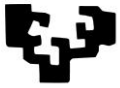
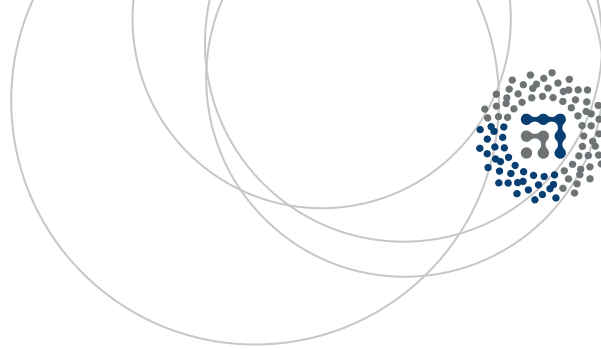


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Análisis del crecimiento de las células ganglionares de la retina de rata *in vitro*

Autor:
Sara Salgado Alonso
Director/a:
Elena Vecino Cordero

Leioa, 24 de junio de 2014

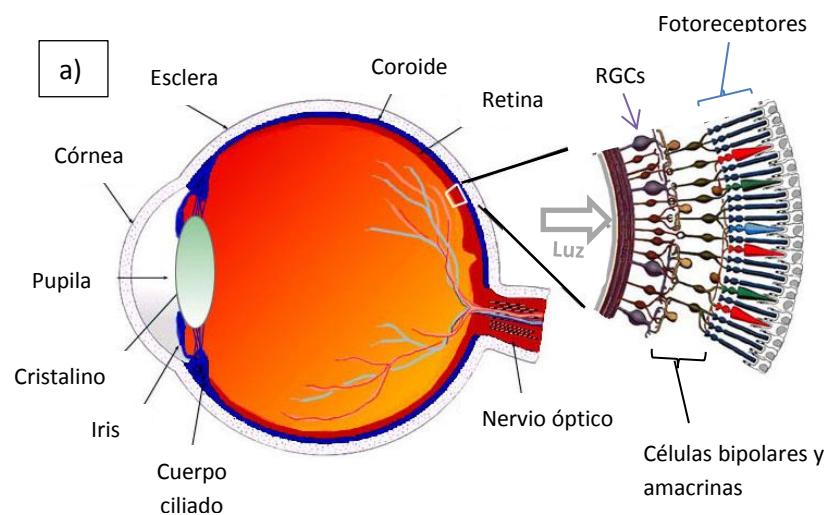
Índice

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. La retina.....	2
1.2. Las células ganglionares de la retina.....	3
1.3. La glía de la retina	4
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3.1. Preparación de los cultivos	6
3.2. Fijación de las células	7
3.3. Inmunocitoquímica	7
3.4. Microscopía de fluorescencia.....	8
3.5. Cuantificación.....	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4.1. Efecto del tiempo de cultivo en la supervivencia celular.....	9
4.2. Efecto del tiempo de cultivo en el número de RGCs con neuritas.....	12
4.3. Efecto del tiempo de cultivo en la longitud de las neuritas.....	12
4.4. Evaluación de la supervivencia de las ipRGCs en cultivo, y del número y longitud de sus neuritas	14
5. CONCLUSIONES	15
6. REFERENCIAS.....	17

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La retina

La retina es la capa de tejido sensible a la luz que se encuentra en la parte posterior interna del ojo y que constituye una parte especialmente diferenciada del sistema nervioso central. En ella se proyectan las imágenes que, gracias a las células que componen este tejido, pueden convertirse en señales eléctricas que son enviadas hasta las áreas del cerebro que procesan la información visual, que son principalmente el colículo superior y el núcleo geniculado lateral. De los diferentes tipos celulares que forman la retina unos de los más importantes son las células ganglionares (RGCs, del inglés Retinal Ganglion Cells). Estas células son neuronas que se encuentran situadas en la superficie interna de la retina en contacto con el humor vítreo. Los axones de estas células forman el nervio óptico, la estructura nerviosa que transmite la información visual desde el ojo hasta los centros visuales del cerebro.¹ Para que la señal visual llegue al cerebro a través de las células ganglionares es necesario que la luz atraviese la retina y llegue a los fotorreceptores (los conos y bastones), donde se produce la fototransducción, convirtiendo las señales luminosas en señales eléctricas. Estas señales se transmiten entonces a través de las células intermediarias, las células bipolares y amacrinas, hasta llegar la señal a las células ganglionares, responsables de transmitir la información a través del nervio óptico hasta los centros visuales del cerebro.



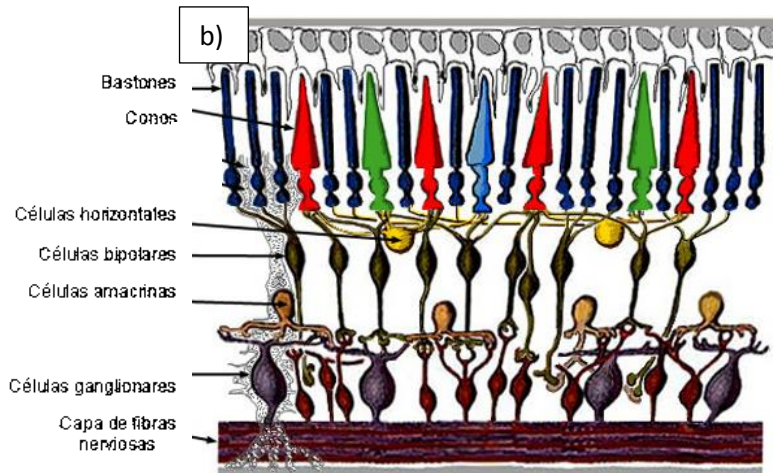


FIGURA 1. Representación esquemática de la estructura del ojo (a) y de la disposición de las células de la retina (b). En b), la célula que se encuentra detrás de la célula ganglionar en color gris es una célula de Müller.

1.2. Las células ganglionares de la retina

Las células ganglionares de la retina constituyen una población celular muy diversa, tanto morfológica como fisiológicamente. Cajal (1892) fue el primero que trató de clasificar morfológicamente estas células, y desde entonces numerosos científicos como Polyak han continuado con este trabajo.¹ Actualmente sabemos que los diferentes tipos morfológicos y funcionales de RGCs son similares entre especies debido a un camino evolutivo común. Se ha logrado clasificar las RGCs de numerosas especies como el gato, la rata, el ratón, el mono y el cerdo. El criterio morfológico común empleado ha sido el tamaño del soma (pequeño, mediano y grande) y las dimensiones del campo que ocupan las dendritas (pequeño, mediano y grande). Los árboles dendríticos de las RGCs determinan la posición, el tamaño y la forma de su campo receptivo.² La mayoría de mamíferos presentan en cuanto a su morfología los tipos de RGCs α y β , pero también existen más clases, como γ y δ (figura 2). Otros tipos son las células M y P, que transmiten sus señales a las capas magnocelular y parvocelular, respectivamente, del núcleo geniculado lateral de mamíferos.¹

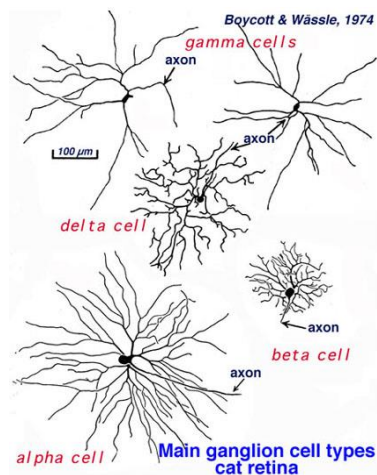


FIGURA 2. Representación de los tipos morfológicos α , β , γ y δ de RGCs.

Puesto que las RGCs no presentan una respuesta uniforme a los estímulos visuales se pueden clasificar también por su fisiología. En esta clasificación fisiológica se encuentran por ejemplo aquellas que presentan una respuesta ON/OFF y las direccionalmente selectivas. Las primeras se pueden clasificar en tres subtipos: ON, aquellas que transmiten el impulso desde que se inicia el estímulo hasta que termina; ON-OFF, aquellas que solo transmiten el impulso al inicio y al final del estímulo; y OFF, aquellas que solo transmiten el impulso una vez ha cesado el estímulo. Las direccionalmente selectivas responden preferentemente a estímulos que se transmiten en una determinada dirección.¹

En 2002, el fotorpigmento melanopsina se identificó en un subtipo de RGCs, que constituye alrededor del 1% del total de estas células. Las RGCs que expresan melanopsina (mRGCs), también llamadas “RGCs intrínsecamente fotosensibles” (ipRGCs, del inglés Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells) son una clase de fotorreceptores que tienen la singular propiedad de ser intrínsecamente fotosensibles debido a la expresión de este fotorpigmento. Gracias a él, mientras que otras RGCs pueden sufrir daños cuando se exponen a luz directa, estas células pueden absorberla y procesarla. Existen cada vez más evidencias de que estas células proyectan sus axones a muchas áreas del cerebro y tienen muchas funciones no visuales como el sueño, la cognición y la regulación de los ritmos circadianos.

Existen estudios que demuestran que no todos los tipos de RGCs son igualmente susceptibles a la muerte celular, y que hay diversos factores capaces de favorecer la supervivencia de algún tipo celular en concreto. El BDNF, por ejemplo, se ha visto que en cultivo aumenta el porcentaje de las RGCs grandes y que incrementa la longitud y el número de neuritas en RGCs de cerdo adulto.³ En el glaucoma, primera causa de ceguera irreversible, se ha visto una diferente susceptibilidad a la muerte de las RGCs dependiendo del tamaño y localización en la retina.^{4,5}

1.3. La glía de la retina

Para que las RGCs puedan actuar adecuadamente es necesaria la glía de la retina (células de Müller, astrogía y microglía) puesto que actúan como soporte y controlan la composición iónica, los niveles de neurotransmisores, etc.¹ El tipo principal de glía presente en la retina de mamíferos es la glía de Müller de la retina, cuyas extensiones rodean los cuerpos y neuritas de las RGCs (ver figura 1). Se ha demostrado que las diversas moléculas producidas por las células de la glía están implicadas en la supervivencia y crecimiento de las RGCs. Las células de Müller promueven la supervivencia de estas neuronas eliminando las moléculas

tóxicas de la matriz extracelular, por ejemplo niveles elevados de glutamato, y liberando moléculas neuroprotectoras, como el factor de crecimiento de fibroblastos y otros factores neurotróficos.⁶ Numerosos investigadores han observado que en ojos de ratas adultas con glaucoma hay una mejora en la capacidad de regeneración de las RGCs gracias a la moléculas secretadas por la glía de la retina, que reacciona cambiando su estado normal al de glía reactiva para tratar de reparar el daño producido por la enfermedad.⁷

Desde los años 80, numerosas investigaciones demuestran que las RGCs adultas de mamíferos son capaces de sobrevivir y desarrollar neuritas en condiciones de cultivo.⁹ Debido a la importante implicación de las RGCs en el glaucoma y otras patologías visuales que afectan al nervio óptico, la comprensión de su comportamiento en cultivo resulta de gran interés para tratar de mejorar su supervivencia y la regeneración de neuritas.

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son los siguientes:

- 1) Determinar el efecto del tiempo de cultivo en la supervivencia de las RGCs.
- 2) Determinar el efecto del tiempo de cultivo de las RGCs en la extensión y número de sus neuritas.
- 3) Determinar el tipo de RGCs que expresan melanopsina en cuanto a longitud y número de neuritas y evaluar la supervivencia de las ipRGCs en cultivo.

Esto confirmará o refutará la hipótesis de que no todos los tipos de RGCs son igualmente sensibles y por ello su supervivencia es diferente. Además, los resultados podrían ser utilizados posteriormente como control tanto en el estudio de modelos de glaucoma como en el del efecto de la adición de distintas moléculas a los cultivos de RGCs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron por triplicado utilizando dos retinas de rata adulta por cada experimento. De cada experimento se cultivaron 24 pocillos con células sobre cubreobjetos circulares de 13 mm tratados previamente con poli-L-lisina y laminina. En cada experimento 4 cubreobjetos fueron procesados para cada día de estudio (1, 2, 3, 4, 7 y 8).

3.1.Preparación de los cultivos

Preparación de los cubreobjetos: Se han utilizado cubreobjetos previamente esterilizados mediante autoclavado, que se incuban durante una hora a 37°C y 5% CO₂ en un filtrado de disolución de poli-L-lisina de 100 µg/ml en una placa de Petri de 90 mm. El filtrado de la disolución se ha realizado con un filtro de jeringuilla estéril de 0,2 µm. Después, los cubreobjetos se lavan dos veces con agua destilada y se colocan en una placa de 24 pocillos (uno por cada pocillo). Una vez en la placa, se dejan secar al aire en la cámara de flujo sin la tapa. Tras esto, se incuban cada cubreobjetos durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂ con 150 µl de disolución de laminina 10 µg/ml en PBS.

Disección: Se utilizan los ojos de ratas hembra Sprague Dawley adultas a los que se les extrae la retina. Esta se trocea con tijeras de disección en medio Neurobasal-A (Life Technologies, Gibco, UK) y después se le añaden 1,25 ml de disolución de papaína (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NY) en Earle's Balanced Salt Solution (EBSS; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NY) y 125 µl de DNasa (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NY) disuelta en EBSS. Se deja que las enzimas actúen durante 90 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se pasa al siguiente paso.

Preparación del cultivo: Se tritura la mezcla de la retina y los enzimas utilizando puntas azules de diámetro decreciente para disociar las células del tejido y se coloca en un tubo Falcon de 15 ml. A continuación se centrifuga a 280g durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Benchtop. Durante el tiempo de centrifugación se prepara el medio de resuspensión en otro tubo Falcon de 15 ml. Este medio contiene 675 µl de EBSS, 75 µl de inhibidor ovomucoide reconstituido de albúmina (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NY) y 37,5 µl de DNasa. Una vez terminada la centrifugación se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en el medio de resuspensión recién preparado.

A continuación, se realiza un gradiente de densidad discontinuo añadiendo 1,25 ml de inhibidor ovomucoide reconstituido de albúmina a un tubo Falcon de 15 ml. Sobre el gradiente, inclinando el tubo, se coloca la suspensión celular lentamente, con cuidado de no mezclarlo. Este tubo se centrifuga a 70g durante 6 minutos y se resuspende el pellet celular en 1 ml de medio, el cual se ha obtenido al mezclar 24,2 ml de medio Neurobasal-A, 500 µl de suplemento B27 (Life Technologies, Gibco, UK), 62,5 µL de L-Glutamina 200 mM (Life Technologies, Gibco, UK) y 25 µl de Gentamicina (Life Technologies, Gibco, UK).

Finalmente, se cuentan las células por mililitro utilizando un contador celular automático BioRad TC20 y azul de Tripán. Se ha obtenido un recuento de aproximadamente 3 millones de células/ml por cada dos ojos de rata.

Sembrado de células: La laminina se quita y la placa se lava añadiendo 500 μ l de medio Neurobasal-A a cada pocillo de la placa. Después se añaden aproximadamente $3 \cdot 10^5$ células/pocillo. Por cada experimento se siembran 24 pocillos en los cubreobjetos previamente cubiertos con 500 ml de medio que han estado unas horas en el incubador a 37°C y 5% CO₂.

3.2. Fijación de las células

Se fijan 4 cubreobjetos por día, tras 1, 2, 3, 4, 7 y 8 días in vitro (DIV). Para ello se transfieren los cubreobjetos de la placa de 24 pocillos (figura 3) a una cámara de humedad tras lavarlos 3 veces en PBS. La fijación tiene lugar con metanol, que se añade hasta cubrir cada uno de los cubreobjetos (unos 50 μ l). Estos se incuban con el fijador en el congelador durante 10 minutos. Tras este tiempo se lavan los cubreobjetos 3 veces en PBS y se guardan en una placa de 24 pocillos con PBS hasta que se vaya a realizar la inmunocitoquímica.

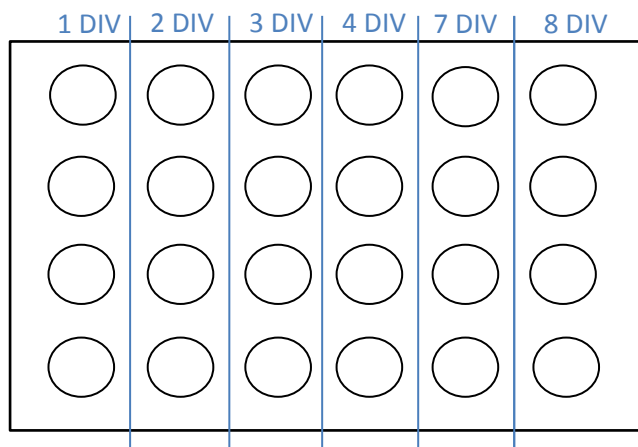


FIGURA 3. Representación esquemática de la placa de 24 pocillos utilizada para los tres experimentos. La fijación por días se ha realizado para los 4 cubreobjetos de cada columna, tal y como se observa en esta representación.

3.3. Inmunocitoquímica

Se incuban cada cubreobjetos en la cámara de humedad sobre 50 μ l de tampón de bloqueo (3% BSA y 0,1% Triton X-100 en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente para evitar las interacciones inespecíficas con los anticuerpos. A continuación se lavan los cubreobjetos 3 veces en PBS y se incuban cada uno de ellos sobre 50 μ l de la disolución de anticuerpos primarios anti- β III-tubulina 1:2000 monoclonal de ratón (Promega, Emerivile, USA) y anti-melanopsina 1:1000 policlonal de conejo (Pierce, Rockford, USA) durante 4 horas a temperatura ambiente.

Después se lavan los cubreobjetos 3 veces en PBS para luego incubar cada uno sobre 50 μ l de la disolución de anticuerpos secundarios Alexafluor 488 (1:800) de cabra anti-conejo IgG H+L (Life Technologies, USA), Alexafluor 555 (1:800) de cabra anti-ratón IgG H+L (Life Technologies, USA) y DAPI (0,1 μ g/ml) durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, se lavan cubreobjetos 3 veces en PBS y se procede al montaje, que se realiza en portaobjetos utilizando Fluor-Save como medio de montaje. Para evitar el movimiento de los cubreobjetos sobre el porta se rodean con laca de uñas transparente.

3.4. Microscopía de fluorescencia

Se realizan fotografías mediante el microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager M.1 y AxioCam MRM utilizando el programa Zen. Se han fotografiaron 10 campos a 10x de forma aleatoria en cada cubreobjetos, evitando fotografiar únicamente las zonas con alta densidad celular y poder obtener una estimación más real del número de células. Cada campo corresponde a 0,6 mm² a los aumentos a los que se han realizado las fotografías.

3.5. Cuantificación

El recuento de las células así como las medidas se realiza de forma manual utilizando el programa Image J. Por cada cubreobjetos estudiado se hace un recuento celular de 10 campos atendiendo a la siguiente clasificación: número de células y células con neuritas. Las células con neuritas se han diferenciado según su longitud: menos de 50 μ m, entre 50-200 μ m o más de 200 μ m. Finalmente se ha hecho la media y la desviación típica, así como un diagrama de barras para cada medida realizada en cada día de los tres experimentos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de cada uno de los tres experimentos se han analizado por separado debido a que entre ellos existen diferencias en el proceso de sembrado que se ha llevado a cabo y en el número medio de RGCs. Se quiere ver el efecto del tiempo de cultivo en la supervivencia celular (figura 4), en el número de RGCs con neuritas (figura 6) y en la longitud de dichas neuritas (figura 7). Se ha realizado para cada caso y en cada experimento una prueba T de Student de dos colas para muestras de igual varianza (homocedástica).

4.1. Efecto del tiempo de cultivo en la supervivencia celular

En primer lugar, se ha analizado la supervivencia celular. Para ello, representamos el número de células contadas manualmente y promediadas en área (figura 4).

Puesto que las RGCs adultas no pueden dividirse⁹, cabría esperar que, si no hay un factor que las haga morir, el número medio de estas células sea similar a medida que avanza el cultivo, tal y como ocurre en el experimento 3, en el cual no hay una diferencia significativa del número medio de RGCs entre unos días y otros según la prueba T de Student. Sin embargo, esto no es lo que se observa en los experimentos 1 y 2.

Experimento 1: La forma en que se realizó el sembrado de las células fue diferente en el primer experimento con respecto a los otros dos. Se sembró un número de células mucho más elevado que en el segundo y tercer experimento y, además, puesto que las células que se siembran no son únicamente RGCs sino una mezcla heterogénea de células de Müller, RGCs y otras células de la retina, al sembrar un número mucho mayor de células nos encontramos con que a los cubreobjetos del primer experimento se han adherido una gran cantidad de células de Müller. Esto se hace particularmente notable en los días 7 y 8, donde se observa que estas células gliales se localizan debajo de las ganglionares cubriendo todo el cubreobjetos (figura 5a).

Por otro lado, en este caso la placa se sembró por columnas, es decir, por días (ver figura 3), se han sembrado primero los pocillos que contienen los cubreobjetos a fijar tras 1 DIV y finalmente los de 8 DIV. Posiblemente este método de sembrado y una agitación insuficiente durante el proceso son la causa de que del día 1 al 3 no haya diferencias significativas, pero los días 4, 7 y 8 se vea un aumento significativo en el número de células (figura 4a). Por tanto, al no agitar bien durante el sembrado las células se han podido depositar en el fondo del tubo y esta es la razón más probable de que los últimos pocillos en sembrar, los de los días 7 y 8, sean los que más células tienen. Así pues, el sembrado no debe realizarse por días (por columnas) sino por filas y con agitación suficiente.

Experimento 2: En ese caso, sin embargo, el sembrado se hizo por filas, al igual que en el experimento 3. Puesto que en este experimento la T de Student indica que existen diferencias significativas entre unos días y otros se realiza un recuento celular de todos los campos con células de cada cubreobjetos de este experimento (aproximadamente entre 40 y 150 campos). Con esto se podrá comprobar si realmente existen diferencias significativas o si

el comportamiento es similar al del experimento 3. Los resultados obtenidos (tabla 1) indican que, como el comportamiento es parecido al del tercer experimento, el tamaño de muestra de 10 campos es insuficiente para obtener una estimación adecuada del número de RGCs.

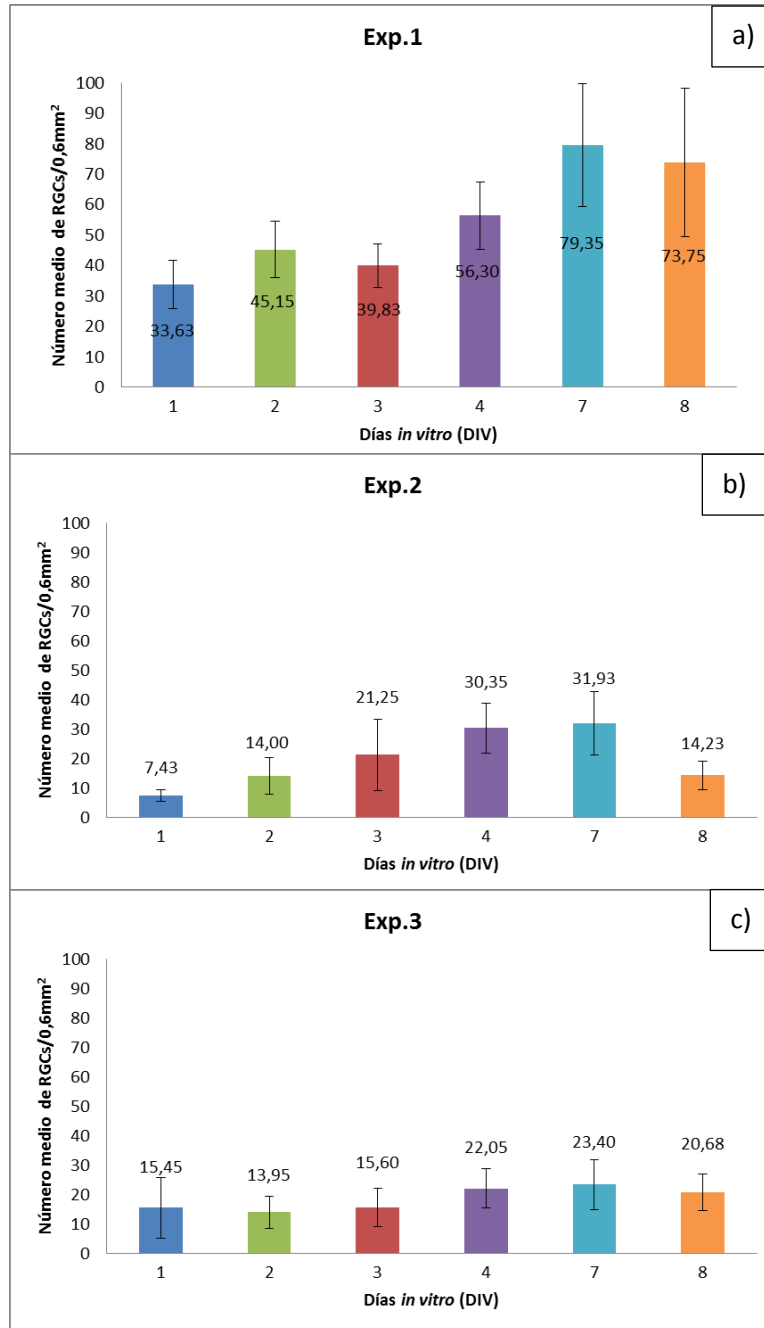


FIGURA 4. Representación de la media del número de RGCs/campo de cada uno de los tres experimentos para cada día *in vitro*. La T de Student indica que hay diferencias significativas entre los días 1 y 4; 1 y 7; 1 y 8; 2 y 7; 2 y 8; 3 y 4; 3 y 7; 3 y 8; 4 y 7 para el primer experimento y entre los días 1 y 3; 1 y 4; 1 y 7; 1 y 8; 2 y 3; 2 y 4; 2 y 7; 2 y 8; 4 y 8; 7 y 8 para el segundo experimento. El tercer experimento no presenta diferencias significativas.

1 DIV	2 DIV	3 DIV	4 DIV	7 DIV	8 DIV
4,91	9,07	13,75	11,63	11,18	6,68

Tabla 1. Número medio de RGCs/campo tras cuantificar todos los campos de los cubreobjetos del experimento 2.

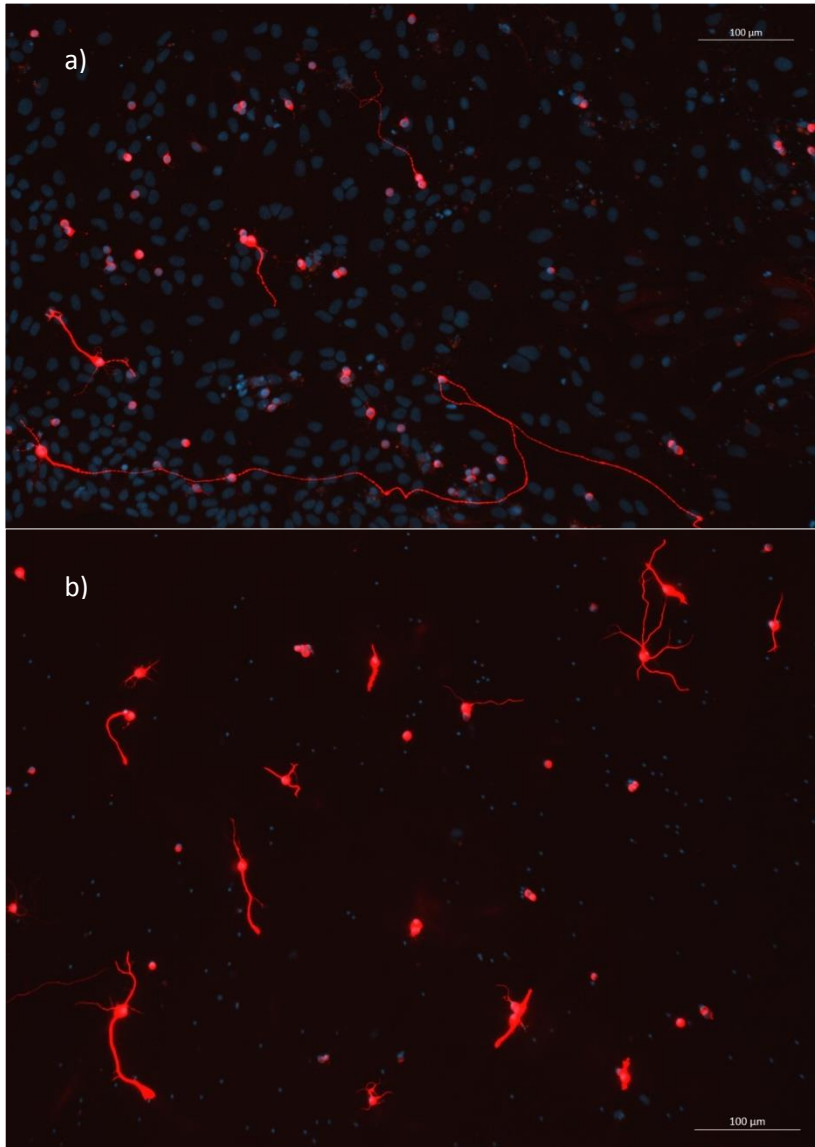


FIGURA 5. Núcleos teñidos con DAPI en azul y βIII tubulina de RGCs en rojo. (a) Campo correspondiente a 7 DIV del primer experimento y (b) del segundo. Se puede observar la diferencia en cuanto a células de Müller (núcleos grandes y ovalados), número de RGCs y número y longitud de neuritas de las RGCs.

Puesto que solamente en el tercer experimento es aproximadamente constante el número medio de RGCs/campo, este es el único que resulta fiable, por lo que en los siguientes apartados se va a proceder a analizar únicamente los resultados de este experimento.

4.2. Efecto del tiempo de cultivo en el número de RGCs con neuritas

En segundo lugar, se ha analizado el número de RGCs con neuritas, es decir, aquellas que presentan una o más neuritas. Para ello, representamos el porcentaje de células contadas manualmente que presentan neuritas y promediadas en área (figura 6).

A la luz de los resultados presentados en la figura 6, podemos afirmar que se produce una tendencia de aumento del número de RGCs con neuritas con el tiempo, siendo a partir del día 4-7 cuando se estabiliza el porcentaje de RGCs con neuritas.

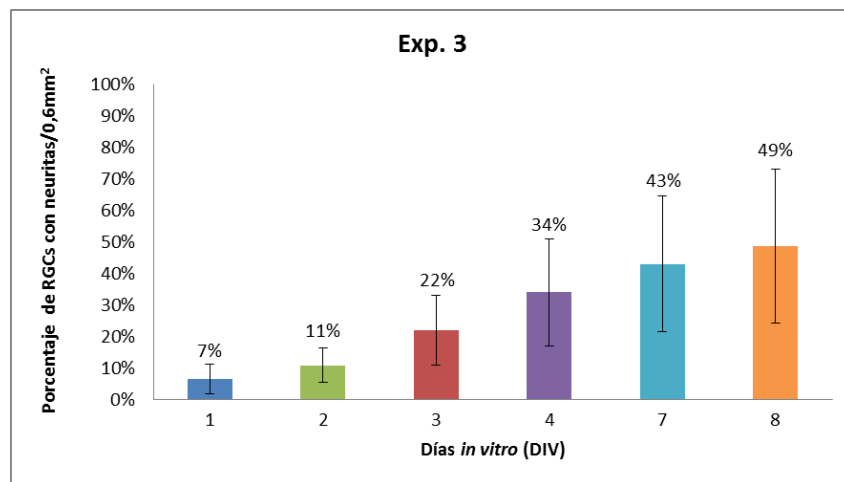


FIGURA 6. Representación de la media del número de RGCs con neuritas/campo del experimento 3 para cada día *in vitro*. La T de Student indica que hay diferencias significativas entre los días 1 y 3; 1 y 4; 1 y 7; 1 y 8; 2 y 3; 3 y 4; 3 y 7; 3 y 8; 4 y 7; 4 y 8.

4.3. Efecto del tiempo de cultivo en la longitud de las neuritas

En tercer lugar, se ha analizado la longitud de las neuritas. Para ello, representamos el porcentaje de células contadas manualmente que presentan neuritas para cada una de las longitudes consideradas (<50 μm , 50-200 μm y >200 μm) y promediadas en área (figura 6).

Las neuritas cortas (<50 μm) que se observan en las RGCs de los días 1-3 se han alargado para los días 4-8, lo cual implica que hay un número significativamente mayor de RGCs con neuritas de tamaño medio (50-200 μm) en los últimos días en cultivo debido al aumento repentino de la extensión de las neuritas. Puesto que el número de RGCs que comienzan a emitir neuritas cortas permanece aproximadamente constante a partir de los 4 DIV podemos afirmar que las RGCs continúan emitiendo de forma estable nuevas neuritas durante todo el tiempo que permanecen en cultivo.

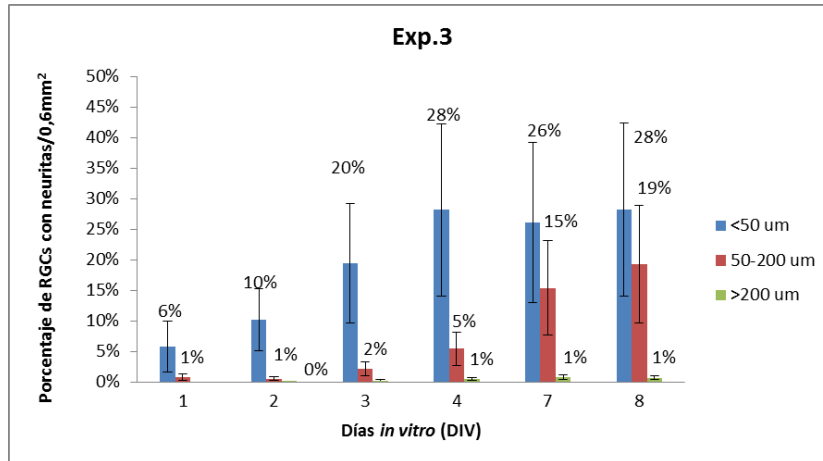


FIGURA 7. Representación de la media del número de RGCs con neuritas/campo del experimento 3 para cada día *in vitro*. La T de Student indica que hay diferencias significativas entre los días 1 y 3; 1 y 4; 1 y 7; 1 y 8; 2 y 3; 2 y 4; 2 y 7; 2 y 8; 3 y 4; 3 y 7; 3 y 8 para RGCs con neuritas cortas (<50 µm) y entre los días 1 y 7; 1 y 8; 2 y 4; 2 y 7; 2 y 8; 3 y 7; 3 y 8; 4 y 7; 4 y 8 para RGCs con neuritas de tamaño medio (50-200 µm).

	1 DIV	2 DIV	3 DIV	4 DIV	7 DIV	8 DIV
Cubreobjetos 1	0	1	0	0	0	1
Cubreobjetos 2	-	0	0	2	1	2
Cubreobjetos 3	-	0	1	1	2	2
Cubreobjetos 4	0	0	0	1	3	1

Taba 2. Número total de RGCs con neuritas de >200 µm tras cuantificar los 10 campos de los 4 cubreobjetos de cada día del experimento 3.

La aparición de RGCs con neuritas largas (>200 µm), tal y como se puede observar en la tabla 2, comienza tras 2 DIV y, puesto que su número se mantiene muy bajo, para este tipo de RGCs no se ha realizado el análisis de la T de Student.

4.4. Evaluación de la supervivencia de las ipRGCs en cultivo, y del número y longitud de sus neuritas

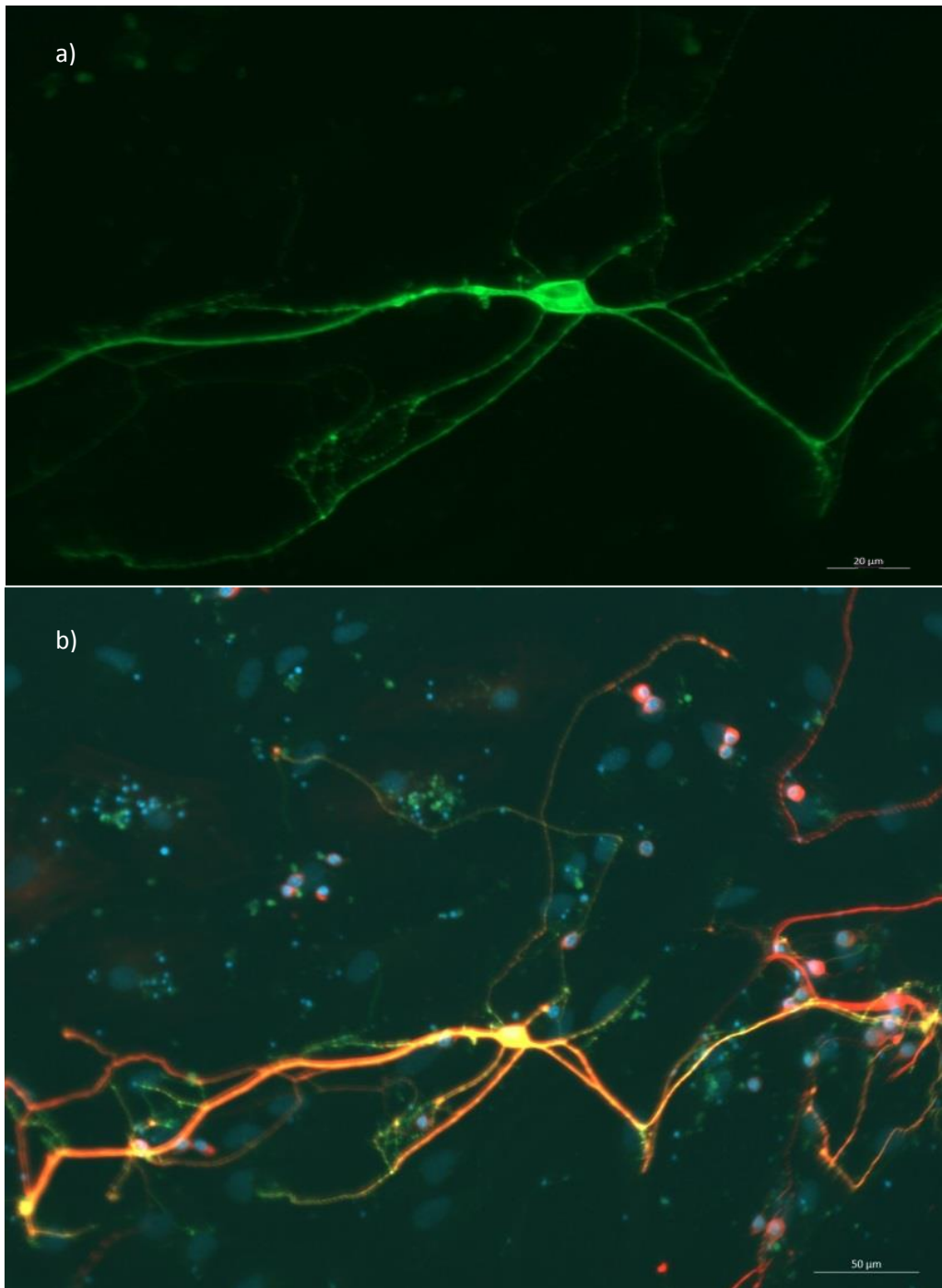


FIGURA 8. ipRGC encontrada en el primer experimento. (a) Fotografía a 20x únicamente con el marcaje para melanosina (verde). (b) Fotografía a 10x con el marcaje para melanosina, β III-tubulina y DAPI. En amarillo (debido a superposición de los marcadores de melanosina, en verde, y β III-tubulina, en rojo) se aprecia la ipRGC. De fondo (en azul) se observan los núcleos grandes y ovalados de las células de Müller que cubren todo el cubreobjetos.

Para analizar el crecimiento de las RGCs que expresan melanopsina, se han observado al microscopio de fluorescencia las muestras de los tres experimentos una por una buscando estas células. Estas RGCs se encontraron en una proporción muy escasa en las preparaciones, tan solo se han encontrado 2 ipRGCs en los 24 cubreobjetos del primer experimento. Puesto que las ipRGCs expresan melanopsina desde el momento del desarrollo embrionario en el que comienza la diferenciación de las células de la retina¹⁰, podrían haber aparecido en cualquier momento del cultivo. Esto nos da un indicio de que las ipRGCs son muy sensibles y que tan solo unas pocas son capaces de sobrevivir, en presencia de los factores y moléculas secretadas por la capa de células de Müller sobre la que crecen, tal y como ocurre en el primer experimento. Ambas ipRGCs halladas presentaban neuritas. Una de ellas tenía tres, y su neurita de mayor tamaño era de una longitud de entre 50 y 200 μm (figura 8b), mientras que la otra ipRGC presentaba numerosas neuritas y de una longitud mayor de 200 μm . Por lo tanto, aparentemente las ipRGCs que sobreviven en cultivo presentan varias ramificaciones de tamaño medio y largo.

5. CONCLUSIONES

Los experimentos realizados han servido para ver que la forma en la que se realiza el sembrado es importante. Además, es esencial analizar un tamaño de muestra grande en este tipo de estudios, puesto que tanto la variabilidad en la forma de sembrado como la heterogeneidad del medio de cultivo pueden afectar a las medidas.

El primer objetivo del presente estudio era determinar el efecto del tiempo de cultivo en la supervivencia de las RGCs. Con los estudios realizados podemos afirmar que la supervivencia de las RGCs *in vitro* tras 8 días es constante.

El segundo objetivo era determinar el efecto del tiempo de cultivo de las RGCs en la extensión y número de sus neuritas. Los resultados sugieren una tendencia de las RGCs a aumentar la producción de neuritas hasta los 4 DIV y a partir del día 4-7 esta producción se estabiliza. Las RGCs con neuritas de tamaño medio (50-200 μm) aparecen de forma significativa a partir del día 4, que es cuando se estabiliza el número de neuritas cortas (<50 μm), ya que en este momento las neuritas existentes comienzan a alargarse. En cuanto a las neuritas de gran tamaño (>200 μm) podemos afirmar que su aparición comienza tras 2 DIV y su número permanece muy bajo durante los 8 días que dura el cultivo.

En cuanto a las ipRGCs, estas son difíciles de cultivar debido a su elevada sensibilidad, y las moléculas secretadas por las células de Müller son necesarias tanto para su supervivencia como para el desarrollo de las múltiples neuritas de tamaño medio (50-200 μm) y largo (>200 μm) observadas.

6. REFERENCIAS

1. Webvision.med.utah.edu
2. Veiga-Crespo P, del Río P, Blindert M, Ueffing M, Hauck SM, Vecino E. Phenotypic map of porcine retinal ganglion cells. *Molecular Vision*. 2013; 19:904-916.
3. Garcia M, Ruiz Ederra J, Hernandez-Barbachano E, Urcola JA, Bilbao J, Araiz J, Duran JA, Vecino E. Retinal ganglion cell neuroprotection in culture. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2003; 78:151-157.
4. Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Experimental Eye Research*. 2006; 83:429-437.
5. Ruiz-Ederra J, Garcia M, Martin F, Urcola H, Hernandez M, Araiz J, Duran J, Vecino E. Comparison of three methods of inducing chronic elevation of intraocular pressure in the pig (experimental glaucoma). *Arch Soc Esp Oftalmo*. 2005; 80:571-579.
6. García M, Vecino E. Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol*. 2003; 18: 1205-1218.
7. García M, Forster V, Hicks D, Vecino E. Effects of Müller glia on cell survival and neuritogenesis in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophtalmol Vis Sci*. 2002; 43:3735-3743.
8. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Hannibal J, Montagna P, Sadun AA, Carelli V. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells: implications for human diseases. *Vision research*. 2011; 51:296-302.
9. Romano C, Hicks D. Adult retinal neuronal cell culture. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2007; 26:379-397
10. Fahrenkrug J, Nielsen HS and Hannibal J. Expression of melanopsin during development of the rat retina. *NeuroReport*. 2004; Vol. 15, No 5, 781-784.