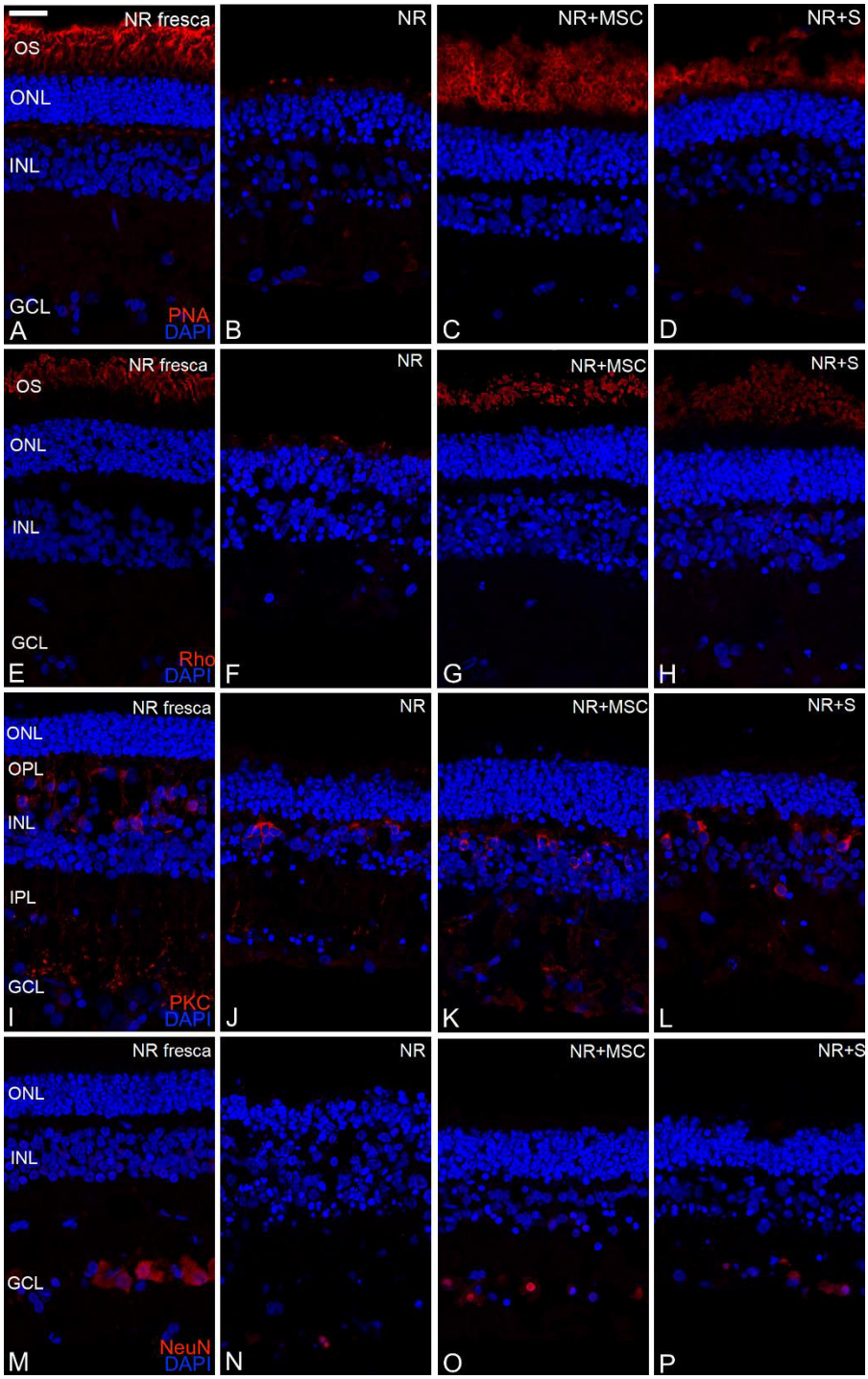


Figura 9. Evaluación inmunohistoquímica de la morfología de la neuroretina. (A-D) Inmunoexpresión de lectina (PNA); (E-H) rodopsina (Rho); (I-L) proteína quinasa C isoforma α (PKCa); (M-P) Proteína nuclear neuronal (NeuN). Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). (OS) Segmento externo; (ONL) capa nuclear externa; (OPL) capa plexiforme externa; (INL) capa nuclear interna; (IPL) capa plexiforme interna; (GCL) capa de células ganglionares. Barra de escala: 25 µm.

5.4 Evaluación de la apoptosis

Los resultados de la inmunoexpresión de la proteína AIF (factor de inducción de apoptosis) en los explantes de neuroretina se muestran en la **Figura 10 A-D**. La proteína AIF principalmente se encuentra en los fotorreceptores y está involucrada en la señalización intrínseca de la apoptosis; además se reporta que la translocación de AIF desde la mitocondria hacia el núcleo está implicada en la muerte neuronal y en la muerte de los fotorreceptores luego de un desprendimiento de retina (Sanges et al., 2006).

La evaluación inmunohistoquímica de la proteína AIF en la neuroretina control **(Figura 10-A)** mostró una baja fluorescencia en algunas zonas de la capa de células ganglionares. En contraste, en el monocultivo de neuroretina **(Figura 10-B)**, se evidenció una mayor inmunoexpresión de AIF en el segmento externo de los fotorreceptores, además tuvo una fluorescencia similar al control en la capa de las células ganglionares; adicionalmente, se observó disminución de células en la capa nuclear interna y externa. Los resultados del co-cultivo con NR+MSC **(Figura 10-C)** muestran una menor expresión de AIF en el segmento externo de los fotorreceptores con respecto al monocultivo de neuroretina; además, mejor preservación de la estructura de las capas del tejido. Del mismo modo, en el tratamiento con el secretoma NR+S **(Figura 10-D)** también tuvo una inmunoexpresión de AIF similar a lo obtenido con el co-cultivo de NR+MSC; pero, se detectó pérdida de la estructura de la capa nuclear interna.

Los resultados demuestran que el proceso de apoptosis en las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma, se ubican en el segmento externo de los fotorreceptores, siendo similar la respuesta entre ambos tratamientos, frente al proceso de neurodegeneración.

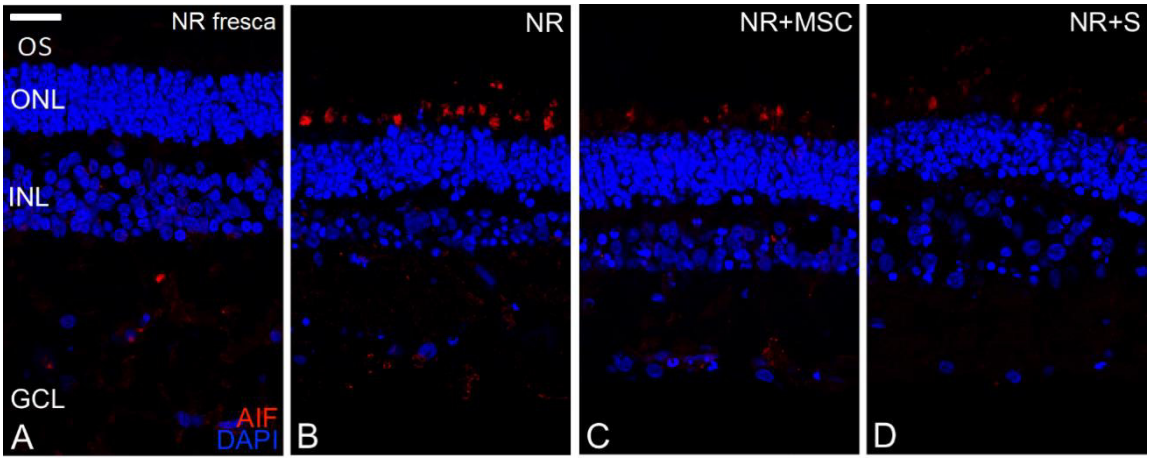


Figura 10. Evaluación inmunohistoquímica de la apoptosis en la denegeración de la neuroretina. (A-D) Obsérvese el factor de inducción de la apoptosis (AIF) con mayor fluorescencia en segmento externo de los fotorreceptores. Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). (OS) Segmento externo; (ONL) capa nuclear externa; (INL) capa nuclear interna; (GCL) capa de células ganglionares. Barra de escala: 25 µm.

Los resultados de la evaluación de la expresión de los genes involucrados en la activación de la apoptosis *BAX, CASP3, CASP8* y *CASP9*; así como del gen anti-apoptótico *BCL2* en los explantes de neuroretina, se muestran en la **Figura 11**.

En el caso de los genes *BAX* **(Figura 11-A)**, *CASP3* **(Figura 11-C)** y *CASP8* **(Figura 11-D)**, en los co-cultivos de NR+MSC y secretoma NR+S, tuvieron un incremento significativo en comparación al grupo control; sin embargo, la expresión fue mucho menor que el monocultivo de neuroretina, el cual obtuvo niveles altos de mRNA para estos genes pro-apoptóticos. Para el gen *CASP9* **(Figura 11-E)**, también se reportó un incremento significativo en comparación al grupo control por parte de los co-cultivos de NR+MSC y secretoma NR+S; pero estos valores fueron inferiores a lo expresado en el monocultivo de neuroretina. Por el contrario, la expresión relativa de *BCL2* **(Figura 11-B),** en los co-cultivos de NR+MSC y secretoma NR+S, tuvo una disminución significativa en comparación al grupo control; pero, la expresión fue significativamente mucho mayor que el monocultivo de neuroretina.

Estos resultados demuestran una disminución en la expresión de los genes involucrados en la activación de la apoptosis en las neuroretinas en

co-cultivo con bmMSC y con el secretoma; así como un incremento en la expresión del gen anti-apoptótico *BCL2.*

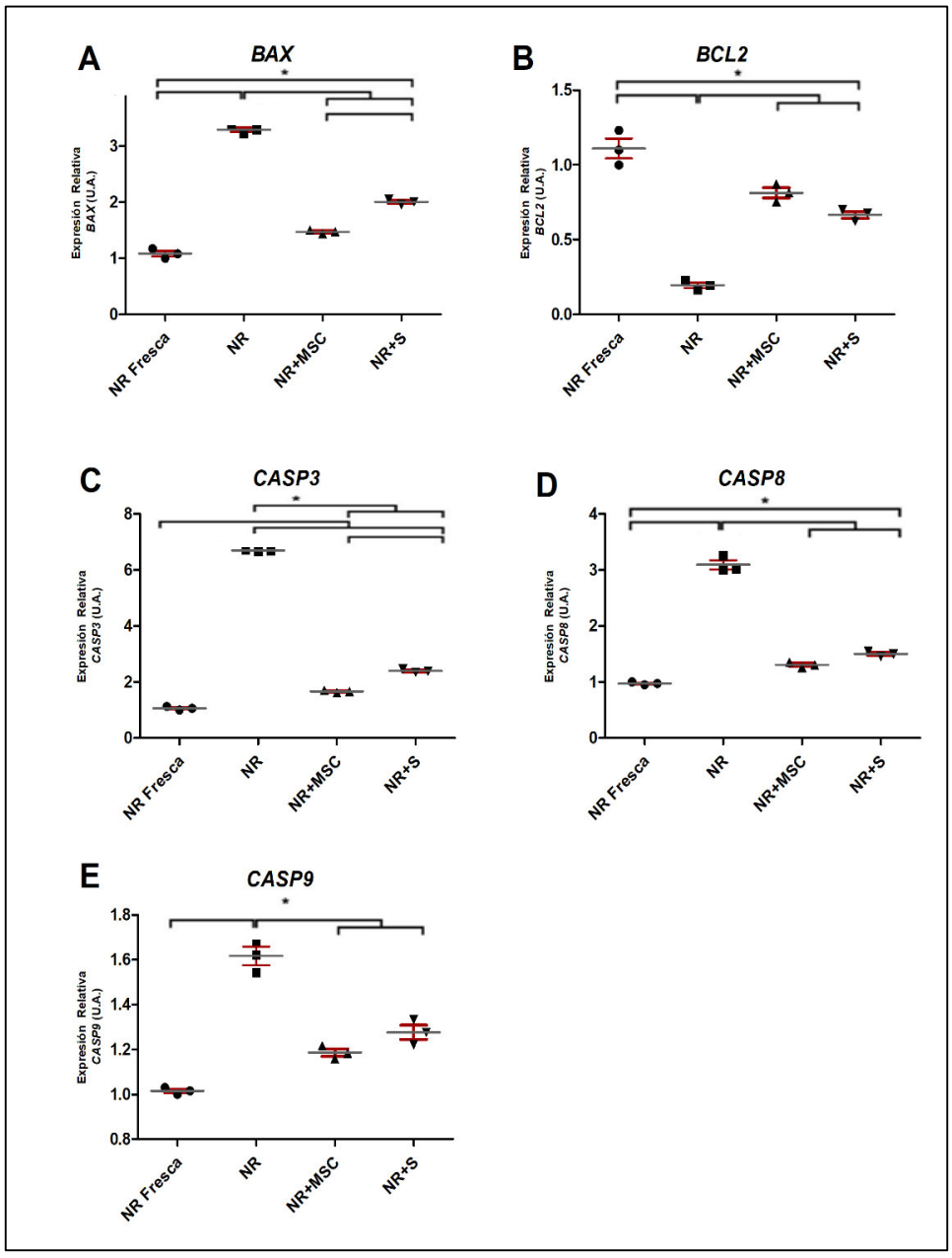


Figura 11. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados a la apoptosis. Obsérvese la variación en la expresión de los genes (A) *BAX;* (B) *BCL2*; (C) *CASP3*; (D) *CASP8* y (E) *CASP9*. Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). Media (línea horizontal gris); error estándar (barra granate); *p<0.05, U.A.: unidades arbitrarias.

5.5 Evaluación de la necroptosis

Para el análisis de la necroptosis, se evaluó la presencia y distribución de la proteína MLKL, que está involucrada en la vía MLKL-RIPK y se activa en los fotorreceptores cuando las retinas han sufrido daño, indicando que la

necroptosis contribuye a la degeneración de los conos y bastones (Lu et al., 2020).

La inmunoexpresión de MLKL en la neuroretina control **(Figura 12-A)** tuvo muy baja fluorescencia en algunas zonas de la capa de células ganglionares. Por el contrario, en el monocultivo de neuroretina **(Figura 12-B)**, se evidenció una mayor inmunoexpresión de MLKL en el segmento externo de los fotorreceptores, además de un aumento en la fluorescencia en la capa plexiforme interna y en las células ganglionares. La inmunoexpresión de MLKL en el co-cultivo con NR+MSC **(Figura 12-C)** y con el secretoma NR+S **(Figura 12-D)** fueron similares, ya que tuvieron una menor expresión de MLKL en el segmento externo de los fotorreceptores con respecto al monocultivo de neuroretina; además de una marcada expresión en la capa de las células ganglionares; sin embargo, se observa una pérdida de células en la capa nuclear interna para ambos grupos.

Los resultados demuestran que el proceso de necroptosis en las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma, se desarrolla más en la capa de células ganglionares y en menor medida en el segmento externo de los fotorreceptores; siendo similar la respuesta entre ambos tratamientos frente al proceso de neurodegeneración.

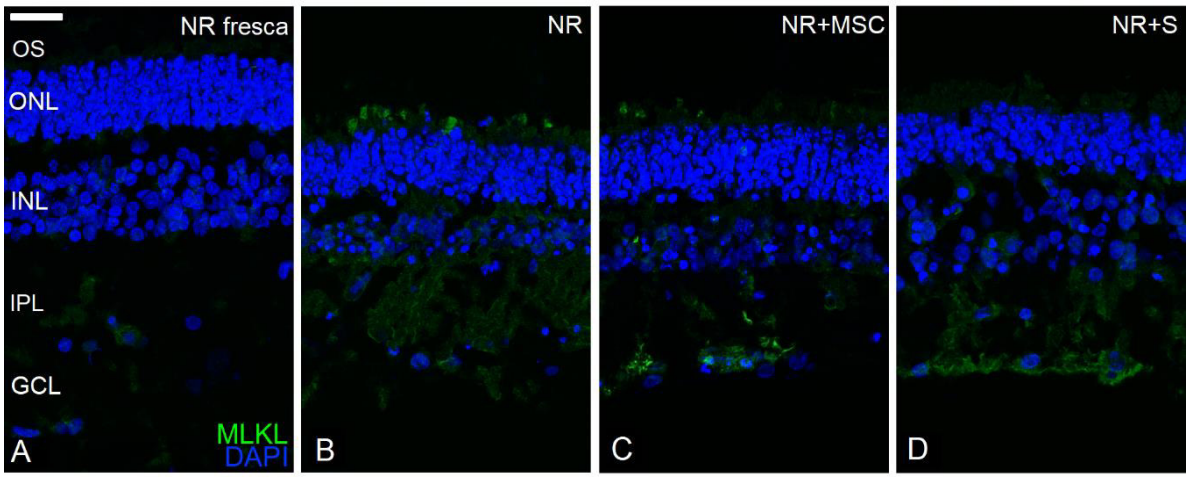


Figura 12. Evaluación inmunohistoquímica de la necroptosis en la denegeración de la retina. (A-D) Marcador de necroptosis MLKL. Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). (OS) Segmento externo; (ONL) capa nuclear externa; (INL) capa nuclear interna; (IPL) capa plexiforme interna; (GCL) capa de células ganglionares. Barra de escala: 25 µm.

Los resultados de la evaluación de la expresión de los genes involucrados en la activación de la necroptosis *MLKL, RIPK1* y *RIPK3* en los explantes de neuroretina, se muestran en la **Figura 13**.

La expresión de los genes *MLKL* **(Figura 13-A)***, RIPK1* **(Figura 13-B)** y *RIPK3* **(Figura 13-C)** en los co-cultivos de NR+MSC y secretoma NR+S, tuvieron un incremento significativo en comparación al grupo control; sin embargo, la expresión fue mucho menor que el monocultivo de neuroretina, el cual obtuvo niveles altos de mRNA para estos genes activadores de la necroptosis. En el caso de los grupos de NR+MSC y NR+S, sólo en el gen *RIPK3* **(Figura 13-C)** no tuvieron diferencias significativas en la expresión relativa de mRNA.

Los resultados demuestran una marcada disminución en la expresión de los genes involucrados en la activación de la necroptosis en las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma frente al proceso de neurodegeneración.

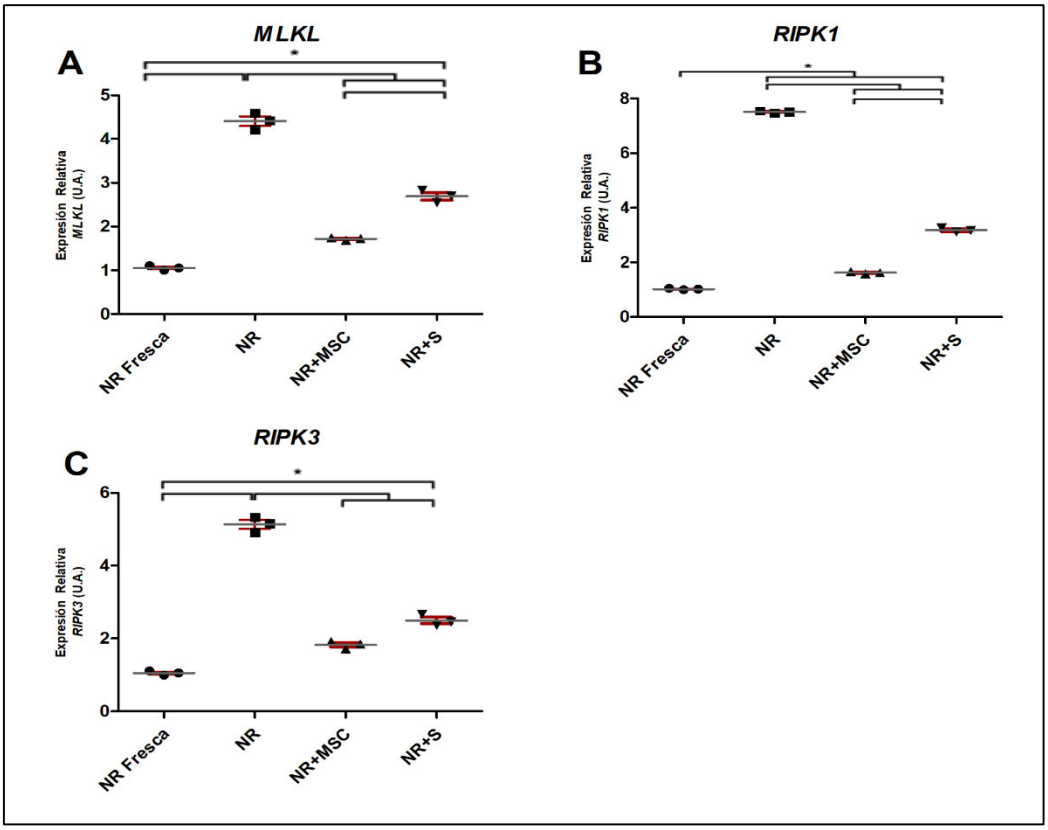


Figura 13. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados a la necroptosis. Obsérvese la variación en la expresión de los genes (A) *MLKL;* (B) *RIPK1* y (C) *RIPK3*. Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). Media (línea horizontal gris); error estándar (barra granate); *p<0.05, U.A.: unidades arbitrarias.

5.6 Evaluación de la autofagia

La autofagia fue evaluada mediante la inmunoexpresión de la proteína p62, la cual reconoce los desechos celulares tóxicos, que luego son eliminados mediante la autofagia (Rusten & Stenmark, 2010).

El análisis de la inmunoexpresión de la proteína p62, mostró una fluorescencia muy baja en todas las condiciones experimentales **(Figura 14 A-D)**; además, no tuvo una localización determinada dentro de las capas de la neuroretina. Por otro lado, en el monocultivo de neuroretina **(Figura 14-B)** si se evidencia una pérdida de estructura de las capas nuclear interna y externa. La inmunoexpresión de p62 fue casi nula en el co-cultivo con NR+MSC **(Figura 14-C)** y con el secretoma NR+S **(Figura 14-D)**; sin embargo, se observa una pérdida de células en la capa nuclear interna en ambos casos.

Los resultados demuestran la proteína p62 de la autofagia, en este caso no tiene diferencias de expresión entre todos los grupos evaluados.

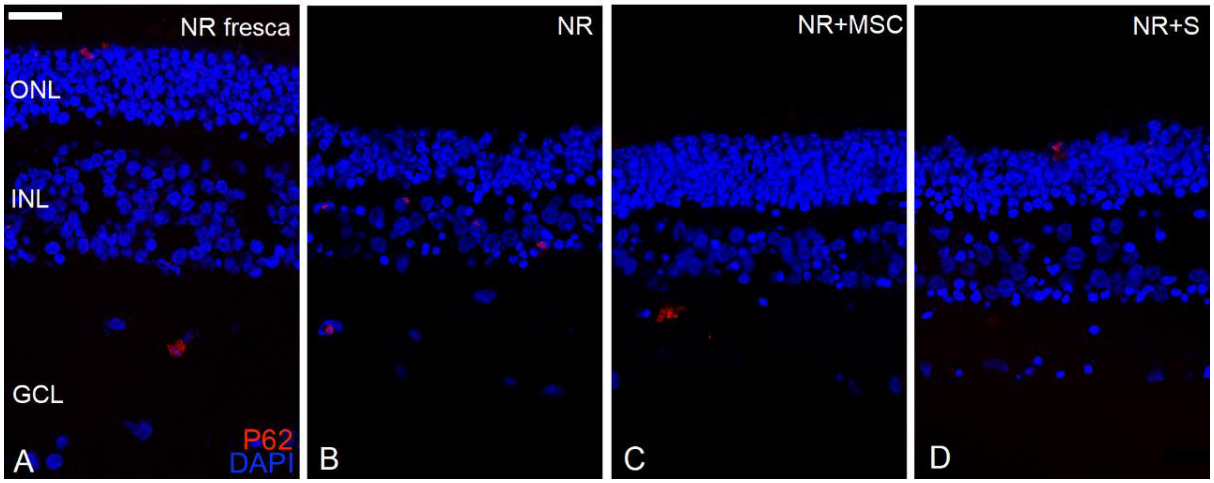


Figura 14. Evaluación inmunohistoquímica de la autofagia en la denegeración de la retina. (A-D) Obsérvese el marcador de la autofagia proteína p62. Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). (OS) Segmento externo; (ONL) capa nuclear externa; (INL) capa nuclear interna; (IPL) capa plexiforme interna; (GCL) capa de células ganglionares. Barra de escala: 25 µm.

Para el estudio de la autofagia se analizaron los genes *ATG7*, *BCLIN1, LC3B*, *MTOR* y *SQSTM1* en los explantes de neuroretina de los distintos grupos experimentales como se muestra en la **Figura 15**.

Los resultados mostraron un incremento significativo en la expresión de los genes *ATG7* **(Figura 15-A)** y *BCLIN1* **(Figura 15-B)** en los co-cultivos de NR+MSC y secretoma NR+S en comparación al grupo control; sin embargo, la expresión fue menor que el monocultivo de neuroretina, el cual obtuvo niveles altos de mRNA para estos genes iniciadores de la autofagia. Por el contrario, la expresión del gen *LC3B* **(Figura 15-C)** en los co-cultivos de NR+MSC y secretoma NR+S disminuyó significativamente en comparación a la neuroretina control; pero, fue significativamente superior a la del monocultivo de neuroretina. En el caso del gen *MTOR* **(Figura 15-D)** todos los grupos tuvieron una marcada disminución en la expresión respecto a la neuroretina control**.** Respecto a la expresión del gen *SQSTM1* **(Figura 15-D)**, esta disminuyó significativamente en los co-cultivos de NR+MSC y secretoma NR+S en comparación al grupo control; pero, estos valores fueron significativamente superiores al monocultivo de neuroretina.

Los resultados demuestran una baja disminución en la expresión de los genes iniciadores de la autofagia en las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma frente al proceso de neurodegeneración.

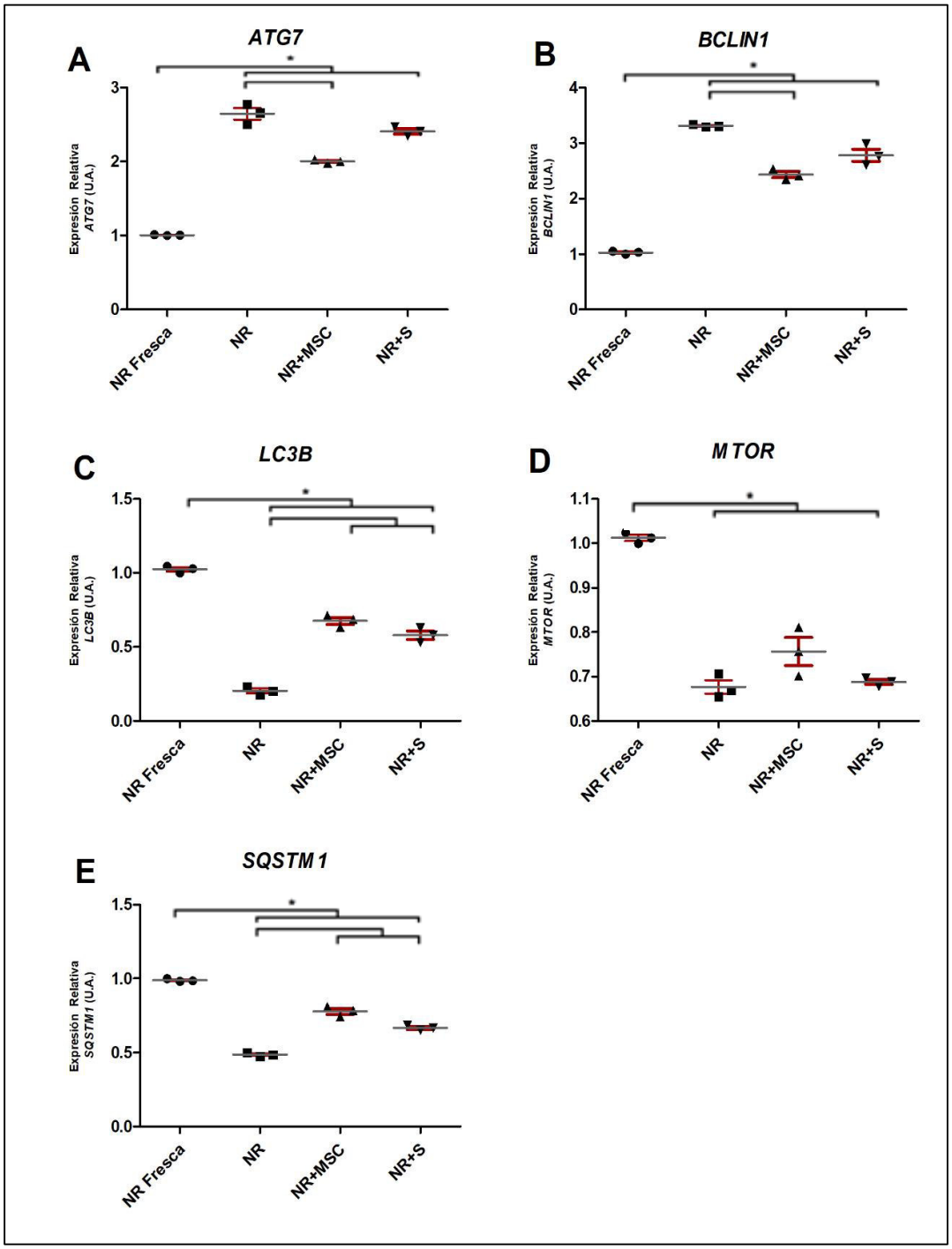


Figura 15. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados a la autofagia. Obsérvese la variación en la expresión de los genes (A) *ATG7;* (B) *BCLIN1;* (C) *LC3B*; (D) *MTOR* y (E) *SQSTM1*. Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). Media (línea horizontal gris); error estándar (barra granate); *p<0.05, U.A.: unidades arbitrarias.

5.7 Evaluación del estrés oxidativo

Con el objetivo de evaluar el estatus del estrés oxidativo en los explantes de neuroretina se analizó la expresión de los genes *TXN2*, *GPX6*, *SOD1*, *COX2*, *CYBA*, *CYBB* y *TXNRD1* **(Figura 16)**.

Los resultados obtenidos de la expresión relativa de mRNA en los genes *COX2* **(Figura 16-A)**, *TXNRD1* **(Figura 16-F)** y *CYBA* **(Figura 16-G)** reportaron un incremento significativo igual en todas las condiciones experimentales en comparación al grupo control. La expresión del gen *CYBB* **(Figura 16-B)** se incrementó significativamente y fue igual en el monocultivo de neuroretina y el tratamiento con secretoma NR+S frente al grupo control y al co-cultivo de NR+MSC. Los resultados de los genes *GPX6* **(Figura 16-C)** y *SOD1* **(Figura 16-D)** mostraron un incremento significativo en los co-cultivos de NR+MSC y secretoma NR+S en comparación al grupo control; por el contrario, en el monocultivo de neuroretina la expresión no tuvo diferencia significativa frente al grupo control. En el caso del gen *TXN2* **(Figura 16-E)**, todas las condiciones experimentales tuvieron similares valores de expresión a excepción del co-cultivo de NR+MSC, el cual presentó un incremento significativo respecto a las otras condiciones.

Los resultados demuestran un incremento en la expresión de algunos genes involucrados en la respuesta frente al estrés oxidativo en las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma frente al proceso de neurodegeneración**.**

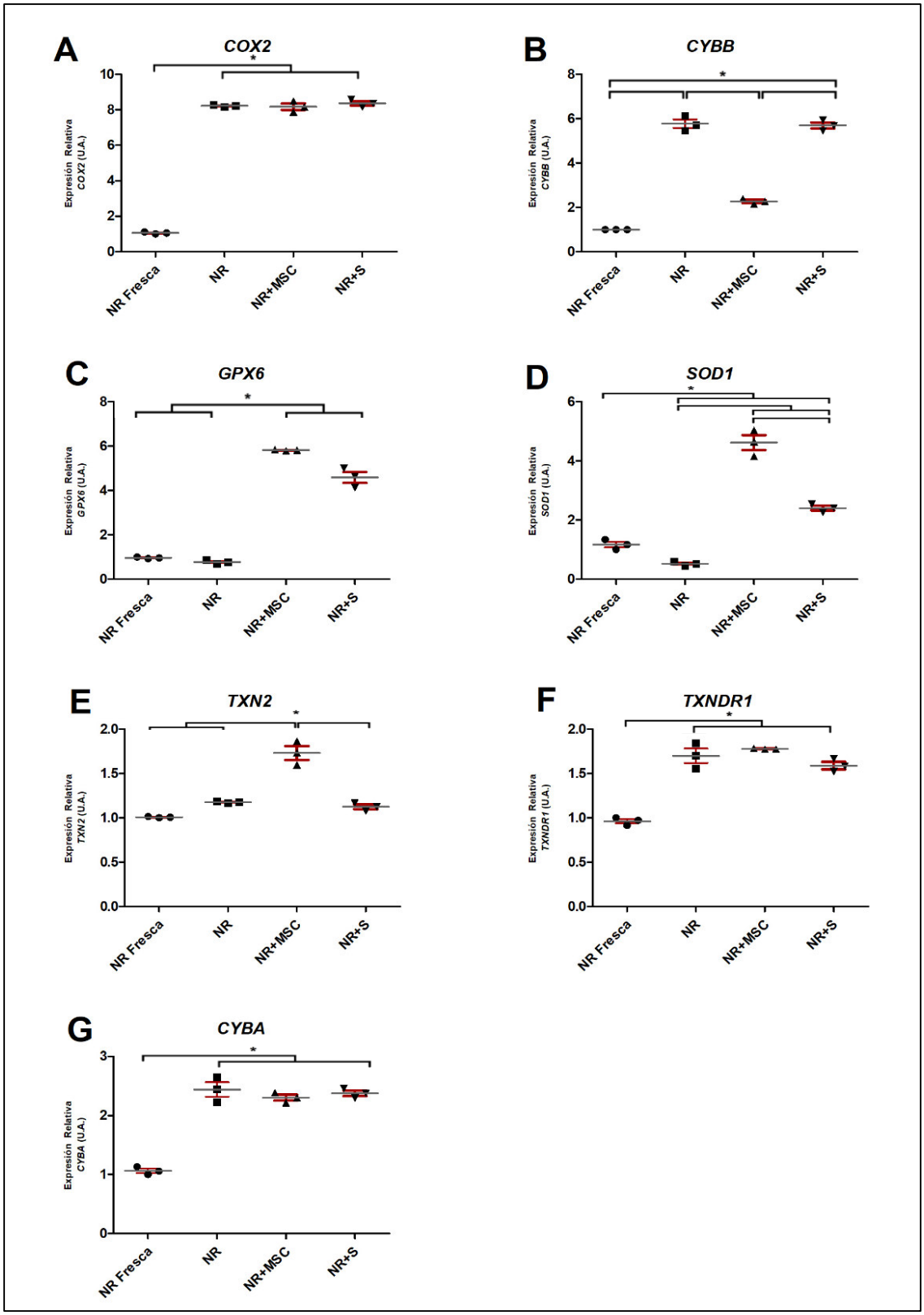


Figura 16. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados con el estrés oxidativo. Obsérvese la variación en la expresión de los genes (A) *COX2;* (B) *CYBB;* (C) *GPX6*; (D) *SOD1;* (E) *TXN2;* (F) *TNXRD1* y (G) *CYBA*. Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). Media (línea horizontal gris); error estándar (barra granate); *p<0.05, U.A.: unidades arbitrarias.

5.8 Evaluación de la inflamación

En el estudio de los procesos inflamatorios, se evaluó la expresión relativa de los genes *IL1* **(Figura 17-A)**, *IL6* **(Figura 17-B)**, *IL10* **(Figura 17-C)**, *TGFB1* **(Figura 17-D)** y *TNFA* **(Figura 17-E)**.

La expresión de los genes implicados en la inflamación estudiados, mostraron un incremento significativo en todas las condiciones experimentales en comparación al grupo control. Además, las comparaciones entre los grupos experimentales de monocultivo de neuroretina, co-cultivo de NR+MSC y el tratamiento con secretoma NR+S, no mostraron diferencias significativas en la expresión relativa de mRNA de los genes relacionados a la inflamación.

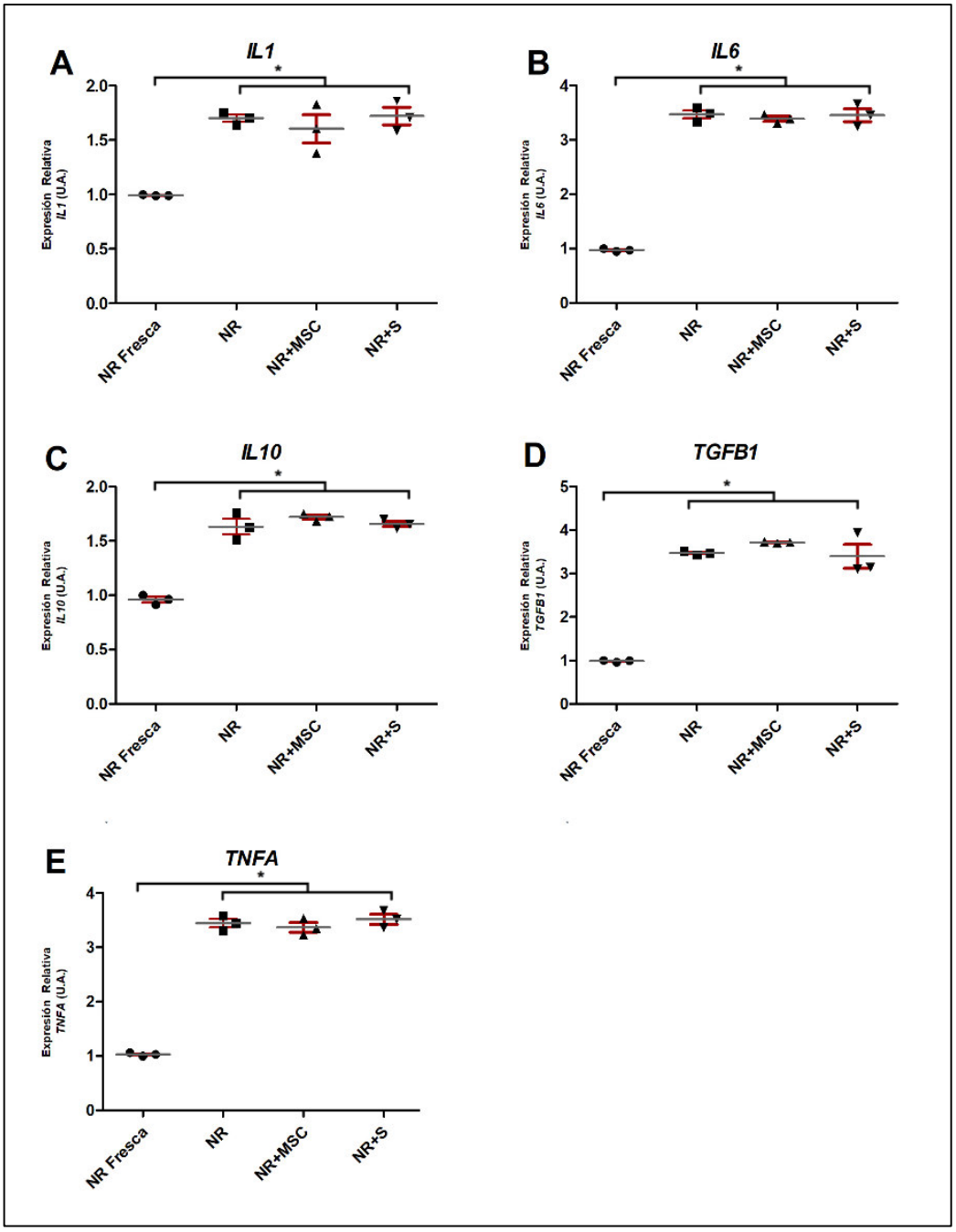


Figura 17. Expresión relativa de mRNA en genes relacionados a la inflamación. Obsérvese la variación en la expresión de los genes (A) *IL1;* (B) *IL6;* (C) *IL10*; (D) *TGFB1* y (E) *TNFA.* Las condiciones experimentales analizadas fueron: Neuroretina control (NR fresca); monocultivo de explante de neuroretina (NR); co-cultivo de explante de neuroretina con bmMSC (NR+MSC); cultivo de explante de neuroretina con el secretoma de bmMSC (NR+S). Media (línea horizontal gris); error estándar (barra granate); *p<0.05, U.A.: unidades arbitrarias.

VI. DISCUSIÓN

Debido a que la retina es un tejido compuesto por múltiples células neuronales las cuales deben preservar su estructura, conectividad y vasculatura para poder mantener la visión (Singh et al., 2018), es necesario el uso de modelos de estudio que puedan reflejar los cambios no sólo a nivel morfológico sino también en sus interacciones celulares y moleculares. Por lo tanto, en esta investigación para poder evaluar *in vitro* el potencial efecto neuroprotector del secretoma de las bmMSC, se empleó como modelo de estudio el cultivo de explante de neuroretina porcina. Este modelo presenta varias ventajas en comparación al uso de animales de experimentación o líneas celulares, resaltando su facilidad de manejo, bajo costo y la simulación muy cercana al tejido *in vivo* debido a que mantiene muchas de las interacciones celulares y moleculares entre las células neuronales y matrices intercelulares; convirtiéndola en una herramienta adecuada para el estudio de la neurodegeneración y la neuroprotección de la retina (Fernandez-Bueno et al., 2012; Fernandez-Bueno & Usategui-Martín, 2021). Sin embargo, es importante resaltar que los cultivos de explantes de neuroretina tienen algunas limitaciones como la axotomía de las células ganglionares, la ausencia de irrigación sanguínea y del epitelio pigmentario de la retina. A pesar de estas limitaciones, los explantes de neuroretina porcina son un recurso excelente debido a su apariencia similar a la retina humana cómo se demostró en cortes histológicos en el estudio de Winkler et al., 2002, adicionalmente, su versatilidad de manejo para diversos análisis inmunohistoquímicos y de expresión génica, lo convierten en un modelo adecuado para este tipo de estudios.

Actualmente, la terapia celular basada en el uso de MSC es una alternativa muy atractiva debido su capacidad de producir componentes bioactivos como factores neuroprotectores, antiinflamatorios, anti-apoptóticos e inmunomoduladores, los cuales cumplen un rol importante en la regulación de los procesos biológicos de degeneración (Tang et al., 2017; Vizoso et al., 2017). Del mismo modo, se ha corroborado la biocompatibilidad de la inyección intravítrea de las bmMSC humanas en conejos inmunocompetentes realizado por Labrador Velandia et al., 2018; demostrándose que la aplicación de las

células es segura y bien tolerada a dosis de 15 x 10^6 células/mL; además, las células permanecen en la cavidad vítrea entre 2 a 4 semanas. Es por ello que, al demostrarse que las MSC aplicadas sólo permanecen por cierto tiempo en la cavidad ocular, el enfoque principal de la terapia celular es la neuroprotección a través de las propiedades paracrinas; por lo tanto, las nuevas estrategias terapéuticas se enfocan en la evaluación de la aplicación del secretoma de las MSC por su capacidad neuroprotectora (Vizoso et al., 2017; Usategui-Martin & Fernandez-Bueno, 2021).

Por lo señalado anteriormente y según las fuentes y bibliografía consultada, este es el primer estudio en analizar la capacidad neuroprotectora del secretoma de bmMSC humano obtenido en condiciones de degeneración de la retina; significando un paso crucial en la evaluación y desarrollo de potenciales estrategias terapéuticas basadas en la producción de “cócteles de secretoma” de MSC con propiedades neuroprotectoras; además de presentar ventajas significativas en el desarrollo de tratamientos libres de células con capacidades neuroprotectoras y de tener un manejo mucho más fácil en la práctica clínica que el empleo de tratamientos con células vivas (Vizoso et al., 2017).

Los resultados obtenidos evidencian el efecto neuroprotector de los co-cultivos de bmMSC y del secretoma de las bmMSC frente al proceso degenerativo de la neuroretina; así como la preservación de la morfología y estructura del tejido. Si bien es cierto, los resultados de los co-cultivos de NR con bmMSC en algunos casos son mayores que los obtenidos por la aplicación del secretoma, estos se pueden relacionar a la constante producción de metabolitos que realizan las bmMSC hacia el medio, lo cual podría influenciar en el aumento del efecto neuroprotector sobre la neurodegeneración del tejido; sin embargo, el secretoma, a pesar de tener una composición constante a lo largo de la evaluación, también tuvo un efecto neuroprotector sobre la neuroretina en degeneración, representando una nueva potencial alternativa terapéutica libre de células para la atenuación de enfermedades neurodegenerativas (Harrell et al., 2019).

Complementariamente, los resultados de inmunoexpresión de la proteína GFAP mostraron una gliosis reactiva relacionada con la degeneración de la retina, como reportan Bringmann & Wiedemann, 2012 y Vecino et al., 2016, la cual disminuyó en el co-cultivo de NR+MSC y NR+secretoma; mostrando una menor expresión de la GFAP a lo largo de todas las capas de la retina en comparación con el monocultivo de neuroretina. Estos resultados sugieren que el secretoma de las bmMSC humanas tuvo un efecto neuroprotector sobre la neurodegeneración retiniana *in vitro* a nivel de la gliosis, concordando con los reportes anteriores de Labrador-Velandia et al., 2019 y Usategui-Martín et al., 2020 que también trabajan con las bmMSC de Citospin S.L. (Valladolid, España) y con las investigaciones de Mollick et al., 2016 y Jones et al., 2019, dónde emplean células progenitoras neurales humanas (hNPC) las cuales proporcionaron protección retinal *in vitro*.

Adicionalmente, se evaluó los cambios en la morfología de las distintas capas de la retina y la inmunoexpresión de proteínas relacionadas a las células neuronales. Los resultados de las condiciones de co-cultivo de NR+MSC y NR+secretoma fueron similares a los de la NR fresca, a nivel de morfología y de distribución de la inmunoexpresión de las proteínas PNA (conos), Rho (bastones), PKCa (células bipolares) y NeuN (células ganglionares); mostrando sólo una degeneración incipiente de la NR en ambas condiciones. Estos resultados sugieren que el secretoma de las bmMSC humanas tuvo un efecto neuroprotector sobre la neurodegeneración retiniana *in vitro* en las distintas células y capas de la retina, concordando con los resultados de Labrador-Velandia et al., 2019, donde se demostró que el sobrenadante del co-cultivo de MSC pudo proteger a las células ganglionares de la retina frente a los cambios degenerativos y se redujo la gliosis reactiva, retardando la neurodegeneración. Adicionalmente, realizaron un análisis del sobrenadante del co-cultivo de MSC, detectando la presencia del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor neurotrófico ciliar (CNTF). En este sentido, los resultados sugieren que la neuroprotección retiniana puede ser consecuencia de las propiedades paracrinas y de las moléculas secretadas por las células madre mesenquimales

(Cuenca et al., 2014; Labrador-Velandia et al., 2019; Usategui-Martín et al., 2020).

La presente investigación también abarcó el estudio a nivel molecular del efecto del secretoma sobre los mecanismos de activación de la apoptosis, necroptosis, autofagia, estrés oxidativo e inflamación frente al proceso neurodegenerativo, ya que durante el desarrollo y el propio funcionamiento de la retina, es necesario un correcto balance entre los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular programada; los cuales pueden verse afectados cuando existen factores de riesgo ambiental, mutaciones o el propio envejecimiento, pudiendo desencadenar mecanismos de inducción de la apoptosis de los fotorreceptores contribuyendo a la aparición de enfermedades (Cuenca et al., 2014).

En el caso de la apoptosis, los datos obtenidos mostraron una disminución de la inmunoexpresión de la proteína AIF (inductora de la apoptosis) en la capa de los fotorreceptores con los tratamientos de NR+MSC y NR+secretoma; además, estos resultados concuerdan con la disminución de la expresión de los genes pro-apoptóticos *BAX, CASP3, CASP8* y *CASP9*; y también con un aumento en la expresión del gen anti-apoptótico *BCL2.* Dichos resultados reflejan una modulación en las vías de apoptosis dependientes de caspasa, las cuales son el principal mecanismo implicado en la neurodegeneración de las células de la retina (Cuenca et al., 2014). Además, se observó una disminución de expresión en la proteína reguladora de la apoptosis como AIF; la cual reacciona en respuesta a estímulos extrínsecos o intrínsecos (Singh et al., 2019). Así mismo, los resultados obtenidos coinciden con el reciente estudio preclínico realizado por Lejkowska et al., 2019; donde se demostró la atenuación de la apoptosis evaluando el efecto neuroprotector a largo plazo de la terapia intravítrea con bmMSC modificadas genéticamente para sobreexpresar el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en ratones mutantes Rd6 con degeneración crónica de la retina, demostrando la versatilidad del tratamiento con células madre.

Otro mecanismo de muerte celular que ha demostrado tener un papel en las enfermedades de la retina es la necroptosis, un tipo de necrosis regulada, donde ocurre una alteración en las membranas plasmáticas; estando involucrado en procesos fisiológicos y patológicos, incluida la degeneración de la retina (He et al., 2016). En la presente tesis, la inmunoexpresión de la proteína MLKL en las neuroretinas en co-cultivo con bmMSC y con el secretoma, se desarrolla más en la capa de células ganglionares y en menor medida en el segmento externo de los fotorreceptores; siendo similar la respuesta entre ambos tratamientos frente al proceso de neurodegeneración. Así mismo, la expresión de los genes *RIPK1, RIPK3* y *MLKL,* involucrados en la activación de la necroptosis (Murakami et al., 2014; He et al., 2016), disminuyó en las neuroretinas cultivadas con el secretoma, demostrando que el secretoma de las bmMSC puede promover la disminución de la activación de la necroptosis celular durante la neurodegeneración de la retina.

Actualmente, existen más evidencias que demuestran que las proteínas de la autofagia están implicadas en la fisiología y patología de la retina, y que, defectos en este mecanismo contribuyen a la degeneración de la retina (Beth Levine & Guido Kroemer, 2008; Cuenca et al., 2014; Boya et al., 2016; Galluzzi et al., 2017; Lin & Xu, 2019). Respecto a la presente investigación, los resultados mostraron que el secretoma de bmMSC pudo modular la autofagia, reflejándose en la disminución de expresión del gen *MTOR*, que es la principal señal inhibidora que interrumpe la autofagia en presencia de factores de crecimiento y abundantes nutrientes (Khaminets et al., 2016). También se observó una baja expresión del gen *SQSTM1,* concordando con la baja inmunoexpresión de la proteína p62, la cual se encarga de reconocer los desechos celulares tóxicos, que luego son eliminados mediante la autofagia. Estos resultados son importantes, ya que se ha determinado que la acumulación de p62 induce una respuesta de estrés celular que conduce al desarrollo de desórdenes neurodegenerativos (Rusten & Stenmark, 2010). Del mismo modo, se registró un aumento de expresión de los genes *ATG7*, *BCLIN1* y *LC3B*, involucrados en la formación del autofagosoma. Estos resultados coincidieron con estudios previos,

como el de Faghiri & Bazan, 2010; dónde se estudia el rol de la fosforilación de las vías PI3K/Akt y MTOR/p70S6K en la neuroprotección de células del epitelio pigmentario de la retina, señalando que estas vías juegan un papel importante en la eliminación del estrés oxidativo, lo que sugiere que las propiedades neuroprotectoras de las bmMSC también pueden estar asociadas con la modulación de la autofagia.

El estrés oxidativo también juega un rol principal en la degeneración de la retina, promoviendo la inflamación y la apoptosis (Cuenca et al., 2014). Por otro lado, los organismos poseen sus propios sistemas antioxidantes los cuales se encargan de remover las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, protegiendo a las células del estrés oxidativo; siendo, en el caso de los mamíferos, los sistemas de tiorredoxina (Trx) y la glutation-glutaredoxina (Grx) los que controlan el entorno redox celular, funcionando de manera coordinada (Lu & Holmgren, 2014; Pannala & Dash, 2015). Las diferentes funciones de la Trx son dependientes de la actividad de la tiorredoxina reductasa (TrxR), es así cómo ambas juegan un rol importante en la neuroprotección a través de la modulación del estrés oxidativo, la inflamación y los procesos anti-apoptóticos (Holmgren & Lu, 2010).

Los resultados obtenidos en esta investigación respecto a los genes relacionados con el estrés oxidativo, demostraron un aumento de la expresión para *TXNRD1,* sugiriendo que tanto las bmMSC y el secretoma estimulan la respuesta del sistema antioxidante de la tiorredoxina. En el caso del gen *TXN2* también se observó aumento de expresión*,* apoyando el posible papel esencial del secretoma en la activación de la maquinaria antioxidante. Las glutation peroxidasas (GPxs) también protegen contra el daño de ROS y tienen una importante capacidad antioxidante en situaciones patológicas (Holzerova et al., 2016). Los resultados actuales mostraron un aumento significativo en la expresión del gen *GPX6* en presencia de bmMSC y el secretoma, lo que concuerda con los resultados descritos anteriormente. También se observó un aumento en la expresión del gen *SOD1*, que codifica la enzima superóxido

dismutasa, involucrada en la destrucción de los radicales libres superóxido (Eleutherio et al., 2021). Es así que los resultados actuales respaldan la hipótesis de que el mecanismo de la neuroprotección retiniana proporcionado por el secretoma de bmMSC humano puede ser a través de la activación de la maquinaria antioxidante para modular el daño de ROS.

Los resultados del análisis de los genes relacionados a la inflamación de la presente tesis, mostraron un incremento significativo en la expresión de estos genes en todas las condiciones experimentales, en comparación a la retina fresca. Estos resultados, concuerdan con el aumento de ROS, el cual causa inflamación y muerte celular por el incremento de citoquinas inflamatorias, el factor de necrosis tumoral TNFa y la interleuquina 6 (Ruan et al., 2020). Así mismo, la relación que existe entre estos estímulos y la activación de las microglias es trascendental para definir si se da un efecto protector frente el daño o si se contribuye a un estado crónico de la enfermedad. En el caso de un estado crónicamente activado, se liberan moléculas como las citoquinas pro-inflamatorias, ROS, NO y TNFa, las cuales tienen efectos neurotóxicos y nocivos (Cuenca et al., 2014).

De manera general, los resultados de esta tesis, mostraron que el secretoma de bmMSC pudo modificar las expresiones de los genes y proteínas involucrados en los mecanismos de la apoptosis, la necroptosis, la autofagia y del estrés oxidativo durante la neurodegeneración retiniana *in vitro.* Así, a partir de la evidencia se puede justificar su potencial aplicación como neuroprotector; ya que participa en la respuesta a nivel celular y molecular, impactando en la preservación de la función y estructura de la neuroretina frente a la degeneración (Cuenca et al., 2014).

Estudios realizados anteriormente, han demostrado que las MSC en entornos de neurodegeneracion retiniana tienen la capacidad de secretar proteínas cruciales en la neuroprotección de la retina, teniendo propiedades

antiinflamatorias y anti-apoptóticas (Labrador-Velandia et al., 2019; Usategui-Martín et al., 2020). Así mismo, los resultados de esta investigación también sugirieren que la aplicación de bmMSC no es necesaria y que el secretoma puede tener un efecto neuroprotector sobre la degeneración retiniana a través de la modulación de la apoptosis programada, la necroptosis, la autofagia y el estrés oxidativo. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el desarrollo de una estrategia terapéutica libre de células basada en la producción de "cócteles de secretoma" de MSC con características neuroprotectoras puede ser un enfoque para tratar las enfermedades neurodegenerativas de la retina (Vizoso et al., 2017; Labrador-Velandia et al., 2019; Usategui-Martín et al., 2020; Usategui-Martin & Fernandez-Bueno, 2021). Adicionalmente, los resultados obtenidos en este estudio y en los reportados por Labrador-Velandia et al., 2019 y Usategui-Martín et al., 2020; mostraron que la capacidad neuroprotectora del secretoma de bmMSC es mayor que la del secretoma de las MSC adiposas como lo reporta Alonso-Alonso et al., 2020. Además, la estimulación del entorno de neurodegeneración retiniana, como se realizó previamamente en los cultivos de retina, parece ser crucial para obtener el secretoma de bmMSC humano con propiedades neuroprotectoras específicas.

De la misma manera, estos resultados pueden ser una alternativa para dirigir las estrategias terapéuticas en la prevención del daño neuronal en la neurodegeneración retiniana, enfocándose en los receptores de muerte inducida, los cuales están involucrados en la regulación de la apoptosis y la necroptosis (Dong & Sun, 2011). Sin embargo, es importante señalar que la inhibición de la apoptosis o la necroptosis es insuficiente para evitar los procesos neurodegenerativos, ya que estas vías se tienden a compensar entre sí (Trichonas et al., 2010). Por lo mencionado, los resultados obtenidos en la presente tesis, muestran que el secretoma de bmMSC puede modular todos los mecanismos involucrados en la neurodegeneración de manera conjunta y uniforme y, por lo tanto, exhibir una potencial capacidad neuroprotectora.

En resumen, este estudio confirmó el efecto neuroprotector del secretoma de células madre mesenquimales de médula ósea, sobre la neurodegeneración retiniana *in vitro*, y sugiere que las propiedades neuroprotectoras del secretoma pueden estar asociadas con la activación de la maquinaria antioxidante de la retina, la modulación de la autofagia y la inhibición de la apoptosis y necroptosis. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente (Labrador-Velandia et al., 2019; Usategui-Martín et al., 2020) y refuerzan la idea de que el secretoma de bmMSC humano puede ser una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de las enfermedades neurodegenetarivas de la retina. Finalmente, la inyección intravítrea del secretoma de células madre puede ser crucial para el desarrollo de tratamientos efectivos para este tipo de enfermedades, basándose en el uso de combinaciones de diferentes factores neuroprotectores libres de células.

VII. CONCLUSIONES

1. El secretoma de las bmMSC humanas se asocia con un efecto neuroprotector sobre un modelo *ex vivo* de degeneración de retina porcina, sugiriendo que no es necesaria la presencia de MSC para la neuroprotección.

2. El secretoma de bmMSC humanas preservó la morfología de las distintas capas de la retina observándose una buena inmunoexpresión de proteínas implicadas en el mantenimiento de la estructura retiniana.

3. El secretoma de bmMSC humanas podría asociarse con una disminución de la activación de los procesos de muerte celular programada y estrés oxidativo, y con una activación de la autofagia. Pudiendo todo ello explicar el efecto neuroprotector del secretoma de bmMSC sobre la neurodegeneración retiniana.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda caracterizar el secretoma de las bmMSC para determinar qué tipo de moléculas neuroprotectoras la componen y en qué proporción se encuentran.
- Se recomienda evaluar el efecto neuroprotector del secretoma de las bmMSC en animales de experimentación.
- En el caso de la autofagia, se recomienda usar otra proteína distinta a la p62 para evaluar la inmunoexpresión de proteínas envueltas en este mecanismo, ya que no se pudo observar grandes diferencias entre los distintos tratamientos ni controles.
- En el caso de los marcadores de inflamación, se recomienda analizar tanto otros genes como la presencia a nivel de tejido, para determinar si existen diferencias entre los tratamientos comparados.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso-Alonso, M. L., Srivastava, G. K., Usategui-Martín, R., García-Gutierrez, M. T., Pastor, J. C., & Fernandez-Bueno, I. (2020). Mesenchymal Stem Cell Secretome Enhancement by Nicotinamide and Vasoactive Intestinal Peptide: A New Therapeutic Approach for Retinal Degenerative Diseases. *Stem Cells International*, *2020*(1). https://doi.org/10.1155/2020/9463548

Athanasiou, D., Aguilà, M., Bevilacqua, D., Novoselov, S. S., Parfitt, D. A., & Cheetham, M. E. (2013). The cells stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Letters*, *587*(13), 2008–2017. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.020.THE

Behar-Cohen, F., Gelizé, E., Jonet, L., & Lassiaz, P. (2020). Anatomy of the retina. *Médecine/Sciences*, *36*(6–7), 594–599. https://doi.org/10.1051/medsci/2020094

Bhattacharya, S., Gangaraju, R., & Chaum, E. (2017). Recent Advances in Retinal Stem Cell Therapy. *Current Molecular Biology Reports*, *3*(3), 172–182. https://doi.org/10.1007/s40610-017-0069-3

Bringmann, A., & Wiedemann, P. (2012). Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*, *227*(1), 1–19. https://doi.org/10.1159/000328979

Buckingham, B. P., Inman, D. M., Lambert, W., Oglesby, E., Calkins, D. J., Steele, M. R., Vetter, M. L., Marsh-Armstrong, N., & Horner, P. J. (2008). Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *Journal of Neuroscience*, *28*(11), 2735–2744. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4443-07.2008

Campos, B., Cerrate, A., Montjoy, E., Dulanto Gomero, V., Gonzales, C., Tecse, A., Pariamachi, A., Lansingh, V. C., Dulanto Reinoso, V., Minaya Barba, J., Silva, J. C., & Limburg, H. (2014). Prevalencia y causas de ceguera en Perú: encuesta nacional. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *36*(5), 283–289.

Cuenca, N., Fernández-Sánchez, L., Campello, L., Maneu, V., De la Villa, P., Lax, P., & Pinilla, I. (2014). Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in Retinal*

and Eye Research, *43*, 17–75. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.07.001

Dong, K., & Sun, X. (2011). Targeting death receptor induced apoptosis and necroptosis: A novel therapeutic strategy to prevent neuronal damage in retinal detachment. *Medical Hypotheses*, *77*(1), 144–146. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.03.049

Eleutherio, E. C. A., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R., & de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *697*(September 2020). https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701

Faghiri, Z., & Bazan, N. G. (2010). PI3K/Akt and mTOR/p70S6K pathways mediate neuroprotectin D1-induced retinal pigment epithelial cell survival during oxidative stress-induced apoptosis. *Experimental Eye Research*, *90*(6), 718–725. https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.03.002

Fernandez-Bueno, I., Fernández-Sánchez, L., Gayoso, M. J., García-Gutierrez, M. T., Pastor, J. C., & Cuenca, N. (2012). Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Experimental Eye Research*, *104*, 26–38. https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.08.012

Fernandez-Bueno, I., & Usategui-Martín, R. (2021). Ex Vivo Model of Spontaneous Neuroretinal Degeneration for Evaluating Stem Cells' Paracrine Properties. In *Cellular Therapy and Transplantation* (Vol. 3, Issue 10, pp. 125–137). https://doi.org/10.3205/ctt-2011-en-000096.01

Francipane, M. G., & Lagasse, E. (2016). Toward Organs on Demand: Breakthroughs and Challenges in Models of Organogenesis. *Current Pathobiology Reports*, *4*(3), 77–85. https://doi.org/10.1007/s40139-016-0111-9

Gagliardi, G., Ben M'Barek, K., & Goureau, O. (2019). Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: A pluripotent stem cell-based approach. *Progress in Retinal and Eye Research*, *71*(November 2018), 1–25. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.03.001

Garlipp, M. A., Nowak, K. R., & Gonzalez-Fernandez, F. (2012). Cone Outer

Segment Extracellular Matrix as Binding Domain for Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein. *J Comp Neurol*, *520*(4), 756–769. https://doi.org/10.1002/cne.22773

Gonçalves, E. (2020). Advanced therapy medicinal products: value judgement and ethical evaluation in health technology assessment. *European Journal of Health Economics*, *21*(3), 311–320. https://doi.org/10.1007/s10198-019-01147-x

Gupta, M. P., Herzlich, A. A., Sauer, T., & Chan, C. C. (2016). Retinal anatomy and pathology. *Developments in Ophthalmology*, *55*, 7–17. https://doi.org/10.1159/000431128

Harrell, C. R., Fellabaum, C., Jovicic, N., Djonov, V., Arsenijevic, N., & Volarevic, V. (2019). Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells*, *8*(5). https://doi.org/10.3390/cells8050467

He, S., Huang, S., & Shen, Z. (2016). Biomarkers for the detection of necroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(11–12), 2177–2181. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2192-3

Holmgren, A., & Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *396*(1), 120–124. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.083

Holzerova, E., Danhauser, K., Haack, T. B., Kremer, L. S., Melcher, M., Ingold, I., Kobayashi, S., Terrile, C., Wolf, P., Schaper, J., Mayatepek, E., Baertling, F., Friedmann Angeli, J. P., Conrad, M., Strom, T. M., Meitinger, T., Prokisch, H., & Distelmaier, F. (2016). Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration. *Brain*, *139*(2), 346–354. https://doi.org/10.1093/brain/awv350

Ikelle, L., Al-Ubaidi, M. R., & Naash, M. I. (2020). Pluripotent Stem Cells for the Treatment of Retinal Degeneration: Current Strategies and Future Directions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(743).

https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00743

Jones, M. K., Lu, B., Chen, D. Z., Spivia, W. R., Mercado, A. T., Ljubimov, A. V., Svendsen, C. N., Van Eyk, J. E., & Wang, S. (2019). In Vitro and In Vivo Proteomic Comparison of Human Neural Progenitor Cell-Induced Photoreceptor Survival. *Proteomics*, *19*(3), 1–12. https://doi.org/10.1002/pmic.201800213

Khaminets, A., Behl, C., & Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*, *26*(1), 6–16. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.010

Kolb, H. (2003). How the Retina Works. *American Scientist*, *91*(1), 28. https://doi.org/10.1511/2003.11.841

Labrador-Velandia, S., Alonso-Alonso, M. L., Di Lauro, S., García-Gutierrez, M. T., Srivastava, G. K., Pastor, J. C., & Fernandez-Bueno, I. (2019). Mesenchymal stem cells provide paracrine neuroprotective resources that delay degeneration of co-cultured organotypic neuroretinal cultures. *Experimental Eye Research*, *185*(May), 107671. https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.011

Labrador Velandia, S., Di Lauro, S., Alonso-Alonso, M. L., Tabera Bartolomé, S., Srivastava, G. K., Pastor, J. C., & Fernandez-Bueno, I. (2018). Biocompatibility of intravitreal injection of human mesenchymal stem cells in immunocompetent rabbits. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, *256*(1), 125–134. https://doi.org/10.1007/s00417-017-3842-3

Lejkowska, R., Kawa, M. P., Pius-Sadowska, E., Rogińska, D., Łuczkowska, K., Machaliński, B., & Machalińska, A. (2019). Preclinical evaluation of long-term neuroprotective effects of BDNF-engineered mesenchymal stromal cells as intravitreal therapy for chronic retinal degeneration in Rd6 mutant mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 1–25. https://doi.org/10.3390/ijms20030777

Lin, W., & Xu, G. (2019). Autophagy: A Role in the Apoptosis, Survival, Inflammation, and Development of the Retina. *Ophthalmic Research*, *61*(2),

65–72. https://doi.org/10.1159/000487486

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Lu, C., Li, S., & Jin, M. (2020). Activation of the Mixed Lineage Kinase Domain Like Protein-Mediated Necroptotic Pathway in Light-Induced Retinal Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *61*(7), 1287–1287.

Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, *66*, 75–87. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036

Maguire, G. (2013). Stem cell therapy without the cells. *Communicative and Integrative Biology*, *6*(6). https://doi.org/10.4161/cib.26631

Micera, A., Balzamino, B. O., Di Zazzo, A., Dinice, L., Bonini, S., & Coassin, M. (2021). Biomarkers of Neurodegeneration and Precision Therapy in Retinal Disease. *Frontiers in Pharmacology*, *11*(January), 1–10. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.601647

Mollick, T., Mohlin, C., & Johansson, K. (2016). Human neural progenitor cells decrease photoreceptor degeneration, normalize opsin distribution and support synapse structure in cultured porcine retina. *Brain Research*, *1646*, 522–534. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.06.039

Murakami, Y., Matsumoto, H., Roh, M., Giani, A., Kataoka, K., Morizane, Y., Kayama, M., Thanos, A., Nakatake, S., Notomi, S., Hisatomi, T., Ikeda, Y., Ishibashi, T., Connor, K. M., Miller, J. W., & Vavvas, D. G. (2014). Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. *Cell Death and Differentiation*, *21*(2), 270–277. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.109

Murakami, Y., Notomi, S., Hisatomi, T., Nakazawa, T., Ishibashi, T., Miller, J. W., & Vavvas, D. G. (2013). Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Progress in Retinal and Eye Research*, *37*,

114–140. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.08.001

Nauta, A. J., & Fibbe, W. E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, *110*(10), 3499–3506. https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069716

Pannala, V. R., & Dash, R. K. (2015). Mechanistic characterization of the thioredoxin system in the removal of hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, *78*, 42–55. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.508

Pardue, M. T., & Allen, R. S. (2018). Neuroprotective strategies for retinal disease Machelle. *Progress in Retinal and Eye Research*, *65*, 50–76. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.02.002.Neuroprotective

Puertas-Neyra, K., Galindo-Cabello, N., Hernández-Rodríguez, L. A., González-Pérez, F., Rodríguez-Cabello, J. C., González-Sarmiento, R., Pastor, J. C., Usategui-Martín, R., & Fernandez-Bueno, I. (2022). Programmed Cell Death and Autophagy in an in vitro Model of Spontaneous Neuroretinal Degeneration. *Frontiers in Neuroanatomy*, *16*(February), 1–14. https://doi.org/10.3389/fnana.2022.812487

Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2019). Glia of the human retina. *Glia*, 768–796. https://doi.org/10.1002/glia.23727

Ruan, Y., Jiang, S., Musayeva, A., & Gericke, A. (2020). Oxidative stress and vascular dysfunction in the retina: Therapeutic strategies. *Antioxidants*, *9*(8), 1–30. https://doi.org/10.3390/antiox9080761

Ruether, K., Feigenspan, A., Pirngruber, J., Leitges, M., Baehr, W., & Strauss, O. (2010). Pkcα is essential for the proper activation and termination of rod bipolar cell response. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *51*(11), 6051–6058. https://doi.org/10.1167/iovs.09-4704

Rusten, T. E., & Stenmark, H. (2010). P62, an autophagy hero or culprit? *Nature Cell Biology*, *12*(3), 207–209. https://doi.org/10.1038/ncb0310-207

Sanges, D., Comitato, A., Tammaro, R., & Marigo, V. (2006). Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF)

and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(46), 17366–17371. https://doi.org/10.1073/pnas.0606276103

Singh, R., Cuzzani, O., Binette, F., Sternberg, H., West, M. D., & Nasonkin, I. O. (2018). Pluripotent Stem Cells for Retinal Tissue Engineering: Current Status and Future Prospects. *Stem Cell Reviews and Reports*, *14*(4), 463–483. https://doi.org/10.1007/S12015-018-9802-4

Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family Proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *20*(3), 175–193. https://doi.org/10.32388/j9r853

Tang, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, D., Shen, B., Luo, M., & Gu, P. (2017). Progress of stem/progenitor cell-based therapy for retinal degeneration. *Journal of Translational Medicine*, *15*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1183-y

Trichonas, G., Murakami, Y., Thanos, A., Morizane, Y., Kayama, M., Debouck, C. M., Hisatomi, T., Miller, J. W., & Vavvas, D. G. (2010). Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(50), 21695–21700. https://doi.org/10.1073/pnas.1009179107

Usategui-Martin, R., & Fernandez-Bueno, I. (2021). Neuroprotective therapy for retinal neurodegenerative diseases by stem cell secretome. *Neural Regeneration Research*, *16*(1), 117–118. https://doi.org/10.4103/1673-5374.283498

Usategui-Martín, R., Puertas-Neyra, K., García-Gutiérrez, M. T., Fuentes, M., Pastor, J. C., & Fernandez-Bueno, I. (2020). Human Mesenchymal Stem Cell Secretome Exhibits a Neuroprotective Effect over In Vitro Retinal Photoreceptor Degeneration. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, *17*(June), 1155–1166. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.003

Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016).

Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, *51*, 1–40. https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2015.06.003

Vizoso, F., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), 1852. https://doi.org/10.3390/ijms18091852

Winkler, J., Hagelstein, S., Rohde, M., & Laqua, H. (2002). Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina. *Experimental Eye Research*, *74*(6), 777–788. https://doi.org/10.1006/exer.2002.1188

Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C. Y., & Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, *2*(2), e106–e116. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1

X. ANEXOS

Anexo 1. Glosario

1. **Axotomía:** Transección o rompimiento de un axón. Este tipo de denervación se emplea con frecuencia en estudios experimentales sobre fisiología neuronal y muerte o supervivencia neuronal, con vistas a la comprensión de las enfermedades del sistema nervioso.
   Fuente: DeCS/MeSH. Fecha: 12/08/2022.
   https://decs.bvsalud.org/es/ths/resource/?id=33568#Concepts

2. **Células madre mesenquimales:** Son células madre multipotentes que se encuentran en la médula ósea y pueden diferenciarse en células cartilaginosas (condrocitos), células óseas (osteoblastos) y células grasas (adipocitos).
   Fuente: EuroStemCell. Fecha: 12/08/2022.
   https://www.eurostemcell.org/es/celulas-madre-mesenquimales-las-otras-celulas-madre-de-la-medula-osea

3. **Comunicación paracrina:** Señalización celular en la que un factor secretado por una célula, afecta a otras células en el ambiente local.
   Fuente: MesH-NIH. Fecha: 12/08/2022.
   https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D019899

4. **Cultivo organotípico:** Cultivo de un órgano o tejido complejo obtenido de un organismo, que permite la preservación de su arquitectura y muchas de sus interacciones celulares.
   Fuente: Francipane & Lagasse, 2016.

5. ***Ex vivo:*** Experimentos fuera del cuerpo vivo de un organismo, del cual se extirpa un órgano, células o tejidos
   Fuente: Instituto Nacional del Cáncer-NIH. Fecha: 12/08/2022.
   https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/ex-vivo

6. **Explante:** Fragmento de tejido extraído de un ser vivo para cultivarlo en un medio artificial.
   Fuente: Real Academia Española. Fecha: 12/08/2022.
   https://dle.rae.es/explante

7. **Secretoma:** Conjunto de moléculas bioactivas incluyendo material genético (DNA, fragmentos de RNA, microRNAs, enzimas, proteínas solubles, lípidos, factores de crecimiento, inmunomoduladores, exosomas y vesículas extracelulares) que son secretados por las células al medio extracelular bajo determinadas condiciones. *Fuente: Harrell et al., 2019*.

8. **Transplante alogénico:** Procedimiento durante el cual un paciente recibe células madre sanas de la sangre o de la médula ósea que provienen de

un donante emparentado (que no es un gemelo del paciente), o de un donante no emparentado con características genéticas similares a las del paciente.
Fuente: Instituto Nacional del Cáncer-NIH. Fecha: 12/08/2022. https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/trasplante-alogenico-de-celulas-madre