



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional

Sede Sur

Departamento de Farmacobiología

**Determinación *in vitro* del papel de DNMT3a
en el proceso de desdiferenciación de la glía
de Müller.**

T E S I S

que presenta

QFB. REBECA YAEL VICTORIA CHÁVEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de tesis:

Dra. Mónica Lamas Gregori

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio 13 del Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV-Sede Sur, bajo la dirección de la Dra. Mónica Lamas Gregori, con el apoyo económico **SEP-CINVESTAV 071** y la beca de maestría con número **1002642** otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

We call it science, but in the end, it's just unbridled curiosity.

- Neil deGrasse Tyson

Agradecimientos

Quiero ofrecer un especial agradecimiento a la Dra. Mónica Lamas Gregori por permitirme crecer como científica bajo su tutela, por su apoyo, comprensión y confianza.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, así como a los investigadores que en éste laboran, por su apoyo y participación en mi formación como maestra en ciencias.

A mis sinodales: Dra. Claudia González Espinosa y el Dr. Iván Velasco.

A mi madre por su infinito amor y paciencia.

A mis amigas y amigos por su tiempo, comprensión y cariño.

A las compañeras y compañeros con los que he compartido el laboratorio 13 a lo largo de mi estancia, en especial a Brenda Estrada[†], que siempre vivirá en nuestros corazones.

A Ivonne Lezama, por salir al rescate de los cultivos para los proyectos en los tiempos de pandemia.

A Alexandra Elbakyan, por poner a nuestro alcance, con sólo un click, todo el conocimiento del mundo.

Y, por último, pero no por ello menos importante, a todas las mujeres científicas que lucharon y sentaron el precedente para que hoy, nosotras, podamos desarrollarnos y sobresalir en el ámbito científico.

Índice	
Abreviaturas	7
Índice de Figuras	9
Índice de Tablas	10
Resumen	11
Abstract	12
1. Introducción	13
1.1. La visión	13
1.2. La retina, daño y regeneración.....	14
1.2.1. Etapa de desdiferenciación	15
1.2.2. Etapa de proliferación.....	15
1.2.3. Etapa de diferenciación	16
1.3. Metilación del ADN.....	17
1.3.1. ADN metiltransferasas.....	18
1.4. DNMTs en la desdiferenciación de la glía de Müller	19
1.5. Inhibición selectiva de DNMTs	21
1.6. Tecnología CRISPR/dCas9.....	22
2. Hipótesis	25
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo general	25
3.2. Objetivos particulares.....	25
4. Materiales y métodos	26
4.1. Diseño experimental.....	26
4.2. Análisis estadístico.....	26
4.3. Diseño del ARN guía para la inhibición de DNMT3a.....	27

4.4.	Ligación del ARN guía en el vector de clonación	28
4.5.	Transformación de bacterias competentes y comprobación de transfección 30	
4.6.	Cultivos primarios de glía de Müller	33
4.7.	Inducción de la desdiferenciación de la glía de Müller con NMDA.....	34
4.8.	Electroporación de cultivos de glía de Müller	34
4.9.	Extracción de ARN total, RT-PCR y qPCR.	35
4.10.	Conteo y viabilidad celular	38
4.11.	Determinación de células en fase S del ciclo celular	38
5.	Resultados	39
5.1.	Diseño y obtención del plásmido para la inhibición de DNMT3a murina..	39
5.2.	Transfección de glía de Müller	41
5.3.	Viabilidad celular	43
5.4.	Análisis de proliferación celular	44
5.5.	Análisis de expresión génica.....	46
6.	Discusión	48
6.1.	Sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición de DNMT3a en células de Müller murinas	49
6.2.	Cambios morfológicos en cultivos de glía de Müller transfectados con el plásmido para la inhibición de DNMT3a.....	51
6.3.	DNMT3a en la proliferación y viabilidad celular	52
6.4.	DNMT3a y su relación con la expresión de genes asociados a pluripotencia.....	54
7.	Conclusiones	57
8.	Perspectivas	57
9.	Referencias	58

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de varianza

Apobec2: Apolipoproteína B mRNA enzima editada en la subunidad catalítica 2

ARN: Ácido ribonucleico

Ascl1: Factor de transcripción BHLH 1 de familia Achaete-Scute

CO₂: Dióxido de carbono

CpG: Citosina unida mediante fosfato a guanina

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas

crRNA: ARN asociado a CRISPR

dCas9: Proteína asociada a CRISPR tipo 9 deficiente de su actividad enzimática

DMEM: Medio modificado e Dubelcco

DNMT (1, 2, 3, 3a, 3b, 3L, 4, 5, 6, 7, 8): ADN metiltransferasa

EGF-HB: Factor de crecimiento tipo endotelial unido a heparina

ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares

Gadd45: Proteína de arresto de crecimiento e inducible por daño al ADN

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GAsP: Genes asociados a pluripotencia

HNH: Dominio de endonucleasa

KRAB: Caja asociada Krüppel

LB: Luria-Bertani

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

MeCP2: Proteína de unión a CpG metilados de tipo 2

miR-29a: Micro ARN tipo 29a

miRNAs: Micro ARN

MGPD: Célula progenitora derivada de glía de Müller

NeuroD1: Gen de diferenciación neuronal 1

NMDA: N-metil-D-aspartato

NSCs: Células troncales neuronales

PAM: Motivo adyacente al protoespaciador

pb: Pares de bases

PBS: Amortiguador salino de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RuvC: Dominio de endonucleasa

SFB: Suero fetal bovino

sgRNA: ARN guía

siRNA: ARN pequeño de interferencia

Sox2: Caja 2 de la región Y determinante de sexo

TET: Gen de translocación diez-once

TFB1: Amortiguador de transformación 1

TFB2: Amortiguador de transformación 2

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

tracrRNA: ARN asociado CRISPR transactivado

TSS: Sitio de inicio de la transcripción

UHRF1: Proteína tipo ubiquitina con PHD y dominios de anillos 1

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de un corte sagital del globo ocular.....	14
Figura 2. Esquema de las fases de reprogramación celular de la glía de Müller...	16
Figura 3. Expresión de DNMT3a durante la desdiferenciación de células retinianas en especies con capacidad regenerativa y no regenerativa.....	20
Figura 4. Esquema general de la acción de endonucleasa de los sistemas CRISPR/Cas.....	23
Figura 5. Esquema representativo del sistema CRISPR/dCas9-KRAB.....	24
Figura 6. Sitio de hibridación del sgRNA en el gen y el transcrito de DNMT3a.....	28
Figura 7. Plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression.....	29
Figura 8. Plásmido pLV-hU6-sgRNA-hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro.....	31
Figura 9. PCR en punto final del vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a..	39
Figura 10. Fragmento del electroferograma del sitio de inserción del ARN guía en el vector de clonación de sgDNMT3a.....	40
Figura 11. PCR punto final del vector pLV-hU6-sgRNA-hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro.....	40
Figura 12. Microfotografías de los cultivos de glía de Müller en diferentes condiciones.....	42
Figura 13. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión relativa de DNMT3a con respecto a GAPDH en células de Müller.....	43
Figura 14. Determinación del porcentaje de células vivas de cada grupo experimental a las 6 o 72 horas después del tratamiento.....	44
Figura 15. Determinación del porcentaje de células de Müller proliferantes de cada grupo experimental a las 6 o 72 horas después del tratamiento.....	45
Figura 16. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión de Ascl1 respecto a GAPDH en células de Müller.....	46

Figura 17. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión de Lin28 respecto a GAPDH en células de Müller.....	47
Figura 18. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión de Nestina respecto a GAPDH en células de Müller.....	47
Figura 19. Perfil de expresión de genes involucrados en la metilación del ADN y genes asociados a pluripotencia.....	48

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los grupos experimentales.....	26
Tabla 2. Secuencia diana y oligonucleótidos diseñados para la inhibición de DNMT3a murina.....	28
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos requeridos para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) de los plásmidos pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a y pLV-hU6-sgRNA-hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro.....	32
Tabla 4. Parámetros de reacción para PCR.....	32
Tabla 5. Condiciones de ciclado para PCR.....	33
Tabla 6. Programa de electroporación para glía de Müller.....	35
Tabla 7. Componentes para llevar a cabo qPCR.....	36
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para qPCR.....	37
Tabla 9. Condiciones de ciclado para qPCR.....	37

Resumen

Las células de Müller son las células gliales más abundantes en retina. Cumplen con diversas funciones entre las que destaca su papel en la regeneración retiniana como respuesta a un daño, a través de un proceso de desdiferenciación, que se observa ampliamente en vertebrados como el pez cebra, pero no en mamíferos.

Existe evidencia que señala a la metilación del ADN como un proceso involucrado en la desdiferenciación de la glía de Müller e incluso se puede considerar una barrera epigenética para la regeneración de la retina en mamíferos. Se ha demostrado que la expresión de DNMT3a (una enzima involucrada en el establecimiento y mantenimiento de la metilación del ADN) en especies con capacidad regenerativa se mantiene en niveles basales de después de un daño mientras que en mamíferos aumenta. Se sabe además que esta enzima está involucrada en el mantenimiento de la auto-renovación de células troncales o estado de pluripotencia. En esta tesis, se diseñó un sistema CRISPR/dCas9-KRAB para la inhibición de DNMT3a en células de Müller murinas con la finalidad de identificar su relación con la desdiferenciación de la glía de Müller.

Determinamos que, después de 72 horas de la transfección del sistema CRISPR/dCas9-KRAB en las células de Müller, la expresión de DNMT3a se redujo en un 90% y que, aunado a esto, se incrementó la expresión de genes asociados a células progenitoras neurales como Lin28, Ascl1 y Nestina. También se determinó que dicha disminución incrementa la proliferación celular y, por lo tanto, el porcentaje de viabilidad celular. Por otra parte, observamos que la inhibición de DNMT3a induce cambios morfológicos que podrían también estar asociados con el proceso de desdiferenciación. Con lo anterior, se determinó que DNMT3a está ampliamente involucrada en la desdiferenciación de la glía de Müller, por lo cual, podría ser un blanco terapéutico para la regeneración funcional de la retina en mamíferos.

Palabras clave: Glía de Müller, desdiferenciación, metilación del ADN, DNMT3a.

Abstract

Müller cells are the major type of glial cells in retina. Among their multiple functions, their capacity to dedifferentiate and acquire a “progenitor-like” phenotype and their role in retinal regeneration as a response to damage or injury stands out in vertebrates as zebrafish. However, in mammals this regenerative ability is absent.

DNA methylation is a process widely involved in Müller glia dedifferentiation and it has even been considered as an epigenetic barrier for retinal regeneration in mammals. DNMT3a (an enzyme related with the establishment and maintenance of DNA methylation and involved in the self-renewal ability of several stem cells) shows ambivalent expression kinetics in regenerative and non-regenerative species. While in regenerative species DNMT3a expression remains in basal levels after injury, in mammals it seems to increase.

In order to identify the possible functional role of DNMT3a in mammalian Müller glia dedifferentiation we designed a CRISPR/dCas9-KRAB system to specifically inhibit DNMT3a in mouse Müller primary cultures. We demonstrate that 72 hours after CRISPR/dCas9-KRAB system transfection in Müller cells DNMT3a expression decreased by 90% while the neural pluripotent-related genes *Lin28*, *Ascl1* and *Nestin* expression increased. We also show that DNMT3a inhibition raises cell proliferation and viability, two stem cell characteristics. In addition, we observed morphological changes in cell cultures after transfection that may be related to cell dedifferentiation.

We concluded that DNMT3a is widely involved in murine Müller glia dedifferentiation and we speculate that it could be envisioned as a therapeutic target to improve the functional regeneration in mammalian retina.

Key words: Müller glia, dedifferentiation, DNA methylation, DNMT3a.

1. Introducción

1.1. La visión

El ojo es el órgano primario sensorial de la visión. Esquemáticamente está conformado por tres capas de tejidos denominadas túnicas: la túnica externa que está compuesta por la córnea y fibras de colágeno (esclera) que le proporcionan la estructura al globo ocular, la túnica media con función vascular primordialmente y la túnica interna sensorial que conforma a la retina.

La visión se fundamenta en la recolección de señales lumínicas provenientes del entorno y su posterior transformación en la retina a señales electroquímicas que son enviadas por el nervio óptico hacia el cerebro para su procesamiento a imágenes (Graue, 2009).

La retina está conformada por cinco tipos de células neurales y un tipo glial principal, cuyos somas se encuentran dispuestos en tres capas definidas: 1) la capa nuclear externa constituida por fotorreceptores (conos y bastones), 2) la capa nuclear interna por células bipolares, amacrinas y horizontales y 3) la capa nuclear ganglionar compuesta de células ganglionares, atravesando estas capas neuronales encuentra la glía de Müller (Figura 1) (Prasad & Galetta, 2011).

Las células de Müller son las células gliales radiales de mayor proporción en la retina, son responsables de proveer soporte estructural y metabólico a las neuronas retinianas, generan un puente de comunicación entre neuronas y diversos compartimentos para el intercambio de sustancias como nutrientes, productos de desecho, iones y agua, por lo tanto, también juegan un papel importante en el mantenimiento homeostático y del volumen extracelular. Además, median la transmisión sináptica por su capacidad de reciclaje de neurotransmisores y, como respuesta a una señal de daño, son capaces de reprogramarse hacia un tipo de célula progenitora para aminorar y/o revertir las lesiones generadas en la retina (Newman & Reichenbach, 1996; Reichenbach & Bringmann, 2013).

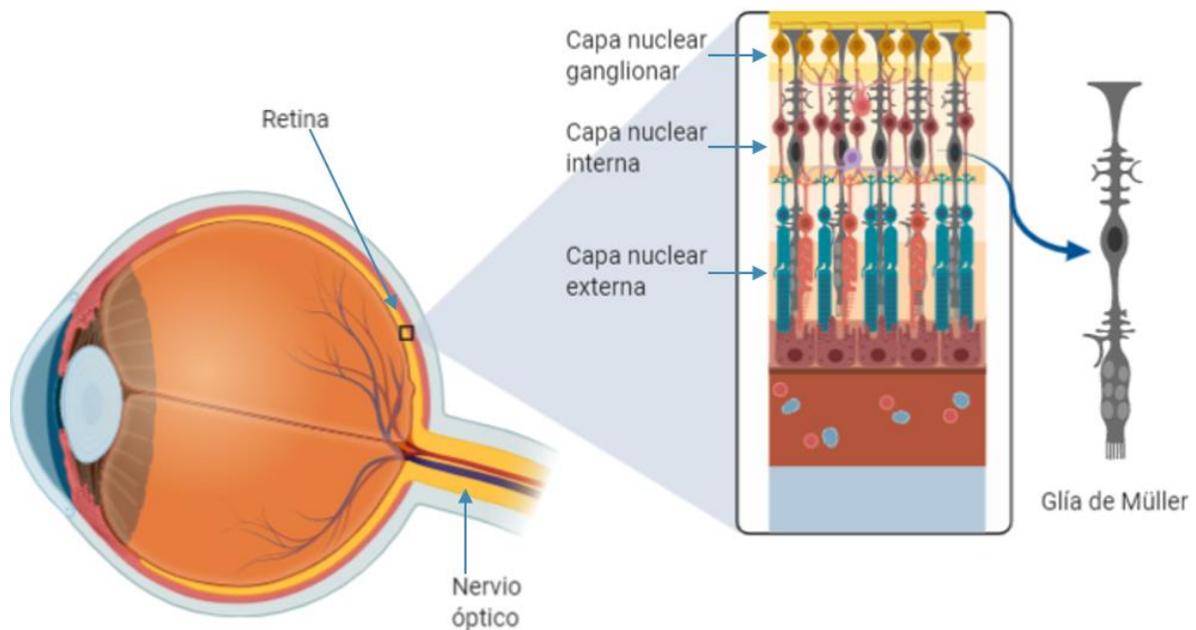


Figura 1. Esquema de un corte sagital del globo ocular. Se observan las tres tunicas que conforman al ojo y que le proveen estructura y función, la túnica interna sensorial constituye a la retina, la cual integra cinco tipos de células neuronales y tres de tipo glial, siendo la principal la glía de Müller. Esquema generado en BioRender.

1.2. La retina, daño y regeneración

Las patologías relacionadas con la retina son una de las principales causas de ceguera entre la población mundial. Estas tienen diversos orígenes etiológicos que van desde mutaciones genéticas, como es el caso de la retinitis pigmentosa, hasta lesiones mecánicas y lumínicas (Ail & Perron, 2017). Se caracterizan por la pérdida de la visión asociada a la muerte de las células que conforman la retina, principalmente (pero no exclusivamente) de fotorreceptores, células amacrinas y ganglionares (Campbell & Hyde, 2017). En algunos vertebrados, como el pez cebra y el pollo, es posible observar el reemplazo de las neuronas dañadas por células nuevas, generadas mediante la reprogramación de la glía de Müller (M. O. Karl & Reh, 2010).

Durante este proceso, la glía de Müller atraviesa tres etapas de cambios que le permiten transformarse en una célula neuronal (Figura 2).

1.2.1. Etapa de desdiferenciación

La primera etapa es la de desdiferenciación, donde la célula de Müller diferenciada adquiere un fenotipo tipo célula troncal (MGDP). Este cambio puede ser caracterizado por la expresión de diversos elementos como: factores de crecimiento (TGF- β , EGF-HB, etc.) (Sharma et al., 2020), factores de transcripción pro-neurales (Ascl1, NeuroD1, etc.) (Chohan, Singh, Kumar, & Kaur, 2017) y genes asociados a células progenitoras (Sox2, Lin28, etc.) (Masui et al., 2007; Zhao et al., 2017) los cuales aumentan, en gran medida, por cambios en el metiloma de la glía de Müller (Cheng, Xie, Jin, & Wang, 2015).

La expresión de estos elementos, permite la reprogramación de la glía de Müller, es decir, la adopción de características de células troncales, para generar una población de MGDP que entren al ciclo celular y comiencen a proliferar (Goldman, 2014). Dentro de este coctel de factores, existen algunos que favorecen en mayor medida la reprogramación efectiva de la glía de Müller como lo son Ascl1 y Lin28 ya que, por sí solos, estos factores inducen la activación de vías de señalización implicadas en la proliferación celular, así como de otros factores de transcripción asociados a pluripotencia (Fausett et al., 2008; Pollak et al., 2013; Ramachandran et al., 2010).

1.2.2. Etapa de proliferación

Una vez desdiferenciada, la glía de Müller comienza a multiplicarse debido a que, con el aumento en la expresión de los factores antes mencionados, se activan vías de señalización involucradas en la proliferación celular como Notch, MAPK y ERK (Das et al., 2006; Jadhav et al., 2006).

Esta etapa se puede asociar también con cambios en la morfología celular, expresión de filamentos intermediarios y proteínas de adhesión que promueven la migración celular ya que, como célula troncal, tiene la habilidad de moverse por el tejido hasta llegar al sitio donde se diferenciará (Nagashima et al., 2013).

1.2.3. Etapa de diferenciación

Posteriormente, las células progenitoras derivadas de la glía de Müller (MGDP), formadas durante las dos etapas anteriores, se diferencian en células de tipo neuronal, es decir, ocurre una transdiferenciación (A. J. Fischer & Reh, 2001; Hitchcock & Raymond, 1992); las nuevas neuronas generadas son capaces de integrarse a las redes neuronales preexistentes y con ello mantener el flujo de información y la función de la retina.

En estudios realizados *in vitro*, se ha observado que las células de Müller provenientes de mamíferos como el ratón y el humano (recolectadas post-mortem), son una excelente fuente de células progenitoras retinianas que tienen la capacidad de diferenciarse hacia neuronas (Giannelli et al., 2011), principalmente hacia fotorreceptores y células amacrinas (Ooto et al., 2004). Sin embargo, en estudios *in vivo* esta capacidad de diferenciación de las células MGDPs se ve disminuida y con ello su potencial neuro-regenerativo (Osakada et al., 2007).

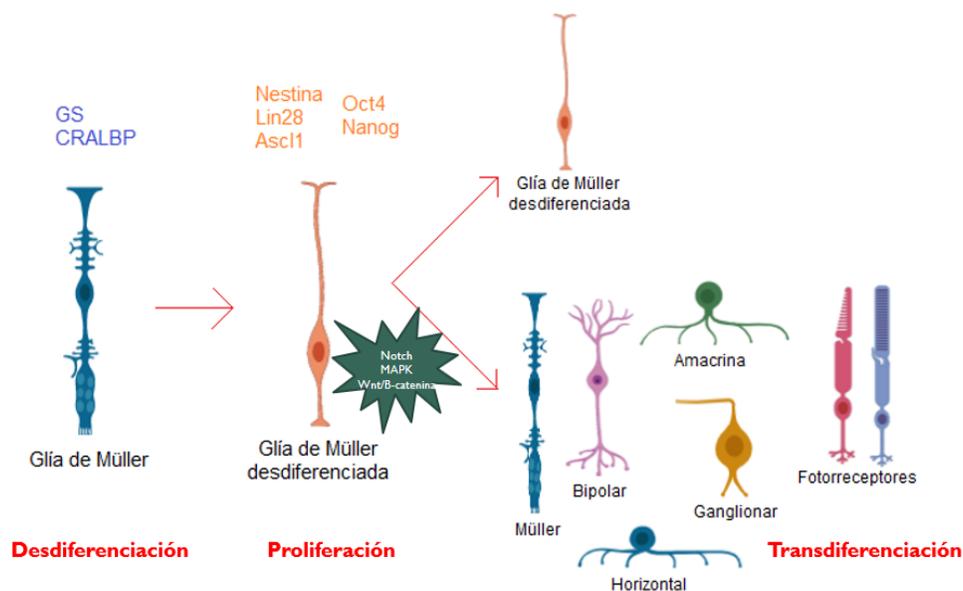


Figura 2. Esquema de las fases que atraviesa la glía de Müller durante un proceso de reprogramación celular, se indican los marcadores que sirven para identificación, así como las principales vías de señalización activadas. Creado en BioRender.

Como respuesta a un daño en retina de mamíferos generalmente se lleva a cabo un proceso conocido como gliosis reactiva (Sardar Pasha et al., 2017) donde las

células de Müller se desdiferencian y proliferan pero no tienen la capacidad de transdiferenciarse eficientemente para llevar a cabo un reemplazo celular. Durante este proceso, las células gliales de la retina como las células de Müller y los astrocitos proliferan y segregan factores tróficos que permiten la remodelación del tejido al formar una especie de cicatriz que sirve para aminorar el daño de manera inmediata (Inman & Horner, 2007).

Durante la regeneración retiniana (en peces) y la gliosis reactiva (en mamíferos) se han observado diferencias significativas en el perfil de metilación de la glía de Müller (Lin et al., 2019; Powell et al., 2013). Este cambio puede influir en la dirección de la respuesta a una lesión en la retina, por lo cual sería una limitante para la regeneración funcional de este tejido en mamíferos, sin embargo, la importancia de este proceso, así como de las enzimas involucradas, no se ha clarificado.

1.3. Metilación del ADN

La metilación del ADN, así como las modificaciones covalentes en las histonas y la expresión de micro ARNs (miRNAs), es un mecanismo de regulación epigenética que se encarga de modificar la expresión de los genes pero sin alterar o cambiar la secuencia de los mismos (Carlberg & Molnár, 2016; Geiman & Robertson, 2002).

Tal fenómeno consiste en la adición de un grupo metilo al carbono 5 de las citosinas, generalmente ubicadas en las denominadas *islas CpG* que son zonas del ADN donde se encuentra una gran cantidad de citosinas unidas a guaninas y que conforman alrededor del 60% de los sitios promotores de los genes (Jeltsch & Jurkowska, 2016; Lyko, 2018). Esta modificación covalente en el ADN promueve el reclutamiento de proteínas de unión a CpG metiladas (MeCP2), que genera una súper condensación de la cromatina y, por ende, limitados puntos de acceso para factores de transcripción hacia el genoma dando como resultado la represión de la expresión de ciertos genes (Fuks et al., 2003).

La adición de los grupos metilo al ADN se lleva a cabo por la acción de enzimas especializadas conocidas como ADN metiltransferasas.

1.3.1. ADN metiltransferasas

Las ADN metiltransferasas son las enzimas encargadas de catalizar la unión de un grupo metilo (-CH₃) (Lyko, 2018), proveniente de una molécula donadora (generalmente S-adenosil-L-metionina), al carbono 5 de las citosinas que conforman el ADN; esta transferencia se caracteriza por la formación de un complejo cuaternario y enlaces covalentes intermediarios (Jeltsch & Jurkowska, 2016).

Son enzimas que se encuentran altamente conservadas en la mayoría de los organismos vivos. Poseen una región reguladora en el extremo N-terminal y una región catalítica en el extremo C-terminal (Lyko, 2018) y varían en número y tipo de acuerdo con el organismo, sin embargo, sus funciones son básicamente las mismas (Ponger & Li, 2005). En el genoma humano se encuentran codificadas cinco tipos de DNMTs: tres con acción catalítica (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b), una con función de coenzima (DNMT3L) y otra que funge como regulador post-transcripcional (DNMT2) (Lyko, 2018).

En vertebrados inferiores, como el pez cebra, se encuentran hasta ocho tipos de DNMTs, algunas de las cuales se pueden agrupar por la manera en la que mimetizan la acción de sus homólogas en los mamíferos: similar a la DNMT3a se encuentran las enzimas *Dnmt6* y *Dnmt8*; y asemejando a la DNMT3b las enzimas *Dnmt3*, *Dnmt4*, *Dnmt5* y *Dnmt7* (T. H. L. Smith et al., 2011).

Las familias de DNMTs generalmente se clasifican por su estructura y función, sin embargo, esta última no es completamente descriptiva ya que estas enzimas pueden empalmar funciones, generalmente como mecanismo compensatorio por la ausencia de alguna de ellas (Feng et al., 2010; Liao et al., 2015).

La DNMT1, a grandes rasgos, se encarga del mantenimiento de la metilación. tiene un dominio para el reconocimiento de la proteína UHRF1 (que se une a regiones hemimetiladas del ADN), lo que le permite anclarse en zonas del genoma donde las citosinas en una hebra del ADN no se encuentren metiladas (Bostick et al., 2007; Lyko, 2018).

Las DNMT3a y DNMT3b se encargan del establecimiento de la metilación *de novo* durante el desarrollo embrionario (Watanabe et al., 2006) así como de la metilación de reprogramación (Gagliardi et al., 2018; Weisenberger et al., 2004) y, en menor medida, del mantenimiento de la metilación (Feng et al., 2010).

Se conoce también que las DNMTs *de novo* intervienen (en diferente magnitud) en el proceso de reprogramación celular (De Pauw et al., 2017; Leoni et al., 2017; Rajavelu et al., 2011), sin embargo, es algo controversial ya que existe evidencia que indica que se puede dispensar de estas enzimas durante el proceso sin afectar el resultado, ya que su contribución no es significativa (Pawlak & Jaenisch, 2011).

1.4. DNMTs en la desdiferenciación de la glía de Müller

Durante la desdiferenciación de la glía de Müller como respuesta a un daño excitotóxico (por sobre-estimulación de receptores de glutamato, principalmente iónicos de tipo NMDA) (Mike O. Karl et al., 2008), en diversos vertebrados, se han observado variaciones en el perfil de expresión de las DNMTs (Lin et al., 2019; Luz-Madriral et al., 2019; Powell et al., 2013; Reyes-Aguirre & Lamas, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la metilación del ADN puede regular la expresión de genes debido a que mantiene a la cromatina en un estado de silenciamiento (Luo et al., 2018). En la respuesta a un daño en retina de peces cebra, es posible observar fluctuaciones en el perfil de expresión de las enzimas involucradas tanto de la metilación (DNMTs) como en la desmetilación del ADN (TET, Gadd45, Apobec2) y, asociado a esto, existe un aumento en la expresión de genes asociados a multipotencia debido a que se pierde, en parte, ese estado de silenciamiento o súper condensación de la cromatina en diversas zonas del genoma (Powell et al., 2013).

En pollos jóvenes es posible observar un fenómeno parecido: durante la reprogramación de células retinianas existe, a tiempos cortos (6 horas), una disminución en la expresión de enzimas involucradas en la metilación del ADN, la cual se revierte con el paso del tiempo hasta la recuperación de la expresión basal (Luz-Madriral et al., 2019).

Por el contrario, en ensayos realizados con ratones, se ha observado que, después de inducir un daño excitotóxico con NMDA, se estimula la expresión de genes asociados a multipotencia y se incrementa la expresión de las DNMTs (Lin et al., 2019; Reyes-Aguirre & Lamas, 2016)

La expresión dinámica de las DNMTs sugiere que se requiere de un ajuste en el metiloma de las células retinianas durante su desdiferenciación y reprogramación. Sin embargo, haciendo un análisis detallado se puede determinar que, en organismos con capacidad regenerativa, la expresión de la enzima DNMT3a se mantiene en niveles bajos o basales constantes, a diferencia de los mamíferos donde se observa un marcado incremento de la misma (Lin et al., 2019; Luz-Madrigal et al., 2019; Powell et al., 2013).

Lo anterior nos hace pensar que, por la disparidad en la expresión de esta enzima en la respuesta a una lesión en la retina de diversos organismos, la DNMT3a podría estar involucrada en que se produzca o no una regeneración funcional del tejido.

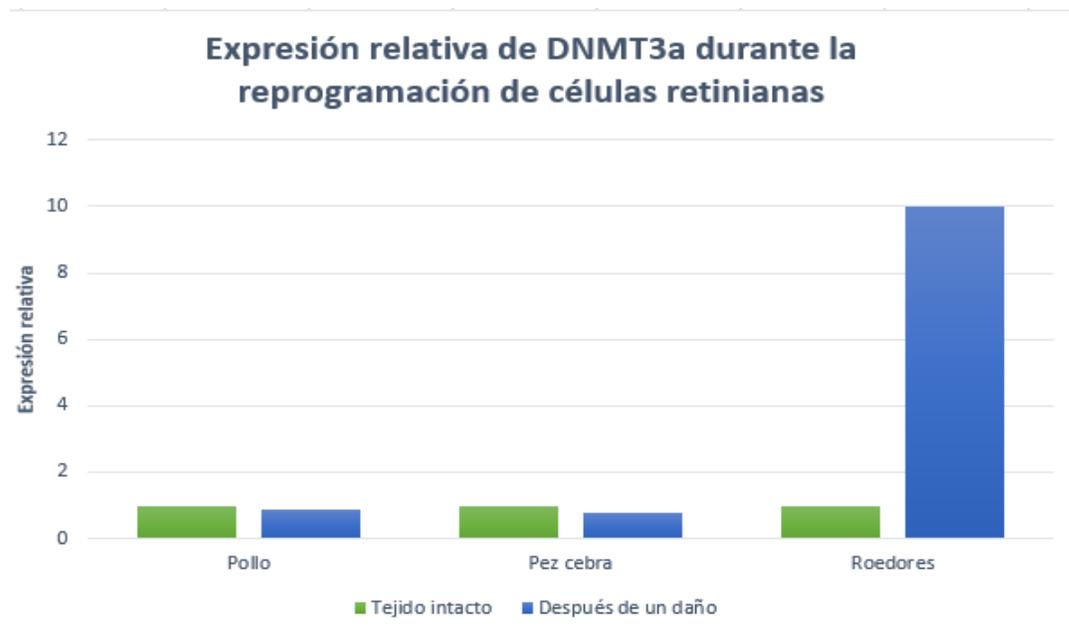


Figura 3. Expresión de DNMT3a durante la desdiferenciación de células retinianas en especies con capacidad regenerativa (pollo y pez cebra) y no regenerativas (roedores) (Lin et al., 2019; Luz-Madrigal et al., 2019; Powell et al., 2013).

Investigando más a fondo este fenómeno, se encontró que al disminuir la cantidad de DNMT3a en células pluripotentes inducidas o en células troncales de tejidos como corazón, sangre y cerebro, existe un aumento en la capacidad proliferativa de las mismas, característica de un estado de desdiferenciación, pero, al mismo tiempo, se fomenta la diferenciación de estas células mediante la regulación negativa de la vía de señalización Wnt (principalmente) (De Pauw et al., 2017; Leoni et al., 2017; Rajavelu et al., 2011; Z. Wu et al., 2012). El rol dual de la ausencia de DNMT3a en células progenitoras fue demostrable mediante la inhibición selectiva de DNMT3a por acción de un ARN de interferencia (siRNA) y/o mediante la transfección del micro ARN (miR-29a), que se une al ARN mensajero de DNMT3a como señal para su degradación, por lo que genera una inhibición a nivel traduccional (De Pauw et al., 2017).

1.5. Inhibición selectiva de DNMTs

Con el apogeo de la epigenética en la última década, las DNMTs han sido objetivo de muchos estudios para, principalmente, determinar su función o implicación en diversas patologías como el cáncer (Pechalrieu et al., 2017).

A lo largo de las investigaciones con DNMTs, se han generado organismos (ratones) genéticamente modificados que expresen una o todas las DNMTs mutadas en un tiempo específico de su desarrollo embrionario. Li y colaboradores en 1992 (E. Li et al., 1992), pioneros en este estudio, observaron que aquellos embriones con deficiencia en la actividad de las enzimas ADN metiltransferasas tenían un elevado índice de mortalidad prenatal. Sin embargo, en cultivos de células troncales embrionarias no visualizaron otro efecto adverso más que la disminución en los niveles de metilación global y un aumento en la capacidad proliferativa de las mismas (E. Li et al., 1992). También se ha observado que la inhibición de DNMT1 en células troncales embrionarias humanas genera un incremento en la muerte celular (Liao et al., 2015), aunque, en líneas celulares no embrionarias, la inhibición de las DNMTs no causa daños que induzcan apoptosis.

En nuestro laboratorio, se han llevado a cabo diversos estudios, con inhibidores farmacológicos de DNMTs (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016; Trejo Groba, 2018),

para entender su papel en el proceso de desdiferenciación de células troncales. Un trabajo reciente enfocado en la retina demuestra que, al disminuir la actividad catalítica de las DNMTs se genera un incremento en la proporción y el tiempo por el cual se expresan genes asociados a multipotencia después de un daño con NMDA (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016), lo que hace que la respuesta sea más parecida a lo que sucede en especies con capacidad regenerativa donde la expresión de genes de multipotencia (como Oct4, Sox2, etc.) se mantiene hasta por seis días después de la lesión (Powell et al., 2013).

Sin embargo, al realizar la inhibición de las tres DNMTs de importancia catalítica y observar la morfología de la retina en modelos *in vivo* de daño retiniano con NMDA, se encontró que, si bien la disminución de la actividad de las DNMTs favorecía la expresión de genes como Lin28 (lo que indica multipotencia), se exacerbaba el daño generado, dando como resultado un incremento en la proporción de muerte celular así como la pérdida de la estructura del tejido (Trejo Groba, 2018).

Por lo tanto, si pretendemos conocer a fondo la función de estas enzimas en el proceso de desdiferenciación de la glía de Müller, será necesario la creación de herramientas o estrategias que permitan su inhibición selectiva y transitoria para con ello aminorar el daño; una propuesta es el uso de la tecnología CRISPR/dCas9.

1.6. Tecnología CRISPR/dCas9

Las Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas o CRISPR (por sus siglas en inglés) y las proteínas asociadas a CRISPR o proteínas Cas, descubiertas en arqueas y bacterias como un tipo de respuesta inmune adaptativa, en conjunto tienen una acción de endonucleasa secuencia específica que, nativamente, permite la eliminación de material genético exógeno, proveniente de bacteriófagos o plásmidos (Garneau et al., 2010; Mojica et al., 2005).

Los sistemas CRISPR/Cas están conformados por tres unidades esenciales:

1. La(s) proteína(s) Cas, con función de endonucleasa y helicasa, encargada(s) de cortar el ADN en ambas cadenas.
2. El ARN asociado a CRISPR (crRNA), que es una secuencia de 24 a 40 pares de bases (pb) homóloga a la secuencia génica de interés, guía a la proteína Cas hacia su sitio de acción, por lo cual también es conocido como ARN guía.
3. El ARN asociado a CRISPR trans-activado (tracrRNA), el cual, por una parte, reconoce y ancla a la proteína Cas y por otra hibrida con un fragmento del crRNA, creando así un ARN de doble cadena (Makarova et al., 2011).

En el 2012, esta tecnología fue optimizada por Doudna y Charpentier (recientemente ganadoras del premio Nobel por este trabajo) para su uso en la ingeniería genética. Es considerada una “tijera molecular” que permite el corte en ambas hebras del ADN en zonas específicas del genoma (Figura 4) (Doudna & Charpentier, 2014).

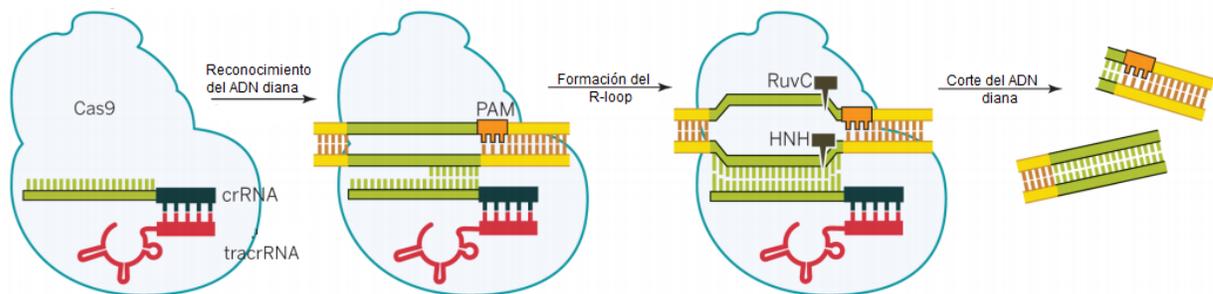


Figura 4. Esquema general de la acción de endonucleasa de los sistemas CRISPR/Cas. Se observa el complejo formado por el crRNA, el tracrRNA y la proteína Cas efectora. PAM: Motivo Adyacente al Protoespaciador (crRNA), RuvC y HNH: dominios catalíticos de la enzima Cas9. Modificado de Doudna, 2014.

Existen tres tipos principales de sistemas CRISPR/Cas, siendo los de tipo II los más utilizados debido a su simplicidad y su eficiencia y se caracterizan por la presencia y acción de la proteína Cas9 (Makarova et al., 2011). Es posible inducir mutaciones en los dominios catalíticos de esta enzima (RuvC y HNH) para generar una endonucleasa deficiente o dCas9 (Hsu et al., 2014) la cual, fusionada con dominios efectores puede llevar a cabo modificaciones epigenéticas (como

metilación y desmetilación) o regular la expresión génica positiva y negativamente, entre otras funciones (Gong et al., 2018).

La proteína dCas9 generalmente fusionada con el efector KRAB (Krüppel-associated box), es empleada para inhibir la expresión de genes a nivel transcripcional (Bellefroid et al., 1991), ya que debido a la naturaleza de los sistemas CRISPR, va a ser capaz de unirse al ADN en un sitio específico (de -50 a 300 pb del sitio de inicio de la transcripción) pero sin cortarlo (Dong et al., 2017). Este complejo va a favorecer el reclutamiento de un conjunto de proteínas represoras modificadoras de la cromatina que, por impedimento estérico, no va permitir la unión de los factores de transcripción ni de la ARN polimerasa tipo II a los sitios promotores de los genes de interés (Figura 5) (Gong et al., 2018; Tian et al., 2017).

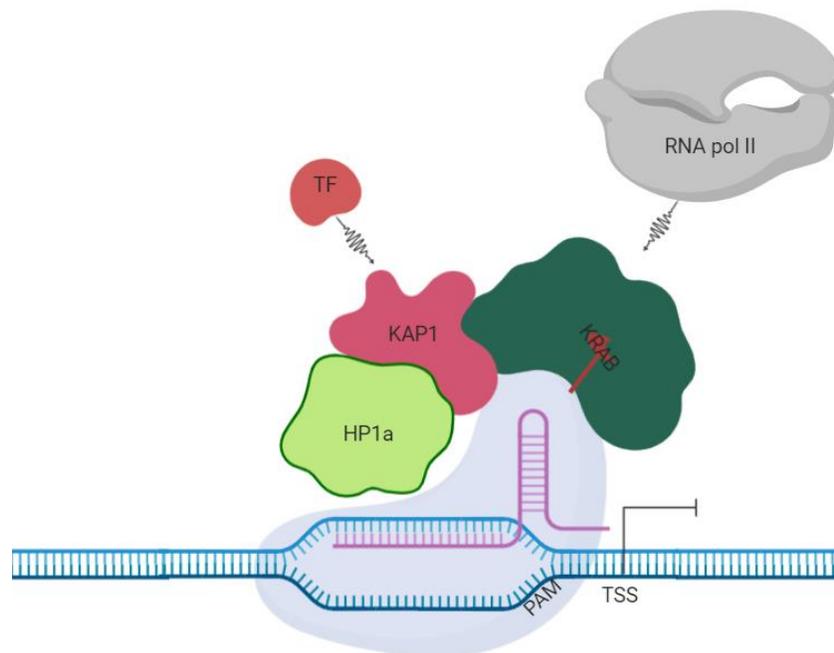


Figura 5. Esquema representativo del sistema CRISPR/dCas9-KRAB y su mecanismo de acción como inhibidor de la expresión génica a nivel transcripcional. PAM: Motivo adyacente al protoespaciador (crRNA), TSS: Sitio de inicio de la transcripción, KRAB: Krüppel-Associated box, KAP1: Proteína 1 asociada a KRAB, HP1a: Proteína 1 de heterocromatina, TF: Factor de transcripción, RNA pol II: ARN polimerasa de tipo II. Creado en BioRender.

Los sistemas CRISPR/dCas9-KRAB son altamente recomendables para lograr la inhibición selectiva de enzimas que comparten dominios catalíticos (como las DNMTs) pero que difieren en el gen que les da origen.

2. Hipótesis

Si se inhibe la expresión génica de DNMT3a en glía de Müller se favorecerá la expresión de genes asociados a multipotencia (Nestina, Lin28 y Ascl1).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar la relación entre la enzima DNMT3a y la expresión de genes asociados a multipotencia durante la desdiferenciación de la glía de Müller.

3.2. Objetivos particulares

1. Diseñar y obtener los plásmidos con el sistema CRISPR/dCas9-KRAB para la inhibición específica de DNMT3a murina.
2. Obtener cultivos celulares de glía de Müller con el plásmido seleccionado para la inhibición de DNMT3a.
3. Identificar cambios en la viabilidad celular de la glía de Müller asociados a la inhibición de DNMT3a.
4. Determinar si la inhibición de DNMT3a promueve la proliferación celular.
5. Identificar cambios en el perfil de expresión de genes asociados a multipotencialidad y de genes involucrados en la metilación del ADN.

4. Materiales y métodos

4.1. Diseño experimental

Tabla 1. Clasificación de los grupos experimentales.

Grupo	Tratamiento	Notas
Control	Ninguno	Medio de cultivo DMEM sin suero
Control de NMDA	Adición de NMDA 100 μ M	Recolección de muestras a 6 h post-tratamiento
Control de transfección	Solamente proceso mecánico de transfección	Electroporación
Control del plásmido	Transfección del plásmido KRAB-Puro	Plásmido pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro
TTO	Transfección del plásmido KRAB-Puro y el sgRNA	Plásmido pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro + sgDNMT3a/U6

4.2. Análisis estadístico

Para los datos que se ajustaron a la normalidad (paramétricos) se utilizó la prueba ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey para determinar diferencias estadísticamente significativas; para los datos no paramétricos se empleó la prueba de Kruskal- Wallis de una vía con pruebas post hoc de Tukey o Student-Newman-Keuls. Se consideró un valor de $P \leq 0.05$ como significativo.

4.3. Diseño del ARN guía para la inhibición de DNMT3a

El diseño del ARN guía se hizo mediante el uso de las herramientas Online que se condensan en la siguiente dirección electrónica <https://zlab.bio/guide-design-resources>. Para ello fue necesario contar con la secuencia del gen de interés (DNMT3a murina) en formato FASTA.

Dentro de la herramienta web seleccionada para el diseño se vertieron diversos datos como la secuencia del gen a inhibir (DNMT3a murina), el tipo de sistema CRISPR/Cas a emplear (CRISPRi), la secuencia PAM (NGG), la longitud esperada del ARN guía (20 pb sin contar el sitio PAM) y las discrepancias permitidas fuera de rango (cero discrepancias), esto para obtener una lista de posibles secuencias objetivo, de las cuales se eligió la que tuviera la mayor eficiencia determinada por el programa.

Posteriormente, teniendo una posible secuencia objetivo que se encontrara entre -200 y +200 pares de bases (pb) del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen DNMT3a murino, se procedió a diseñar, *in silico*, los oligonucleótidos que permitieran la ligación de dicha secuencia en el vector de clonación *pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression*, para ello virtualmente se removió de la secuencia diana el sitio PAM (**3' NGG**) dejando así solamente la secuencia del protoespaciador a la cual, en el extremo **5'**, se le adicionó la secuencia **CACCG**, dando como resultado el oligonucleótido sentido.

Para tener la secuencia del oligonucleótido antisentido, se obtuvo el complemento reverso del protoespaciador y se le adicionó en el extremo **5'** la secuencia **AAAC** y en el extremo **3'** una **C** (Nageshwaran et al., 2018). Teniendo las secuencias de los oligonucleótidos diseñadas, se mandaron sintetizar a la empresa Eurofins Genomics.

Tabla 2. Secuencia diana y oligonucleótidos diseñados para la inhibición de DNMT3a murina.

Nombre	Secuencia
Secuencia diana	CAAGTCCGTACAATGCCGCG
Oligonucleótido sentido	caccg CAAGTCCGTACAATGCCGCG
Oligonucleótido antisentido	aaac CGCGGCATTGTACGGACTTGc



Figura 6. Sitio de hibridación del sgRNA en el gen DNMT3a (arriba) y su localización en el transcrito del gen (abajo).

4.4. Ligación del ARN guía en el vector de clonación

Se realizó la ligación del ARN guía específico para la inhibición a nivel transcripcional del gen DNMT3a murino en el vector de clonación pAC156-dual-dCas9VP160-sgExpression.

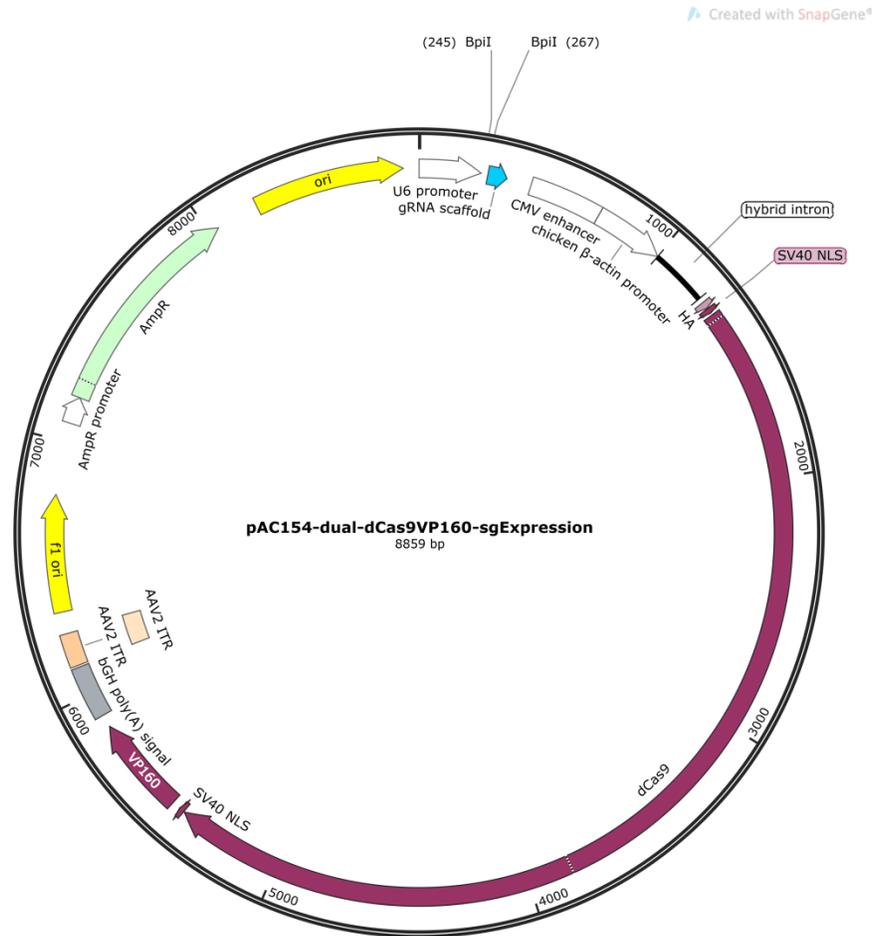


Figura 7. Vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression. Vector para la ligación del ARN guía.

Se realizó primero la apertura del vector mediante una digestión enzimática con la enzima BpiI (BbsI) siguiendo las instrucciones del proveedor (Thermo Scientific®).

Posteriormente se alinearon los oligonucleótidos de la siguiente manera: en un microtubo de 0.2 mL se mezclaron 10 μ L del oligonucleótido sentido (100 μ M), 10 μ L del oligonucleótido antisentido (100 μ M) y 80 μ L de agua libre de nucleasas, el tubo de reacción fue llevado al termociclador para mantenerse a 37°C por 30 minutos, a 95°C por 5 minutos y posteriormente se disminuyó la temperatura a 25 °C a intervalos de 5°C por minuto.

Para la ligación del sgRNA alineado en el vector de clonación digerido se utilizó la enzima T4 ADN ligasa de Jena Bioscience® siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor con una relación 5:1 entre el inserto y el vector.

4.5. Transformación de bacterias competentes y comprobación de transfección

Se realizó una siembra de bacterias *Escherichia coli* de la cepa JM109, para inducir su competencia, en 5 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm durante 9 horas. Se tomó una alícuota de 200 µL de la suspensión bacteriana y se transfirió a un tubo para centrifuga con 20 mL de medio LB estéril, se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por un periodo de 1 a 2 horas. Posteriormente se centrifugó la suspensión a 7000 x g por 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 10 mL de amortiguador TFB1 y se dejó reposar por 20 minutos. Después se centrifugó la suspensión a 14000 x g por 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 2 mL de amortiguador TFB2 y se incubó en hielo durante 20 minutos. Las suspensiones bacterianas se almacenaron a -70°C, en alícuotas de 50 µL, hasta su uso.

Se transfirieron 5 µL de la reacción de ligación del plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a a un microtubo de 1.6 mL y se agregaron 50 µL de suspensión de bacterias *E. coli* JM109 competentes, se mezclaron suavemente y se incubaron en hielo por 20 minutos. Posteriormente se transfirió el tubo a un baño maría a 42°C durante 45 segundos y después se incubó en hielo por 2 minutos. Se agregaron 300 µL de medio de cultivo LB sin ampicilina, se mezcló y se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 1.5 horas. Con un asa calibrada se sembraron 100 µL de bacterias transformadas en agar Luria-Bertani (LB) con ampicilina (0.1 mg/mL) y se incubaron a 37°C por 16 a 24 horas.

Asimismo, se realizó también la transformación de bacterias competentes con el plásmido pLV-hU6-sgRNA-hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

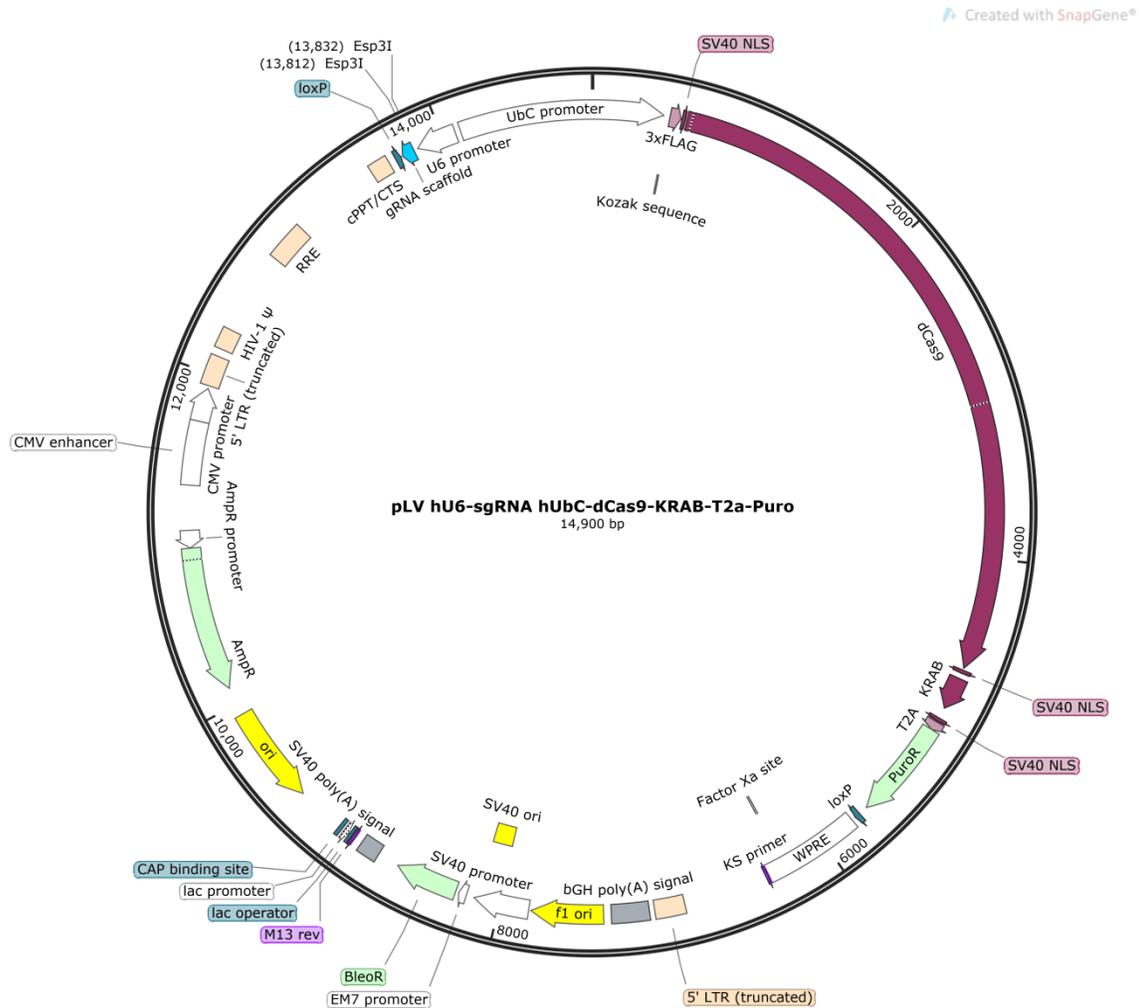


Figura 8. Plásmido pLV-hU6-sgRNA-hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro. Vector que contiene la información para generar la proteína dCas9-KRAB para inhibición.

Para verificar la transformación de las bacterias competentes se realizó la extracción de los plásmidos mediante lisis alcalina. Para ello se inocularon 25 mL medio LB/amp con una colonia aislada de bacterias transformadas y se incubaron a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 16 a 24 horas, posteriormente se utilizó el QIAGEN® Plasmid Midi Kit para obtener los plásmidos, se siguieron las instrucciones del proveedor.

Se cuantificó la concentración de ADN plasmídico obtenido mediante espectrofotometría UV con el equipo NanoDrop 2000 de Thermo Scientific®.

Se diseñaron oligonucleótidos para realizar PCR en punto final a los plásmidos obtenidos y con ello verificar su identidad. Las secuencias y los parámetros de reacción y ciclado se muestran a continuación.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos requeridos para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) de los plásmidos *pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a* y *pLV-hU6-sgRNA-hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro*.

Secuencia	
VP16 F	GCGCACTAGTATTATGATTCCTTCAT
VP16 R	GCGCCGTACCTCTAGAGCCATTTG
KRAB-Puro F	AGATCTGGAGCCGACACGGG
KRAB-Puro R	AGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTA

Tabla 4. Parámetros de reacción para PCR.

Componente	Concentración en la reacción	Volumen requerido por reacción (µL)
PCR Master Mix (2X)	1X	5
Oligonucleótido sentido (10 µM)	0.5 µM	0.5
Oligonucleótido antisentido (10 µM)	0.5 µM	0.5
Agua libre de nucleasas	-	3
ADN (1 µg/µL)	0.1 µg/µL	1

Tabla 5. Condiciones de cambio de temperatura para PCR en punto final.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	3 min
2	95°C	35 s
3	65°C	65 s
4	72°C	40 s
Repetir al paso 2, 35 veces		
5	72°C	5 min
6	20°C	-

4.6. Cultivos primarios de glía de Müller

Se disecaron los ojos de cuatro ratones de ocho a doce días de nacidos y se incubaron toda la noche en medio modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, en oscuridad, a temperatura ambiente. Se depositaron los ojos en un tubo para centrifuga de 15 mL y se agregó medio DMEM suplementado con tripsina al 1% y colagenasa a una concentración de 70 IU/mL y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se separaron cuidadosamente las retinas de los demás tejidos oculares y se disociaron por trituración. Se transfirió la suspensión de retinas a un frasco de cultivo de 75 cm² con medio DMEM suplementado con SFB al 4% y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ toda la noche. Se cambió el medio de cultivo a las 16 - 24 horas. Después de 3 a 4 días de incubación se agitó vigorosamente el cultivo para descartar células no adherentes. Se incubó el cultivo de glía de Müller en DMEM con SFB al 10% a 37°C y 5% de CO₂ hasta que se detectó un 80 – 90% de confluencia. Se continuó la expansión del cultivo hasta tener 1 millón de células para cada tratamiento.

4.7. Inducción de la desdiferenciación de la glía de Müller con NMDA

En placas de 6 pozos se sembraron 1×10^4 células de Müller por pozo, se incubaron en medio DMEM/SFB 10% a 37°C y 5% de CO_2 hasta obtener un cultivo con 80 – 90% de confluencia. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS 1X a temperatura ambiente por 5 minutos cada uno. Se prepararon seis alícuotas de 1.5 mL de medio de cultivo suplementado con NMDA $100 \mu\text{M}$, se adicionó una alícuota del medio con NMDA a cada pozo de la placa la cual se incubó 6 horas a 37°C y 5% de CO_2 y posteriormente se realizó la toma de muestras para los ensayos subsecuentes.

4.8. Electroporación de cultivos de glía de Müller

Se prepararon cultivos de glía de Müller 4 días previos a la transfección para obtener 1×10^6 células por tratamiento (5×10^6 células en total), los cultivos celulares fueron tripsinizados para obtener una suspensión de células, las células recolectadas se depositaron en un tubo para centrifuga de 15 mL y se centrifugaron a $5600 \times g$ por 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de medio DMEM sin suero y sin antibiótico/antimicótico. Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer para después ajustar la concentración de las células a $1.1 \times 10^4 \text{ cel}/\mu\text{L}$.

Por otra parte, se realizó la dilución de ADN plasmídico a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se tomaron $90 \mu\text{L}$ de la suspensión celular y se transfirieron a una celda para electroporación donde se mezclaron con $10 \mu\text{L}$ de ADN plasmídico.

Se insertó la celda en el electroporador y se ejecutó el programa mostrado en la tabla 6. Una vez finalizado, se adicionaron $900 \mu\text{L}$ de DMEM sin suero a la celda para recolectar todas las células las cuales se transfirieron a placas de 6 pozos y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Después de este tiempo, se lavaron las células con PBS 1X a temperatura ambiente por 5 minutos y posteriormente se reemplazó por medio DMEM/SFB 10%, se dejaron las placas en incubación con los mismos parámetros por 24 horas más, tiempo en el cuál se adicionó a cada pozo puromicina a una concentración de $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ y se continuó la

incubación por 24 horas más. Se realizó la toma de muestras para su posterior análisis.

Tabla 6. Programa de electroporación para glía de Müller.

Pulso poroso					
V	Longitud (ms)	Intervalo (ms)	No	D V (%)	Polaridad
275	0.5	50	2	10	+
Pulso de transferencia					
V	Longitud (ms)	Intervalo (ms)	No	D Rate (%)	Polaridad
20	50	50	5	40	+/-

4.9. Extracción de ARN total, RT-PCR y qPCR.

Se recolectaron las células de cada tratamiento y se realizó el siguiente procedimiento con cada muestra: se centrifugaron a 2800 x g por 2 minutos y el botón celular se resuspendió en 1 mL de DMEM/SFB 10%, se transfirió a un microtubo de 1.6 mL una alícuota de 500 µL de la suspensión anterior y se centrifugó nuevamente, se resuspendió el botón celular en 300 µL de TRIzol® Reagent y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 1050 x g por 5 min, se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1.6 mL limpio y se adicionaron 200 µL de cloroformo frío, se agitó la mezcla en vórtex por 15 segundos, se incubó 15 minutos a 4°C y se centrifugó a 18000 x g por 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa, se adicionó un volumen de isopropanol frío y se incubó a -20°C por 15 minutos y a -70°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 18000 x g por 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se adicionó cuidadosamente al botón formado 500 µL de etanol al 75%. Se centrifugó a 18000 x g por 5 minutos a 4°C, se retiró el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente por inversión del tubo sobre papel absorbente. Se

resuspendió el botón en 20 μL de *RNAsecure™ Resuspension Solution*. Se determinó la concentración de ARN por espectrofotometría. Se realizó la reacción de retrotranscripción con el *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* de ThermoScientific® siguiendo el protocolo del proveedor.

Una vez obtenido el cDNA, se procedió a evaluar la expresión de los genes DNMT3a, Lin28, Ascl1, Nestina y GAPDH mediante PCR en tiempo real (qPCR) con SYBR-Green, para ello en microtubos de 0.2 mL (un tubo por tratamiento) se mezclaron los componentes enlistados en la tabla 7 y los oligonucleótidos que se presentan en la tabla 8, posteriormente se ejecutó el programa de la tabla 9 en el termociclador para qPCR *PikoReal 96* de ThermoScientific®. Se calculó la expresión relativa de cada gen mediante el método de $\Delta\Delta\text{CT}$ tomando como referencia la expresión de GAPDH.

Tabla 7. Componentes para llevar a cabo qPCR.

Componente	Concentración en la reacción	Volumen requerido por reacción (μL)
SYBR-Green Master Mix (2X)	1X	5
Oligonucleótido sentido (10 μM)	0.5 μM	0.5
Oligonucleótido antisentido (10 μM)	0.5 μM	0.5
Agua libre de nucleasas	-	3
ADN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para qPCR

	Secuencia	Tm
DNMT3a F	GCCGAATTGTGTCTTGGTGGATGACA	63°C
DNMT3a R	CCTGGTGAATGCACTGCAGAAGGA	
Lin28 F	GGTCTGGAATCCATCCGTGTCA	60°C
Lin28 R	TCCTTGGCATGATGGTCTAGCC	
Ascl1 F	GCAACCGGGTCAAGTTGGT	60°C
Ascl1 R	GTCGTTGGAGTAGTTGGGGG	
Nestina F	AGGAGAAGCAGGGTCTACAGAG	60°C
Nestina R	AGTTCTCAGCCTCCAGCAGAGT	
GAPDH F	ACTGGCATGGCCTTCCGTGTTCTTA	63°C
GAPDH R	TCAGTGTAGCCCAAGATGCCCTTC	

Tabla 9. Condiciones de ciclado para qPCR.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	95°C	10 min
2	95°C	15 s
3	65°C	30 s
4	72°C	30 s
Repetir al paso 2, 40 veces		
5	72°C	2 min
6	20°C	-

4.10. Conteo y viabilidad celular

Después de las 6 o 72 horas de tratamiento, se recolectaron las células de cada grupo y se realizó el siguiente procedimiento con cada muestra: se centrifugaron a 1200 x g por 2 minutos y el botón celular se resuspendió en 1 mL de DMEM/SFB 10%, se transfirió a un microtubo de 1.6 mL una alícuota de 250 μ L de la suspensión anterior y se centrifugó nuevamente, se ajustó la concentración a 1×10^6 cel/mL, se tomaron 50 μ L de la suspensión celular y se mezclaron con 450 μ L de *Muse™ Count and Viability Reagent*, se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, posteriormente se insertó el microtubo en el citómetro de flujo *Muse™* y se realizó la adquisición de datos como lo indica el fabricante. Los datos se normalizaron con el conteo obtenido del grupo control.

4.11. Determinación de células en fase S del ciclo celular

Después de las 6 o 72 horas de tratamiento, se recolectaron las células de cada grupo y se realizó el siguiente procedimiento con cada muestra: se centrifugaron a 1200 x g por 2 minutos y el botón celular se resuspendió en 1 mL de DMEM/SFB 10%, se transfirió a un microtubo de 1.6 mL una alícuota de 250 μ L de la suspensión anterior y se centrifugó nuevamente, se ajustó la concentración a 1×10^6 cel/mL, posteriormente se centrifugó la suspensión celular a 11200 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de PBS 1X, se centrifugó nuevamente y el botón celular se resuspendió en 50 μ L de PBS 1X, se adicionó gota a gota la suspensión anterior en 1 mL de etanol frío al 70% con agitación constante para fijar las células. Se incubaron las muestras a -20°C por 3.5 horas. Se tomó una alícuota de 200 μ L de células fijadas y se transfirió a un microtubo de 1.6 mL, se centrifugó a 11200 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió el botón celular en 250 μ L de PBS 1X y se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 200 μ L de *Muse™ Cell Cycle Reagent*, se incubó la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, posteriormente se insertó el microtubo en el citómetro de flujo *Muse™* y se realizó la adquisición de datos como lo indica el fabricante.

5. Resultados

5.1. Diseño y obtención del plásmido para la inhibición de DNMT3a murina

Se realizó la ligación del ARN guía para DNMT3a (sgDNMT3a) en el vector de clonación pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression con lo que se obtuvo el plásmido pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a. Esta construcción se insertó en bacterias competentes para obtener un mayor número de copias del mismo, estas se sembraron en placas de agar LB/amp para realizar la selección positiva de las bacterias transformadas, posteriormente se extrajo, mediante lisis alcalina (MidiPrep), el plásmido y se comprobó su identidad por PCR. Como resultado, después de la electroforesis de los productos de PCR se obtuvo el patrón en gel de agarosa al 1% de la figura 9, donde se observan tres bandas, la banda mostrada en el primer carril corresponde al fragmento del plásmido comprendido entre los sitios de restricción KpnI y SpeI, la banda del segundo carril corresponde al fragmento comprendido por el sitio de restricción KpnI y el sitio de ligación del sgRNA y, la banda del tercer carril, al fragmento comprendido por el sitio de ligación del sgRNA y el sitio de restricción SpeI

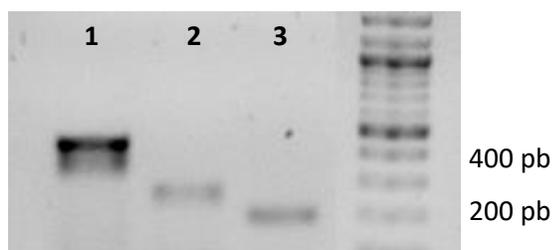


Figura 9. PCR punto final del vector pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a replicado en bacterias de la cepa *E. coli* JM109, en el primer carril se observa una banda que indica la presencia del plásmido y en los carriles 2 y 3, la ligación del sgRNA.

Para verificar que la secuencia del sgDNMT3a se insertó en el lugar correcto del vector, se mandó secuenciar el fragmento del mismo comprendido por los sitios de restricción SpeI y KpnI, con lo que se obtuvo el siguiente electroferograma (figura 10), donde se observa que, la secuencia del sgDNMT3a es la diseñada con

anterioridad y que su ligación se llevó a cabo en la región correcta, delimitada por el sitio de restricción Bpil.

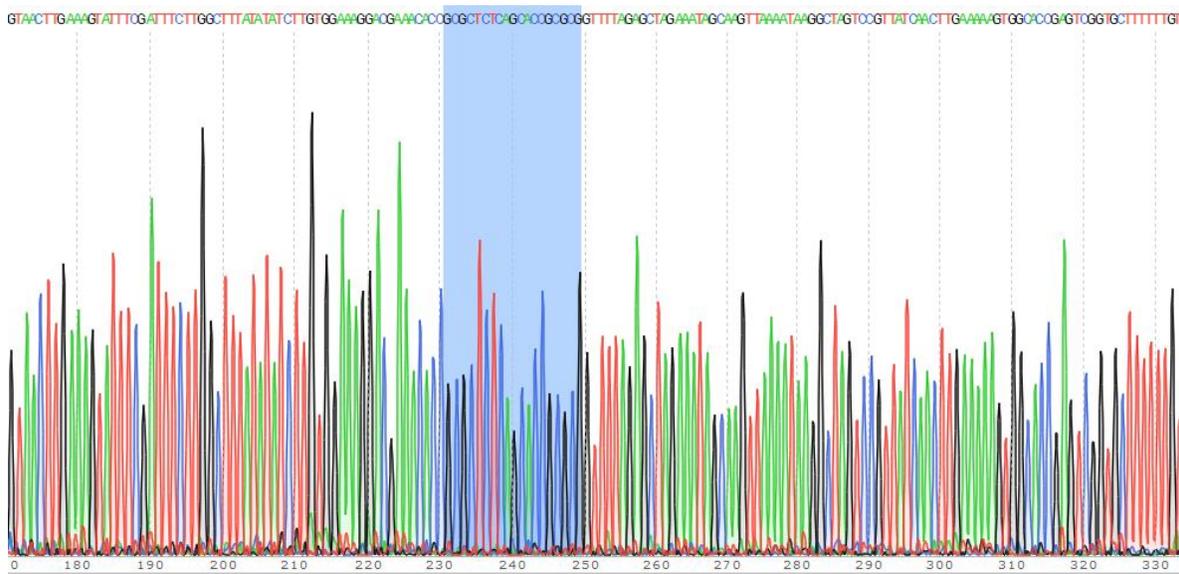


Figura 10. Fragmento del electroferograma correspondiente a la secuenciación de la región SpeI-KpnI del vector de clonación de sgDNMT3a. Se resalta en azul celeste la parte correspondiente al ARN guía para DNMT3a.

Asimismo, se comprobó que las bacterias transformadas con el vector pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro efectivamente tuvieron el plásmido deseado. Se corroboró mediante una reacción de PCR, de la cual se esperaba una banda de aproximadamente 400 pares de bases, como resultado de la comprobación de tres colonias bacterianas distintas, se obtuvo el siguiente gel de agarosa al 1%.



Figura 11. PCR punto final del vector pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro replicado en bacterias de la cepa *E. coli* JM109, se muestra la comprobación de tres colonias bacterianas distintas.

La visualización de las bandas esperadas nos indica que los plásmidos obtenidos son pAC154-dual-dCas9VP160-sgDNMT3a y pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro respectivamente.

5.2. Transfección de glía de Müller

Se realizó la electroporación de células de Müller para introducir en ellas las construcciones necesarias para crear un sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición de DNMT3a. La evaluación morfológica de los cultivos por microscopía permitió identificar cambios que no son atribuibles al proceso de electroporación (Figura 12). Observamos que en los cultivos control y NMDA, las células de Müller presentan, además de un alto porcentaje de confluencia (80 – 90%), la morfología estrellada característica.

Por otra parte, en el cultivo electroporado y en aquel transfectado solamente con el plásmido que genera la proteína dCas9-KRAB (pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro), se distingue un marcado decremento en la confluencia celular sin que esto afecte la morfología radial de las células de Müller.

Sin embargo, en el cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9-KRAB completo para la inhibición de DNMT3a se identifica tanto una disminución en la confluencia celular como un cambio en la morfología de las células, tornándose fusiformes.

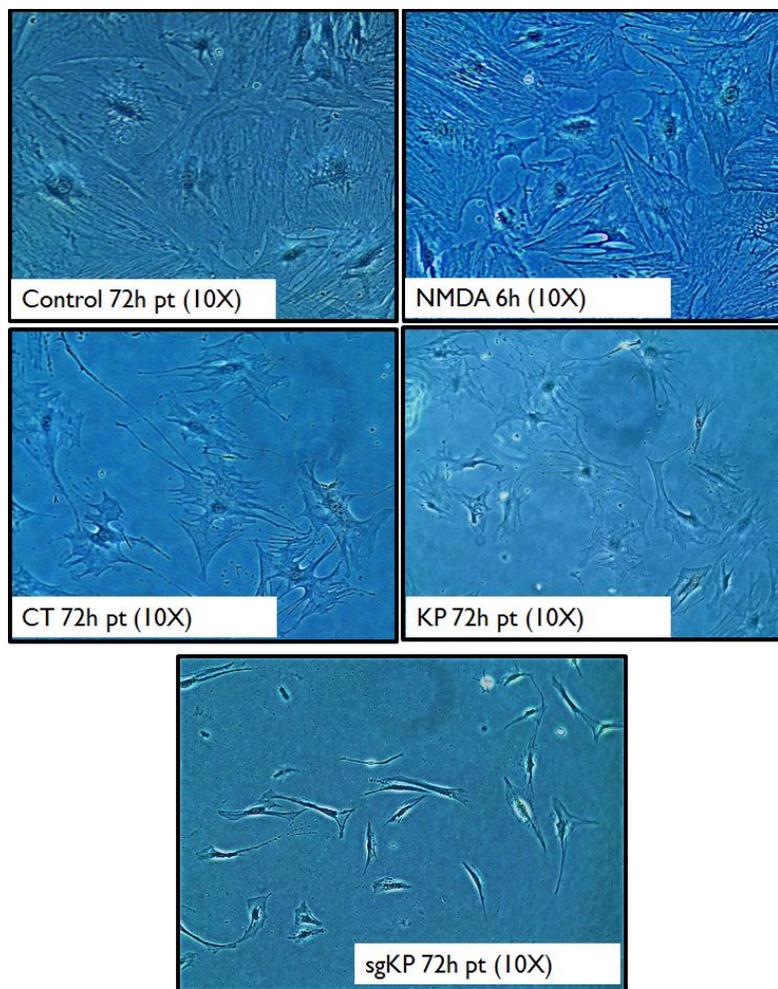


Figura 12. Microfotografías de cultivos de glía de Müller en diferentes condiciones. Control 72h: Cultivo sin tratamiento; NMDA 6h: Cultivo tratado con NMDA por 6h; CT 72h: Control de transfección, cultivo solamente electroporado; KP 72h: Cultivo transfectado con el plásmido pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro; sgKP 72h: Cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9 completo para la inhibición de DNMT3a.

Así mismo, se determinó la expresión de DNMT3a en cada uno de los grupos experimentales para verificar que el sistema CRISPR/dCas9 diseñado, mediante los parámetros establecidos para la electroporación, se transfecte correctamente a células de Müller, la información de dicho experimento se muestra en la siguiente gráfica (figura 13).

Nuestras observaciones demuestran que la transfección del plásmido con el sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición de DNMT3a (sgKP), disminuye en un 90% la expresión relativa de este gen en células de Müller.

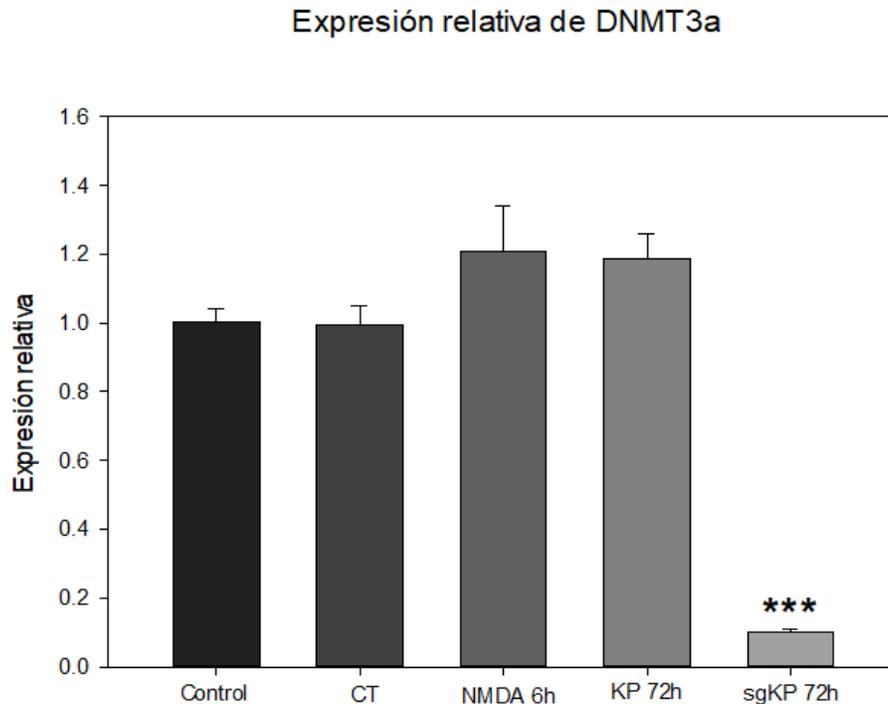


Figura 13. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión relativa de DNMT3a con respecto a GAPDH en células de Müller. Control: Cultivo sin tratamiento; NMDA 6h: Cultivo tratado con NMDA por 6h; CT: Control de transfección, cultivo solamente electroporado; KP 72h: Cultivo transfectado con el plásmido pLV hU6-sgRNA hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro; sgKP 72h: Cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9 completo para la inhibición de DNMT3a. *** Indica diferencia significativa en comparación con los demás grupos con $P \leq 0.001$.

5.3. Viabilidad celular

Se cuantificó, mediante citometría de flujo, la proporción de células viables a las 72 horas post-tratamiento (a excepción del grupo NMDA donde la cuantificación se realizó a las 6 horas después del estímulo). En concordancia con la literatura observamos que, en aquellos grupos en los que se llevó a cabo una electroporación, la viabilidad celular disminuyó significativamente en comparación con los grupos que no recibieron los pulsos eléctricos (Control, NMDA).

Los resultados obtenidos de los grupos electroporados (CT, KP y sgKP) demostraron que la inhibición de DNMT3a induce un aumento del 7.88% en la proporción de células viables en comparación con los grupos controles de electroporación (CT y KP 72h), como se puede observar en la figura 14.

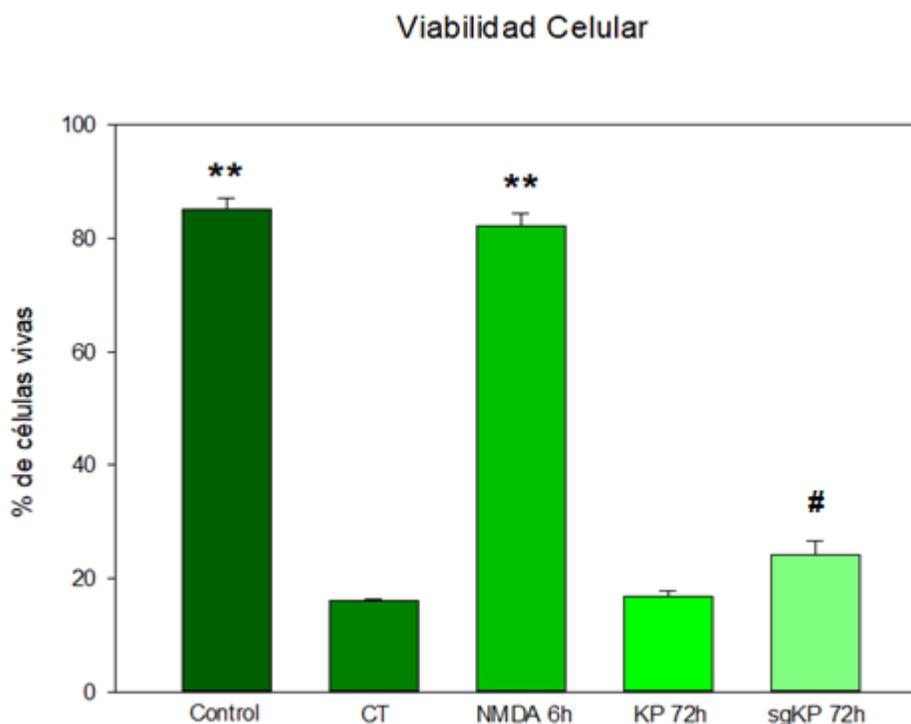


Figura 14. Determinación del porcentaje de células vivas de cada grupo experimental a las 6 o 72 horas después del tratamiento. Valores obtenidos por citometría de flujo. Control: Cultivo sin tratamiento; NMDA 6h: Cultivo tratado con NMDA por 6h; CT: Control de transfección, cultivo solamente electroporado; KP 72h: Cultivo transfectado con el plásmido pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro; sgKP 72h: Cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9 completo para la inhibición de DNMT3a; **: Indica diferencias significativas en comparación con los grupos electroporados; #: Indica diferencia entre los grupos electroporados. Prueba de ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey con $P \leq 0.05$.

5.4. Análisis de proliferación celular

Se realizó el análisis de la proliferación celular de los cultivos tratados, a las 6 o 72 horas después de los tratamientos, por citometría de flujo con ayuda de un agente intercalante del ADN (yoduro de propidio), el cual al ser excitado a una longitud de onda de 493 nm – 535 nm emite una fluorescencia que es directamente

proporcional a la cantidad de ADN presente en las células. Como resultado, el equipo indica, mediante un histograma, la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular dependiendo de la cantidad de ADN contenido en cada célula, siendo de importancia para este proyecto las de fase S, ya que las células se encuentran activamente sintetizando o replicando su ADN para llevar a cabo la mitosis, es decir, proliferantes.

Los resultados obtenidos demuestran que la inhibición de DNMT3a induce un aumento del número de células proliferantes (figura 15) que incluso es mayor que el aumento en la proliferación inducido por el tratamiento con NMDA.

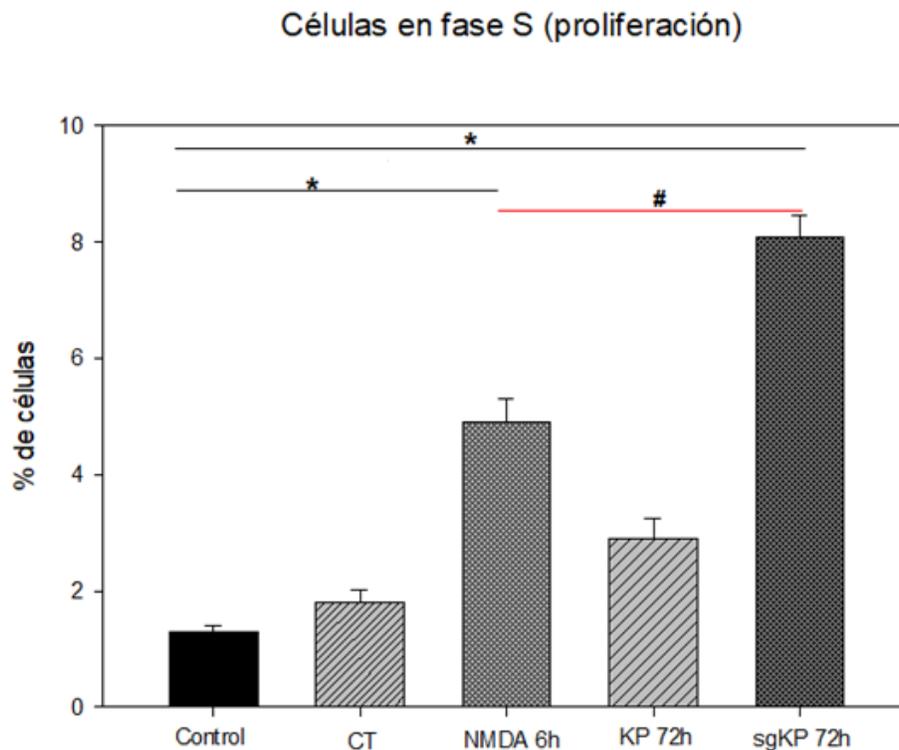


Figura 15. Determinación del porcentaje de células de Müller proliferantes de cada grupo experimental a las 6 o 72 horas después del tratamiento. Valores obtenidos por citometría de flujo. Control: Cultivo sin tratamiento; NMDA 6h: Cultivo tratado con NMDA por 6h; CT: Control de transfección, cultivo solamente electroporado; KP 72h: Cultivo transfectado con el plásmido pLV hU6-sgRNA hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro; sgKP 72h: Cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9 completo para la inhibición de DNMT3a; * Indica una $P \leq 0.001$; # Indica una $P \leq 0.05$. Datos analizados mediante ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tuckey.

5.5. Análisis de expresión génica

Con el fin de determinar si la inhibición de DNMT3a está involucrada en el proceso de desdiferenciación de la glía de Müller cuantificamos, mediante qPCR, la expresión de genes característicos de un fenotipo “tipo célula troncal neural” (Ascl1, Lin28 y Nestina) en los grupos experimentales, en las figuras 16, 17 y 18 se muestran los resultados obtenidos en expresión relativa con relación a la expresión del gen constitutivo GAPDH, calculada con el método de $\Delta\Delta C_t$ y en la figura 19, el perfil de expresión obtenido mediante PCR punto final.

Se observó que, asociado a la inhibición de DNMT3a, existe un aumento en la expresión de genes asociados a células progenitoras neurales. En el caso de Ascl1 observamos un aumento de 34 veces la expresión en comparación con el grupo control, para Lin28 de 25 veces la expresión del grupo control y para Nestina determinamos un aumento de 4 veces la expresión observada en el grupo control.

Estos aumentos pueden ser comparables a su vez con la expresión de genes asociados a pluripotencia obtenida en el grupo NMDA, nuestro control positivo a desdiferenciación, por lo tanto, esto implica que la inhibición de DNMT3a, a grandes rasgos, induce la desdiferenciación de la glía de Müller.

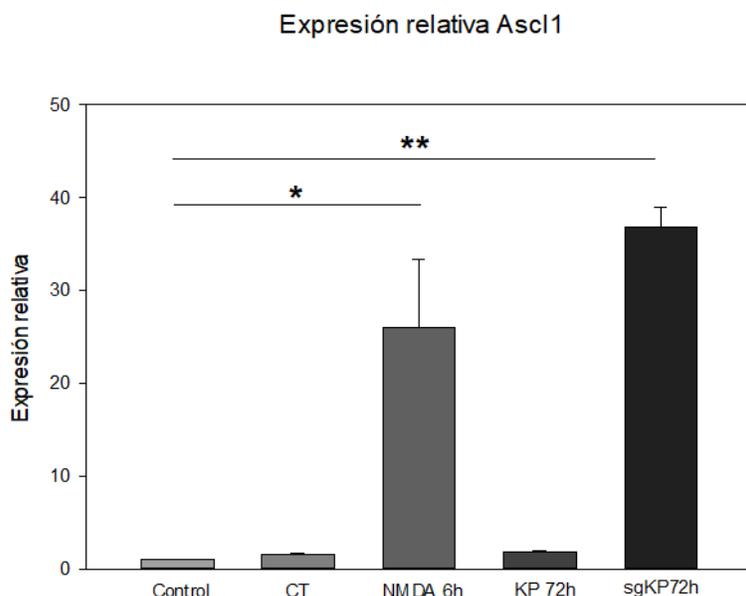


Figura 16. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión de Ascl1 respecto a GAPDH en células de Müller. Control: Cultivo sin tratamiento; NMDA 6h: Cultivo tratado con NMDA por 6h; CT: Control de transfección, cultivo solamente electroporado; KP 72h: Cultivo transfectado con el plásmido pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro; sgKP 72h: Cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9 completo para la inhibición de DNMT3a. $P \leq 0.001$.

Expresión relativa Lin28

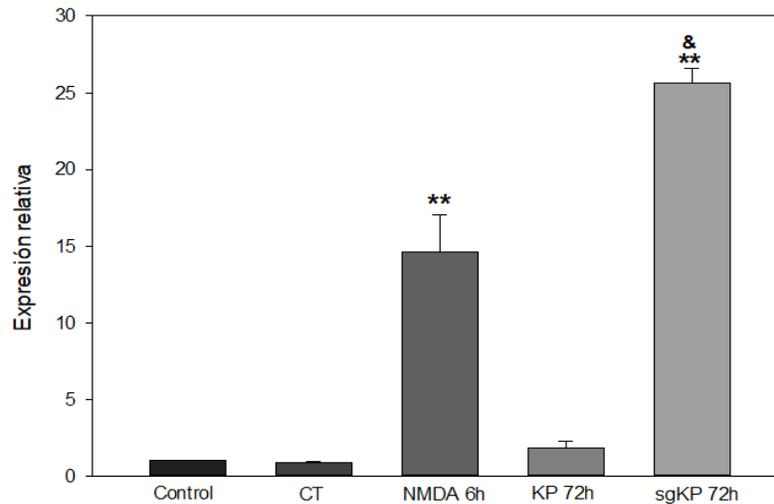


Figura 17. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión de Lin28 respecto a GAPDH en células de Müller. Control: Cultivo sin tratamiento; NMDA 6h: Cultivo tratado con NMDA por 6h; CT: Control de transfección, cultivo solamente electroporado; KP 72h: Cultivo transfectado con el plásmido pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro; sgKP 72h: Cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9 completo para la inhibición de DNMT3a. ** Indica diferencia significativa en comparación con los demás grupos con $P \leq 0.001$. & Indica diferencia significativa contra el grupo NMDA con $P \leq 0.05$

Expresión relativa Nestina

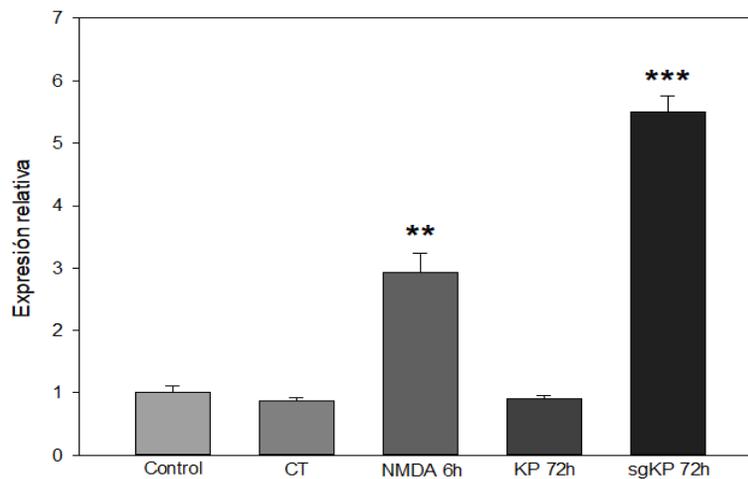


Figura 18. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR) de la expresión de Nestina respecto a GAPDH en células de Müller. Control: Cultivo sin tratamiento; NMDA 6h: Cultivo tratado con NMDA por 6h; CT: Control de transfección, cultivo solamente electroporado; KP 72h: Cultivo transfectado con el plásmido pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro; sgKP 72h: Cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9 completo para la inhibición de DNMT3a. ** Indica diferencia significativa en comparación con los demás grupos con $P \leq 0.05$. *** Indica diferencia significativa en comparación con los demás grupos con $P \leq 0.001$.

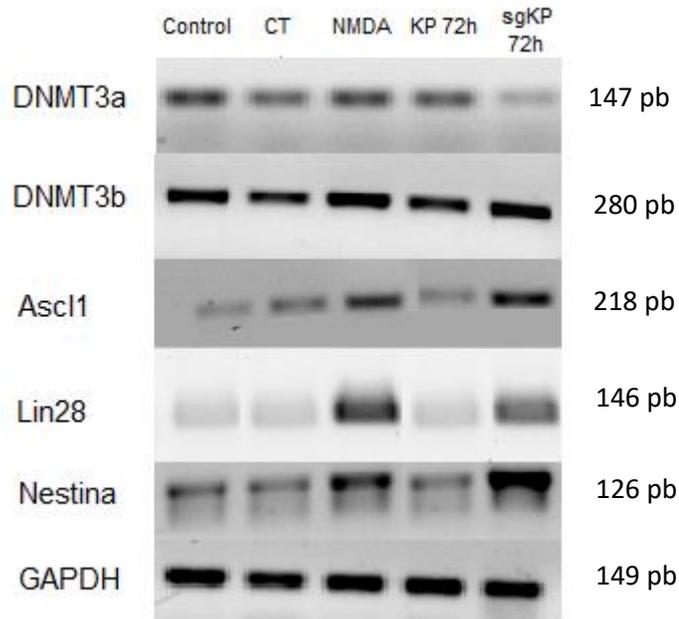


Figura 19. Perfil de expresión de genes involucrados en la metilación del ADN (DNMT3a y DNMT3b) y genes asociados a pluripotencia (Ascl1, Lin28 y Nestina) en células de Müller. Control: Cultivo sin tratamiento; NMDA 6h: Cultivo tratado con NMDA por 6h; CT: Control de transfección, cultivo solamente electroporado; KP 72h: Cultivo transfectado con el plásmido pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro; sgKP 72h: Cultivo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9 completo para la inhibición de DNMT3a.

6. Discusión

La regulación de la expresión génica mediante procesos epigenéticos es fundamental para el establecimiento de líneas celulares específicas durante la formación de un organismo (Luo et al., 2018; Seritrakul & Gross, 2019). Después de muchos años de estudio y con base en el trabajo de diversos grupos de investigación, se ha determinado que las DNMTs tienen un papel muy importante en los procesos relacionados con el desarrollo embrionario, así como en situaciones patológicas e inclusive durante la reprogramación celular (Asmar et al., 2015; Epsztejn-Litman et al., 2008; Jorstad et al., 2017; C. Li et al., 2018; Suzuki & Bird, 2008).

Existe evidencia que señala que las DNMTs con actividad catalítica muestran un patrón específico de expresión que depende de la etapa del desarrollo en la que se encuentre el organismo al que pertenecen (Nasonkin et al., 2011). Es to revela una posible especificidad funcional para las diferentes DNMTs y sugiere que

podrían ser aplicables de forma diferencial para terapias génicas que impliquen el uso de células troncales, reprogramación celular o la inducción de un fenotipo tipo célula troncal en células diferenciadas (Brueckner et al., 2005; Pasha et al., 2011). Por ejemplo, la enzima DNMT3a, una de las metiltransferasas *de novo*, se encarga del establecimiento de los patrones de metilación y, en menor medida, del mantenimiento de la metilación a lo largo de la vida del organismo (Okano et al., 1998); además está involucrada en la metilación de reprogramación (Chanda et al., 2014; Powell et al., 2013), proceso que ocurre en la glía de Müller después de una lesión en la retina.

A pesar de que se tienen bien caracterizadas algunas funciones de las DNMTs, su papel no necesariamente debe ser el mismo en todos los tejidos y en todas las condiciones, sin embargo, con esta información previa y la inhibición selectiva de cada DNMT en los tejidos de interés, como la retina, se puede obtener una noción sobre la función de las mismas, lo cual se realizó en este proyecto.

6.1. Sistema CRISPR/dCas9 para la inhibición de DNMT3a en células de Müller murinas

Con antelación se había observado que, en la retina, la inhibición farmacológica de las ADN metiltransferasas provoca un incremento en la expresión de genes asociados a pluripotencia, tanto en proporción como en tiempo (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016). Este incremento es indispensable para llevar a cabo procesos como la desdiferenciación de la glía de Müller que forma parte de una respuesta a un daño en la retina (A. J. Fischer & Reh, 2001).

Sin embargo, a pesar de tener información acerca de la relación de estas enzimas con la inducción de un fenotipo tipo célula troncal en la glía de Müller, no se conocía el papel de cada DNMT en este proceso. Por lo tanto, en este trabajo se abordó la caracterización inicial de la función de la enzima DNMT3a durante el proceso de desdiferenciación de la glía de Müller en respuesta a una señal de daño.

Se incorporó a las células de Müller una construcción plasmídica con la información para generar un sistema CRISPR/dCas9-KRAB que permitiera el silenciamiento, a nivel transcripcional, del gen de DNMT3a.

El uso de los sistemas CRISPR/dCas9-KRAB como represores génicos es más recomendable que otras herramientas moleculares para la inactivación de genes, como los ARN de interferencia (RNAi), por su especificidad y eficiencia, además de que si llegan a hibridar con secuencias de ADN fuera de objetivo (*off targets*) esta unión es débil y no generan una actividad relevante (Zheng et al., 2018).

El resultado obtenido por PCR en tiempo real evidenció una disminución del 90% en la expresión génica de DNMT3a demostrando la eficiencia de la hibridación del sgRNA, que requiere el sistema CRISPR/dCas9-KRAB, con el gen DNMT3a en el sitio de la región promotora comprendida entre -200 y + 300 pb del sitio de inicio de la transcripción (TSS) (Du & Qi, 2016; Zheng et al., 2018).

Además, se comprobó que la inhibición de la expresión de DNMT3a es altamente selectiva ya que la transfección del sistema CRISPR/dCas9-KRAB diseñado no afectó la expresión de DNMT3b. En este sentido es importante señalar que los genes que dan origen a las diversas DNMTs son diferentes entre sí. Por ejemplo, la enzima DNMT3a de ratón se genera a partir de un gen presente en el cromosoma 12qA1.1 (*Dnmt3a: Chr12 - Genome Data Viewer - NCBI, s/f*); su homóloga, la enzima DNMT3b, de un gen en el cromosoma 2qH1 (*Dnmt3b: Chr2 - Genome Data Viewer - NCBI, s/f*); mientras que la DNMT1 se origina en el cromosoma 9qA3 (*Dnmt1: Chr9 - Genome Data Viewer - NCBI, s/f*).

Posterior a la inhibición a nivel transcripcional de DNMT3a en cultivos celulares de glía de Müller, se demostró su relación con el proceso de desdiferenciación, ya que la deficiencia de DNMT3a generó un incremento en la expresión de genes asociados a pluripotencia, así como de la proliferación celular y se evidenciaron cambios morfológicos. La discusión de estos hallazgos se realizará en los siguientes apartados.

6.2. Cambios morfológicos en cultivos de glía de Müller transfectados con el plásmido para la inhibición de DNMT3a.

Mientras que las células de Müller *in vivo* presentan una morfología lo que les permite su extensión a lo largo de la retina de vertebrados y con ello contribuyen al mantenimiento de la estructura del tejido (Wang et al., 2017), las células de Müller en cultivo poseen una morfología característica radial estrellada. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la inhibición de DNMT3a induce alteraciones en esta morfología se presentan más compactas y fusiforme.

Esta observación se puede asociar a un estado de desdiferenciación de la glía de Müller, ya que, al existir variaciones en la expresión de genes, algunos de estos pueden estar relacionados con cambios en la polimerización del citoesqueleto.

En ensayos de daño retiniano *in vivo* en peces cebra, se ha observado que la desdiferenciación de la glía de Müller induce la expresión de proteínas de adhesión, como N-cadherina y la reorganización del citoesqueleto. Esto permitiría la migración de la glía de Müller desdiferenciada hacia los sitios de lesión para su posterior diferenciación neural (Nagashima et al., 2013; Raymond et al., 2006).

Así mismo, Fausett y Goldman determinaron que deben existir cambios en la expresión de α 1-Tubulina (una proteína de microtúbulos neuronales) para la distribución de las células derivadas de neurogénesis durante el desarrollo o regeneración a diferentes puntos del sistema nervioso central. Esto también es observable en retina después de un daño y se puede traducir como cambios en el citoesqueleto (Fausett & Goldman, 2006).

También se han determinado cambios en la expresión de filamentos intermediarios, como nestina y vimentina, en células tipo progenitoras provenientes de la desdiferenciación de la glía de Müller, los cuales repercuten en la morfología de las células (Walcott & Provis, 2003).

En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio, se determinó que, las células de Müller estimuladas con NMDA (desdiferenciadas), liberan exosomas al medio extracelular, con un cargo aún indeterminado, que tienen la capacidad de inducir la polimerización de la actina en las células receptoras (Carapia

Hernández, 2020). La actina es una proteína, presente en gran proporción en las células, que intervine en procesos como la migración celular o movilidad, así como en la transcripción de genes y en la endocitosis (J. Guo et al., 2014).

Esto puede indicar que no sólo la desdiferenciación de la misma célula provoca cambios en el citoesqueleto, sino que esos cambios son también consecuencia de la comunicación intercelular mediada por exosomas.

6.3. DNMT3a en la proliferación y viabilidad celular

Una cuestión muy importante durante el desarrollo de este proyecto fue determinar si los tratamientos experimentales afectaban, de alguna manera, la viabilidad de las células. Observamos una disminución significativa en la proporción de células viables en aquellos grupos que pasaron por un proceso de electroporación. Esto se puede atribuir netamente a la técnica empleada, ya que está ampliamente descrito que variables como la fuerza, duración y número de pulsos eléctricos aplicados así como la composición de la célula pueden afectar tanto, la eficiencia de la transfección como la supervivencia celular (Miklavčič, 2017; Sherba et al., 2020).

Sin embargo, dentro de los grupos electroporados, observamos que el grupo transfectado con el sistema CRISPR/dCas9-KRAB para la inhibición de DNMT3a tenía un mayor porcentaje de células viables, lo cual podría indicar que la disminución de DNMT3a protege de cierta manera a las células de la apoptosis (Gao et al., 2011) o bien que hay un aumento en la proliferación celular.

La relación de DNMT3a en el proceso de proliferación celular es todavía muy controversial ya que se le ha atribuido la capacidad de regular este proceso tanto negativa como positivamente (Banerjee & Bacanamwo, 2010; Challen et al., 2012, 2014; Tadokoro et al., 2007). Por ejemplo, en células troncales neuronales (NSCs), se determinó que, si bien la depleción de DNMT3a favorecía la diferenciación de NSCs en más tipos de células, esta misma deficiencia parecía incrementar su capacidad de proliferación, la cual se midió contabilizando el

número de células en fase S del ciclo celular en cada condición (Z. Wu et al., 2012).

Como parte de los resultados obtenidos en esta tesis, observamos que, después de la inhibición de DNMT3a en células de Müller provenientes de ratones con 8 a 12 días de edad, la proporción de células proliferantes (en fase S) aumentó un 7 % con relación a las células sin tratamiento lo que implica que el ingreso de las células de Müller al ciclo celular no es sincrónico o que no todas las células son capaces de hacerlo (Nagashima et al., 2013). Esto parece indicar que la ausencia de DNMT3a, al igual que lo que ocurre con la depleción de DNMT1, genera un estado de hipometilación parcial derivado de una desmetilación pasiva (He et al., 2017) que permite la expresión de genes asociados a la reintegración de las células al ciclo celular (Sun et al., 2021). Este proceso se ha observado en células del sistema nervioso central, donde la deficiencia de DNMT3a facilita la expresión de genes relacionados con la producción de nuevas células (H. Wu et al., 2010).

Se conocen diversas vías por las cuales, al inhibirse las DNMTs, se genera un incremento en la proliferación celular, sin embargo, no se tiene certeza de cuál está involucrada directamente con DNMT3a. En estados patológicos, como en el cáncer de pulmón, se ha observado que la deficiencia de DNMT3a promueve el crecimiento de los tumores (Gao et al., 2011) mediante la transactivación de genes pro-metastásicos (Chik & Szyf, 2011). Sin embargo, también existen reportes de que la disminución de DNMT3a induce la expresión de genes supresores de tumores como CDH1 (T. Liu et al., 2018), lo cual disminuye la actividad de la vía de señalización Wnt/ β -catenina y con ello la proliferación celular (De Pauw et al., 2017). Asimismo, se ha reportado en la literatura que la sobre-expresión de DNMTs también genera un incremento en la proliferación celular, lo que puede dar origen a un tumor (Qu et al., 2010), cuestión que no sucede durante la inhibición de DNMT3a, ya que, en ese estado, solamente se promueve el crecimiento de un tumor pre-existente, no se evoca la aparición de uno.

Estas actividades contrapuestas de la DNMT3a pueden atribuirse a su capacidad de metilación tanto de zonas CpG y zonas no-CpG en el ADN, y que al disminuir

esta actividad, se puede alterar la estabilidad del genoma propiciando la expresión de un sinnúmero de genes que, como se mencionó anteriormente, tienen acciones contrarias, ya que algunos pudieran estar involucrados en la activación de vías de señalización proliferativas o en la reintegración de las células de Müller al ciclo celular y, por otra parte, también se podrían estar activando genes represores de las mismas (Ehrlich, 2002).

Debido al desarrollo de estados patológicos derivados de la inhibición de DNMT3a en diversos tejidos, sería recomendable estudiar detalladamente las vías mediante las cuales se propicia la proliferación celular en retina.

6.4. DNMT3a y su relación con la expresión de genes asociados a pluripotencia

Posterior a un daño en retina, existe un aumento en la expresión de genes asociados a pluripotencia (GAsP) por excelencia como *Lin28* (Festuccia et al., 2013), además de factores pro-neurales como *Ascl1* y filamentos intermediarios característicos de células troncales neuronales como *Nestina*. Esto les permite a las células de Müller entrar en un estado de desdiferenciación donde adquiere un fenotipo tipo célula troncal. Este proceso es fundamental en la regeneración funcional de la retina.

En mamíferos se observa la expresión de genes asociados a células troncales neuronales (NSCs) hasta por 24 horas después de la lesión (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016), mientras que en especies con capacidad regenerativa, como el pez cebra, esta expresión se mantiene de 4 a 7 días después del daño (Powell et al., 2013). Esto proporciona un amplio margen de tiempo para que las células de Müller desdiferenciadas puedan proliferar y posteriormente transdiferenciarse, lo cual es una diferencia significativa entre especies con capacidad no regenerativa y regenerativa (Powell et al., 2013).

En este proyecto identificamos que, la enzima DNMT3a pareciera estar regulando negativamente la expresión de genes asociados a células troncales ya que, después de la represión génica de DNMT3a, se observó un aumento en la

expresión de genes como Lin28, Ascl1 y Nestina (marcadores asociados a células progenitoras derivadas de glía de Müller) a pesar de que se conoce que existe un estado de hipometilación de los promotores de los genes asociados a pluripotencia (Aldiri et al., 2017).

El incremento en la expresión de genes asociados a pluripotencia podría deberse básicamente a una desmetilación pasiva (Luo et al., 2018), donde la disminución de DNMT3a impediría el correcto mantenimiento de la metilación en diversos sitios del genoma. Estos sitios promotores y/o sitios reguladores estarían involucrados en la transcripción de genes y en la proliferación celular (J. U. Guo et al., 2013; He et al., 2017). En otras palabras, las DNMT3a existentes serían insuficientes para mantener el metiloma de la célula después de múltiples divisiones (Z. D. Smith & Meissner, 2013).

Hemos demostrado que la inhibición de la DNMT3a induce la expresión de Ascl1, Lin28 y Nestina (probablemente entre otros genes). La activación o sobre-expresión del gen Ascl1 es suficiente para inducir un estado de desdiferenciación en la glía de Müller (Pollak et al., 2013) y es necesaria para la regeneración de la retina. Además, también se ha observado que es suficiente para la transdiferenciación de células diferenciadas hacia neuronas (Vierbuchen et al., 2010). Por lo tanto, Ascl1 puede promover la diferenciación neural o la proliferación en células de Müller desdiferenciadas y, en combinación con otros factores, incrementa la probabilidad de supervivencia de las glías de Müller proliferantes durante su reprogramación hacia células troncales para participar en la neurogénesis. (Y. Liu et al., 2019)

Además, Ascl1 es necesario para la expresión de Lin28, un gen de pluripotencia (Ramachandran et al., 2010) que produce una proteína de unión a ARN y cuya expresión en sistema nervioso central juega un papel importante en la regulación de la neurogénesis en cerebro y en retina (Ahmad et al., 2011; Balzer et al., 2010). La sobre-expresión de Lin28 en retina, además de ser un indicativo de pluripotencia, induce preferencialmente la formación de neuronas y, al estar

presente en células de Müller podría impulsar la transdiferenciación de éstas (Zhao et al., 2017).

Por otra parte, la expresión de Nestina, un filamento intermediario, se emplea como un marcador para identificar células progenitoras neurales (Lendahl et al., 1990). Se ha descrito que está presente tanto en las células de Müller adultas o diferenciadas como en células de Müller desdiferenciadas (Walcott & Provis, 2003). Además, este filamento da paso a la formación de neurofilamentos, propios de neuronas (Andy J. Fischer & Omar, 2005; Kohno et al., 2006).

Asímismo, Nestina es necesaria para el mantenimiento y autorrenovación de células troncales (Park et al., 2010) por lo que puede estar involucrada en la capacidad proliferativa de las células de Müller desdiferenciadas y se encuentra ampliamente expresada en retinas que han sufrido una lesión (Kohno et al., 2006; Luna et al., 2010; Xiao et al., 2017).

La expresión de genes como Lin28, Ascl1 y Nestina es un indicativo de la relación de la glía de Müller con las células progenitoras retinianas y de su capacidad de adquisición de un fenotipo tipo célula troncal y de la facilitación, ya sea, de la regeneración del tejido o la aminoración del daño (Hamon et al., 2016; Inman & Horner, 2007; Reichenbach & Bringmann, 2013; Suga et al., 2014).

Aunque estos genes son solamente una pequeña fracción de aquellos involucrados en la generación de células troncales derivadas de glía de Müller, ofrecen información relevante para comprender la magnitud de las acciones ejercidas por DNMT3a, su relación con la desdiferenciación de la glía de Müller y su posible uso como blanco terapéutico.

7. Conclusiones

La disminución de la cantidad de la enzima DNMT3a en células de Müller, por medio de un sistema secuencia específico CRISPR/dCas9-KRAB, induce la expresión de genes asociados a pluripotencia y un incremento en la proliferación celular, características de un proceso de dediferenciación.

La DNMT3a regula la adquisición de un fenotipo tipo célula troncal en la glía de Müller, por lo tanto, la hipótesis planteada en esta tesis fue verdadera.

8. Perspectivas

Con lo realizado en esta tesis conocimos que DNMT3a está ampliamente involucrada en la dediferenciación de la glía de Müller. El siguiente paso a dar será determinar si la inhibición de DNMT3a en conjunto con la sobre-estimulación de receptores de glutamato tipo NMDA, característica de un proceso de daño excitotóxico en retina, es capaz de generar un estado de dediferenciación más estable que permita, posteriormente, la transdiferenciación de la glía de Müller hacia neuronas funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*.

Anteriormente, en nuestro grupo de investigación se observó que, en un modelo de daño retiniano *in vivo*, al administrar conjuntamente un inhibidor de las Dnmts con un inductor de daño (NMDA) se perdía completamente la estructura de la retina, esto a consecuencia de la dediferenciación de las células de Müller y su incapacidad de mantener a las neuronas adyacentes en su sitio, una de sus principales funciones, por lo que, se propone que con el uso de nuestro sistema CRISPR/dCas9-KRAB será posible inducir solamente la dediferenciación de alrededor del 20% del total celular (nuestra eficiencia de transfección), por lo que se podrán generar células tipo troncales al mismo tiempo que se mantiene la estructura de la retina con aquellas células de Müller no dediferenciadas.

También se propone estudiar a fondo los cambios en la morfología de las células de Müller observados en este trabajo y que fueron relacionados con la inhibición de DNMT3a.

9. Referencias

- Ahmad, I., del Debbio, C. B., Das, A. V., & Parameswaran, S. (2011). Müller glia: A promising target for therapeutic regeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *52*(8), 5758–5764. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7308>
- Ail, D., & Perron, M. (2017). Retinal Degeneration and Regeneration — Lessons From Fishes and Amphibians. *Current Pathobiology Report*, *5*, 67–78. <https://doi.org/10.1007/s40139-017-0127-9>
- Aldiri, I., Xu, B., Wang, L., Chen, X., Hiler, D., Griffiths, L., Valentine, M., Shirinifard, A., Thiagarajan, S., Sablauer, A., Barabas, M. E., Zhang, J., Johnson, D., Frase, S., Zhou, X., Easton, J., Zhang, J., Mardis, E. R., Wilson, R. K., ... Dyer, M. A. (2017). The Dynamic Epigenetic Landscape of the Retina During Development, Reprogramming, and Tumorigenesis. *Neuron*, *94*(3), 550-568.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.022>
- Asmar, F., Søggaard, A., & Grønbaek, K. (2015). DNA Methylation and Hydroxymethylation in Cancer. *Epigenetic Cancer Therapy*, *March*, 9–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800206-3.00002-1>
- Balzer, E., Heine, C., Jiang, Q., Lee, V. M., & Moss, E. G. (2010). LIN28 alters cell fate succession and acts independently of the let-7 microRNA during neurogliogenesis in vitro. *Development*, *137*(6), 891–900. <https://doi.org/10.1242/dev.042895>
- Banerjee, S., & Bacanamwo, M. (2010). DNA methyltransferase inhibition induces mouse embryonic stem cell differentiation into endothelial cells. *Experimental Cell Research*, *316*(2), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.08.011>
- Bellefroid, E. J., Poncelet, D. A., Lecocq, P. J., Revelant, O., Martial, J. A., & Rutter, W. J. (1991). The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins (DNA-binding proteins/sequence conservation/ceil differentiation). *Biochemistry*, *88*, 3608–3612. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3608>
- Bostick, M., Jong, K. K., Estève, P. O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E.

- (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, 317, 1760–1764. <https://doi.org/10.1126/science.1147939>
- Brueckner, B., Boy, R. G., Siedlecki, P., Musch, T., & Kliem, H. (2005). Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res*, 65.
- Campbell, L., & Hyde, D. (2017). Opportunities for CRISPR / Cas9 Gene Editing in Retinal Regeneration Research. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(November). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00099>
- Carapia Hernández, A. K. (2020). *Caracterización morfológica, molecular y funcional de la población de vesículas extracelulares secretadas por cultivos de glía de Müller y glía de Müller desdiferenciada*. CINVESTAV.
- Carlberg, C., & Molnár, F. (2016). *Mechanisms of Gene Regulation* (2a ed.). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7741-4>
- Challen, G. A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J. S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., Liang, S., Lu, Y., Darlington, G. J., Meissner, A., Issa, J. P. J., Godley, L. A., Li, W., & Goodell, M. A. (2012). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature Genetics*, 44(1), 23–31. <https://doi.org/10.1038/ng.1009>
- Challen, G. A., Sun, D., Mayle, A., Jeong, M., Luo, M., Rodriguez, B., Mallaney, C., Celik, H., Yang, L., Xia, Z., Cullen, S., Berg, J., Zheng, Y., Darlington, G. J., Li, W., & Goodell, M. A. (2014). Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 15(3), 350–364. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.018>
- Chanda, S., Ang, C. E., Davila, J., Pak, C., Mall, M., Lee, Q. Y., Ahlenius, H., Jung, S. W., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2014). Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Reports*, 3(2), 282–296. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.020>
- Chik, F., & Szyf, M. (2011). Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT

inhibitors. *Carcinogenesis*, 32(2), 224–232.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgq221>

Das, A. V., Mallya, K. B., Zhao, X., Ahmad, F., Bhattacharya, S., Thoreson, W. B., Hegde, G. V., & Ahmad, I. (2006). Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: Regulation by Notch and Wnt signaling. *Developmental Biology*, 299(1), 283–302. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.029>

De Pauw, A., Andre, E., Sekkali, B., Bouzin, C., Esfahani, H., Barbier, N., Lorient, A., De Smet, C., Vanhoutte, L., Moniotte, S., Gerber, B., di Mauro, V., Catalucci, D., Feron, O., Hilfiker-Kleiner, D., & Balligand, J. L. (2017). Dnmt3a-mediated inhibition of Wnt in cardiac progenitor cells improves differentiation and remote remodeling after infarction. *JCI insight*, 2(12).

<https://doi.org/10.1172/jci.insight.91810>

Dnmt1: Chr9 - Genome Data Viewer - NCBI. (s/f). Recuperado el 29 de junio de 2021, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=13433>

Dnmt3a: Chr12 - Genome Data Viewer - NCBI. (s/f). Recuperado el 29 de junio de 2021, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=13435>

Dnmt3b: Chr2 - Genome Data Viewer - NCBI. (s/f). Recuperado el 29 de junio de 2021, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=13436>

Dong, X., Jin, Y., Ming, D., Li, B., Dong, H., Wang, L., Wang, T., & Wang, D. (2017). CRISPR/dCas9-mediated inhibition of gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods*, 139, 79–86.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.05.008>

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1077–1086.

<https://doi.org/10.1126/science.1258096>

Du, D., & Qi, L. S. (2016). CRISPR technology for genome activation and repression in mammalian cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(1), 40–50.

<https://doi.org/10.1101/pdb.prot090175>

Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *En*

Oncogene (Vol. 21, Número 35 REV. ISS. 3, pp. 5400–5413).

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205651>

- Epsztejn-Litman, S., Feldman, N., Abu-Remaileh, M., Shufaro, Y., Gerson, A., Ueda, J., Deplus, R., Fuks, F., Shinkai, Y., Cedar, H., & Bergman, Y. (2008). De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nature Structural and Molecular Biology*, *15*(11), 1176–1183. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1476>
- Fausett, B. V., & Goldman, D. (2006). A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *26*(23), 6303–6313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0332-06.2006>
- Fausett, B. V., Gumerson, J. D., & Goldman, D. (2008). The proneural basic helix-loop-helix gene *Ascl1a* is required for retina regeneration. *Journal of Neuroscience*, *28*(5), 1109–1117. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4853-07.2008>
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., Silva, A. J., & Fan, G. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature Neuroscience*, *13*(4), 423–430. <https://doi.org/10.1038/nn.2514>
- Festuccia, N., Osorno, R., Wilson, V., & Chambers, I. (2013). The role of pluripotency gene regulatory network components in mediating transitions between pluripotent cell states. En *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 23, Número 5, pp. 504–511). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.06.003>
- Fischer, A. J., & Reh, T. A. (2001). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature Neuroscience*, *4*(3), 247–252. <https://doi.org/10.1038/85090>
- Fischer, Andy J., & Omar, G. (2005). Translin, a nestin-related intermediate filament, is expressed by neural progenitors and can be induced in Müller glia

- in the chicken retina. *Journal of Comparative Neurology*, 484(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1002/cne.20406>
- Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P., & Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 4035–4040.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210256200>
- Gagliardi, M., Strazzullo, M., & Matarazzo, M. R. (2018). DNMT3B Functions: Novel Insights From Human Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00140>
- Gao, Q., Steine, E. J., Barrasa, M. I., Hockemeyer, D., Pawlak, M., Fu, D., Reddy, S., Bell, G. W., & Jaenisch, R. (2011). Deletion of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a promotes lung tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), 18061–18066. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114946108>
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468, 67–71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>
- Geiman, T., & Robertson, K. (2002). Chromatin remodeling, histone modifications and DNA methylation - How does it all fit together? *Journal of Cellular Biochemistry*, 87, 117–125.
- Giannelli, S. G., Demontis, G. C., Pertile, G., Rama, P., & Broccoli, V. (2011). Adult human Müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors. *Stem Cells*, 29(2), 344–356. <https://doi.org/10.1002/stem.579>
- Goldman, D. (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(7), 431–442.
<https://doi.org/10.1038/nrn3723>
- Gong, J., Tang, D., & Leong, K. W. (2018). CRISPR/dCas9-mediated cell differentiation. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 7, 9–15.

<https://doi.org/10.1016/j.cobme.2018.08.005>

Graue, E. (2009). El ojo: estructura y función. En *Oftalmología en la práctica de la medicina general* (3a ed., pp. 1–13). McGraw Hill Educación.

Guo, J. U., Su, Y., Shin, J. H., Shin, J., Li, H., Xie, B., Zhong, C., Hu, S., Le, T., Fan, G., Zhu, H., Chang, Q., Gao, Y., & Ming, G. (2013). Distribution , recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nature Publishing Group*, *17*(2), 215–222.

<https://doi.org/10.1038/nn.3607>

Guo, J., Wang, Y., Sachs, F., & Meng, F. (2014). Actin stress in cell reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(49), E5252–E5261.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1411683111>

Hamon, A., Roger, J. E., Yang, X. J., & Perron, M. (2016). Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. *Developmental Dynamics*, *245*(7), 727–738.

<https://doi.org/10.1002/dvdy.24375>

He, S., Sun, H., Lin, L., Zhang, Y., Chen, J., Liang, L., Li, Y., Zhang, M., Yang, X., Wang, X., Wang, F., Zhu, F., Chen, J., Pei, D., & Zheng, H. (2017). Passive DNA demethylation preferentially up-regulates pluripotency-related genes and facilitates the generation of induced pluripotent stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(45), 18542–18555.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810457>

Hitchcock, P. F., & Raymond, P. A. (1992). Retinal regeneration. *Trends in Neurosciences*, *15*(3), 103–108. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90020-9)

Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, *157*(6), 1262–1278.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

Inman, D. M., & Horner, P. J. (2007). Reactive nonproliferative gliosis

predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia*, 55, 942–953.
<https://doi.org/10.1002/glia>

Jadhav, A. P., Cho, S. H., & Cepko, C. L. (2006). Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 18998–19003.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0608155103>

Jeltsch, A., & Jurkowska, R. Z. (2016). DNA methyltransferases - Role and function. En *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1>

Jorstad, N. L., Wilken, M. S., Grimes, W. N., Wohl, S. G., Vandenbosch, L. S., Yoshimatsu, T., Wong, R. O., Rieke, F., & Reh, T. A. (2017). Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*, 548(7665), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature23283>

Karl, M. O., & Reh, T. A. (2010). Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends in Molecular Medicine*, 16(4), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.02.003>

Karl, Mike O., Hayes, S., Nelson, B. R., Tan, K., Buckingham, B., & Reh, T. A. (2008). Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19508–19513. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807453105>

Kohno, H., Sakai, T., & Kitahara, K. (2006). Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244(1), 90–95.
<https://doi.org/10.1007/s00417-005-0030-7>

Lendahl, U., Zimmerman, L. B., & McKay, R. D. G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4), 585–595.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90662-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90662-X)

- Leoni, C., Montagner, S., Rinaldi, A., Bertoni, F., Polletti, S., Balestrieri, C., & Monticelli, S. (2017). Dnmt3a restrains mast cell inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(8), E1490–E1499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616420114>
- Li, C., Fan, Y., Li, G., Xu, X., Duan, J., Li, R., Kang, X., Ma, X., Chen, X., Ke, Y., Yan, J., Lian, Y., Liu, P., Zhao, Y., Zhao, H., Chen, Y., Yu, Y., & Liu, J. (2018). DNA methylation reprogramming of functional elements during mammalian embryonic development. *Cell Discovery*, *4*(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0039-9>
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, *69*(6), 915–926. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-F](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-F)
- Liao, J., Karnik, R., Gu, H., Ziller, M. J., Clement, K., Tsankov, A. M., Akopian, V., Gifford, C. A., Donaghey, J., Galonska, C., Pop, R., Reyon, D., Tsai, S. Q., Mallard, W., Joung, J. K., Rinn, J. L., Gnirke, A., & Meissner, A. (2015). Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nature Genetics*, *47*(5), 469–478. <https://doi.org/10.1038/ng.3258>
- Lin, S., Guo, J., & Chen, S. (2019). Transcriptome and DNA methylome signatures associated with retinal Müller glia development, injury response, and aging. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *60*(13), 4436–4450. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-27361>
- Liu, T., Wu, X., Chen, T., Luo, Z., & Hu, X. (2018). Downregulation of dnmt3a by mir-708-5p inhibits lung cancer stem cell-like phenotypes through repressing wnt/b-catenin signaling. *Clinical Cancer Research*, *24*(7), 1748–1760. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1169>
- Liu, Y., Wang, C., & Su, G. (2019). Cellular Signaling in Müller Glia: Progenitor Cells for Regenerative and Neuroprotective Responses in Pharmacological Models of Retinal Degeneration. En *Journal of Ophthalmology* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/5743109>

- Luna, G., Lewis, G. P., Banna, C. D., Skalli, O., & Fisher, S. K. (2010). *Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin.*
- Luo, C., Hajkova, P., & Ecker, J. R. (2018). Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. *Science*, *361*(6409), 1336–1340.
- Luz-Madrigal, A., Grajales, E., Tangeman, J., Kosse, S., Liu, L., Wang, K., Fausey, A., Liang, C., Tsonis, P., & Del Rio, K. (2019). DNA demethylation is a driver for chick retina regeneration. *bioRxiv*, 1–32. <https://doi.org/10.1101/679670>
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, *19*(2), 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., Van Der Oost, J., & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(6), 467–477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S. H., & Niwa, H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, *9*(6), 625–635. <https://doi.org/10.1038/ncb1589>
- Miklavčič, D. (2017). Handbook of Electroporation. *Handbook of Electroporation*, *1–4*, 1–2998. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32886-7>
- Mojica, F. J. M., Diez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, *60*, 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Nagashima, M., Barthel, L. K., & Raymond, P. A. (2013). A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-

- cadherin to regenerate retinal neurons. *Development (Cambridge)*, 140(22), 4510–4521. <https://doi.org/10.1242/dev.090738>
- Nageshwaran, S., Chavez, A., Cher Yeo, N., Guo, X., Lance-Byrne, A., Tung, A., Collins, J. J., & Church, G. M. (2018). CRISPR Guide RNA Cloning for Mammalian Systems. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 140, 1–7. <https://doi.org/10.3791/57998>
- Nasonkin, I. O., Lazo, K., Hambright, D., Brooks, M., Fariss, R., & Swaroop, A. (2011). Distinct nuclear localization patterns of DNA methyltransferases in developing and mature mammalian retina. *Journal of Comparative Neurology*, 519(10), 1914–1930. <https://doi.org/10.1002/cne.22613>
- Newman, E., & Reichenbach, A. (1996). The Muller cell: A functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 307–312. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10040-0](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10040-0)
- Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases [1]. In *Nature Genetics* (Vol. 19, Número 3, pp. 219–220). <https://doi.org/10.1038/890>
- Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y., & Takahashi, M. (2004). Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37), 13654–13659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402129101>
- Osakada, F., Ooto, S., Akagi, T., Mandai, M., Akaike, A., & Takahashi, M. (2007). Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *Journal of Neuroscience*, 27(15), 4210–4219. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4193-06.2007>
- Park, D., Xiang, A. P., Mao, F. F., Zhang, L., Di, C. G., Liu, X. M., Shao, Y., Ma, B. F., Lee, J. H., Ha, K. S., Walton, N., & Lahn, B. T. (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells*, 28(12), 2162–2171. <https://doi.org/10.1002/stem.541>

- Pasha, Z., Haider, H. K., & Ashraf, M. (2011). Efficient non-viral reprogramming of myoblasts to stemness with a single small molecule to generate cardiac progenitor cells. *PLoS ONE*, 6(8), e23667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023667>
- Pawlak, M., & Jaenisch, R. (2011). De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state. *Genes and Development*, 25(10), 1035–1040. <https://doi.org/10.1101/gad.2039011>
- Pechalrieu, D., Etievant, C., & Arimondo, P. B. (2017). DNA methyltransferase inhibitors in cancer: From pharmacology to translational studies. *Biochemical Pharmacology*, 129, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.004>
- Pollak, J., Wilken, M. S., Ueki, Y., Cox, K. E., Sullivan, J. M., Taylor, R. J., Levine, E. M., & Reh, T. A. (2013). ASCL1 reprograms mouse Müller glia into neurogenic retinal progenitors. *Development (Cambridge)*, 140(12), 2619–2631. <https://doi.org/10.1242/dev.091355>
- Ponger, L., & Li, W. H. (2005). Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 22(4), 1119–1128. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi098>
- Powell, C., Grant, A. R., Cornblath, E., & Goldman, D. (2013). Analysis of dna methylation reveals a partial reprogramming of the müller glia genome during retina regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49), 19814–19819. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312009110>
- Prasad, S., & Galetta, S. L. (2011). Anatomy and physiology of the afferent visual system. *Handbook of Clinical Neurology*, 102, 3–19.
- Qu, Y., Mu, G., Wu, Y., Dai, X., Zhou, F., Xu, X., Wang, Y., & Wei, F. (2010). Overexpression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b significantly correlates with retinoblastoma tumorigenesis. *American Journal of Clinical Pathology*, 134(5), 826–834. <https://doi.org/10.1309/AJCPHGQ69FXDFWII>

- Rajavelu, A., Tulyasheva, Z., Jaiswal, R., Jeltsch, A., & Kuhnert, N. (2011). The inhibition of the mammalian DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by dietary black tea and coffee polyphenols. *BMC Biochemistry*, *12*(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-16>
- Ramachandran, R., Fausett, B. V., & Goldman, D. (2010). Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nature Cell Biology*, *12*(11), 1101–1107.
<https://doi.org/10.1038/ncb2115>
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L., & Perkowski, J. J. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Developmental Biology*, *6*(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-36>
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2013). New functions of müller cells. *Glia*, *61*(5), 651–678. <https://doi.org/10.1002/glia.22477>
- Reyes-Aguirre, L. I., & Lamas, M. (2016). Oct4 methylation-mediated silencing as an epigenetic barrier preventing Müller Glia dedifferentiation in a murine model of retinal injury. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00523>
- Sardar Pasha, S. P. B., Münch, R., Schäfer, P., Oertel, P., Sykes, A. M., Zhu, Y., & Karl, M. O. (2017). Retinal cell death dependent reactive proliferative gliosis in the mouse retina. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09743-8>
- Seritrakul, P., & Gross, J. M. (2019). Genetic and epigenetic control of retinal development in zebrafish. *Current Opinion in Neurobiology*, *59*, 120–127.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.05.008>
- Sherba, J. J., Hogquist, S., Lin, H., Shan, J. W., Shreiber, D. I., & Zahn, J. D. (2020). The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59790-x>

- Smith, T. H. L., Collins, T. M., & McGowan, R. A. (2011). Expression of the dnmt3 genes in zebrafish development: Similarity to Dnmt3a and Dnmt3b. *Development Genes and Evolution*, 220(11–12), 347–353.
<https://doi.org/10.1007/s00427-010-0347-z>
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). The simplest explanation: Passive DNA demethylation in PGCs. *EMBO Journal*, 32(3), 318–321.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2012.349>
- Suga, A., Sadamoto, K., Fujii, M., Mandai, M., & Takahashi, M. (2014). Proliferation potential of Müller glia after retinal damage varies between mouse strains. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094556>
- Sun, J., Yang, J., Miao, X., Loh, H. H., Pei, D., & Zheng, H. (2021). Proteins in DNA methylation and their role in neural stem cell proliferation and differentiation. En *Cell Regeneration* (Vol. 10, Número 1). Springer.
<https://doi.org/10.1186/s13619-020-00070-4>
- Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 465–476.
<https://doi.org/10.1038/nrg2341>
- Tadokoro, Y., Ema, H., Okano, M., Li, E., & Nakauchi, H. (2007). De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(4), 715–722.
<https://doi.org/10.1084/jem.20060750>
- Tian, P., Wang, J., Shen, X., Rey, J. F., Yuan, Q., & Yan, Y. (2017). Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2, 219–225.
<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.006>
- Trejo Groba, R. A. (2018). *Evaluación de la proliferación celular retiniana inducida por la modificación en la metilación del DNA en un modelo murino de daño in vivo*. CINVESTAV.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., & Wernig,

- M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, *463*(7284), 1035–1041. <https://doi.org/10.1038/nature08797>
- Walcott, J. C., & Provis, J. M. (2003). Müller cells express the neuronal progenitor cell marker nestin in both differentiated and undifferentiated human foetal retina. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, *31*(3), 246–249. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9071.2003.00638.x>
- Wang, J., O'Sullivan, M. L., Mukherjee, D., Puñal, V. M., Farsiu, S., & Kay, J. N. (2017). Anatomy and spatial organization of Müller glia in mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, *525*(8), 1759–1777. <https://doi.org/10.1002/CNE.24153>
- Watanabe, D., Uchiyama, K., & Hanaoka, K. (2006). Transition of mouse de novo methyltransferases expression from Dnmt3b to Dnmt3a during neural progenitor cell development. *Neuroscience*, *142*(3), 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.053>
- Weisenberger, D. J., Velicescu, M., Cheng, J. C., Gonzales, F. a, Liang, G., & Jones, P. a. (2004). Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Molecular cancer research : MCR*, *2*(1), 62–72. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., Li, E., Zhang, Y., & Sun, Y. E. (2010). Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science*, *329*(5990), 444–447. <https://doi.org/10.1126/science.1190485>
- Wu, Z., Huang, K., Yu, J., Le, T., Namihira, M., Liu, Y., Zhang, J., Xue, Z., Cheng, L., & Fan, G. (2012). Dnmt3a regulates both proliferation and differentiation of mouse neural stem cells. *Journal of Neuroscience Research*, *90*(10), 1883–1891. <https://doi.org/10.1002/jnr.23077>
- Xiao, J., Li, X., Chen, L., Han, X., Zhao, W., Li, L., & Chen, J. G. (2017). Apobec1 Promotes Neurotoxicity-Induced Dedifferentiation of Müller Glial Cells. *Neurochemical Research*, *42*(4), 1151–1164. <https://doi.org/10.1007/s11064->

016-2151-2

Zhao, C., Tao, Z., Xue, L., Zeng, Y., Wang, Y., Xu, H., & Yin, Z. Q. (2017). Lin28b stimulates the reprogramming of rat Müller glia to retinal progenitors.

Experimental Cell Research, 352(1), 164–174.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.010>

Zheng, Y., Shen, W., Zhang, J., Yang, B., Liu, Y. N., Qi, H., Yu, X., Lu, S. Y., Chen, Y., Xu, Y. Z., Li, Y., Gage, F. H., Mi, S., & Yao, J. (2018). CRISPR

interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain. *Nature*

Neuroscience, 21(3), 447–454. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0077-5>