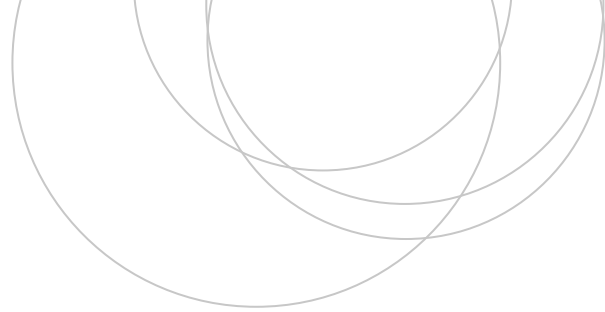




Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado

Grado en Biología

# Efecto de la glía de Müller de ballena en la neuroregeneración de las células ganglionares de la retina.

Autor/a:

Izaro Lizundia Arozena

Directora:

Xandra Pereiro Díez

Codirectora:

Ainhoa Iglesias Ara



## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Retina.....	5
1.2. RGCs.....	6
1.3. Regeneración de las RGCs.....	7
1.4. Células de Müller.....	7
1.5. Estudios previos de la ballena.....	8
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. Obtención de las células de Müller de ballena.....	10
3.2. MC de las células de Müller .....	10
3.3. Preparación del Co-cultivo de células Müller-RGCs.....	10
3.4. Cultivos de RGCs sobre las células de Müller.....	11
3.5. Cultivo de RGCs con el MC obtenido de las diferentes condiciones de células de Müller..	12
3.6. Fijación de las células.....	13
3.7. Inmunocitoquímica.....	13
3.8. Microscopio de fluorescencia.....	13
3.9. Cuantificación y estadística.....	13
4. RESULTADOS.....	14
5. DISCUSIÓN.....	19
6. CONCLUSIÓN.....	22
7. BIBLIOGRAFÍA.....	22



## RESUMEN

La retina es un tejido sensible a la luz situado en la parte posterior del ojo perteneciente al sistema nervioso central. Cuando se produce un daño o una enfermedad como por ejemplo el glaucoma, en el que se produce una degeneración progresiva de las células ganglionares de la retina (RGCs), conlleva a una pérdida de visión o incluso ceguera. Las células de Müller se encargan de mantener la integridad estructural y funcional de la retina, participan en la neuroprotección, supervivencia de las RGCs y además en estudios *in vitro* se ha demostrado que pueden contribuir a la regeneración neurítica de las RGCs. Trabajos previos del grupo de investigación demostraron que las células de Müller de la ballena boreal, aumentaban notablemente la elongación de las neuritas de las RGCs, para estudiar esta capacidad neuroregenerativa, se immortalizaron creando la línea celular W21M. Para comprobar si, tanto las células de Müller immortalizadas como las primarias en diferentes pases mantienen la capacidad neuroregenerativa de las células primarias de Müller de ballena, en el presente trabajo, se ha estudiado el efecto que tienen las células de Müller de ballena immortalizadas y primarias de pase 4 y 7 en co-cultivo con RGCs de rata. También se ha analizado el efecto del medio condicionado (MC) recogido de los cultivos de células de Müller de ballena immortalizadas y primarias de pase 4 y 7 en cultivos de RGCs. En los resultados obtenidos, hemos comprobado que los co-cultivos con células de Müller primarias de pase 4 son las que tienen mayor supervivencia de RGCs. Sin embargo, en los cultivos con MC obtenido de células de Müller de pase 7, observamos que pierden esta capacidad, con una disminución en la supervivencia de RGCs. Estos datos demuestran que el envejecimiento de las células de Müller afecta a su capacidad neuroprotectora. Al analizar el efecto de las células de Müller en la neuroregeneración de las RGCs hemos visto que la elongación de las neuritas de las RGCs aumenta en co-cultivo con las células de Müller primarias de pase 4 y 7 más que cuando las RGCs se co-cultivan con las células immortalizadas, lo que sugiere que las células immortalizadas no tienen tanto efecto neuroregenerador como las células primarias. Este resultado se confirma en los experimentos con MC, en donde el efecto más neuroregenerador se produce con el MC de primarias de pase 4. En conclusión, el envejecimiento celular afecta negativamente a la supervivencia de las RGCs y la immortalización de las células de Müller de ballena hace que pierda la alta capacidad neuroregenerativa de las RGCs que si mantienen las células de Müller primarias.

## ABSTRACT

The retina is a light-sensitive tissue located at the back of the eye that belongs to the central nervous system. When damage or disease happens, such as glaucoma, where progressive degeneration of the retinal ganglion cells (RGCs) occurs, it leads to vision loss or even blindness. Müller cells are responsible for maintaining the structural and functional integrity of the retina, participate in neuroprotection, survival of RGCs and *in vitro* studies have shown that they can contribute to the neuritic regeneration of RGCs. Previous work from the research group demonstrated that Müller cells from the northern whale significantly increased the elongation of neurites of RGCs; in order to study this neuroregenerative capacity, they were immortalized by creating the W21M cell line. To test whether both immortalized and primary Müller cells in different passages maintain the neuroregenerative capacity of primary whale Müller cells, the effect of immortalized and primary

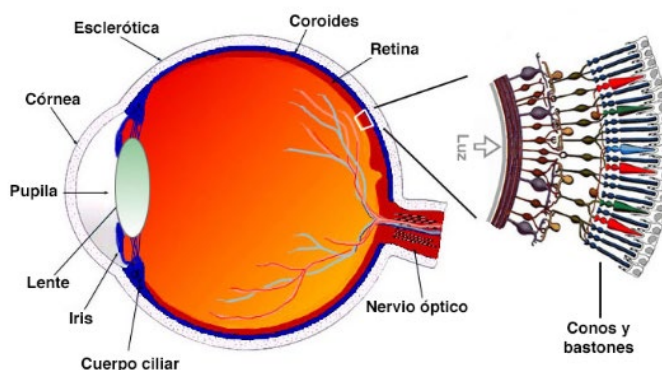


whale Müller cells of passages 4 and 7 in co-culture with rat RGCs has been studied in the present work. We have also analyzed the effect of conditioned medium (CM) collected from immortalized and primary passage 4 and 7 whale Müller cell cultures on RGC cultures. In the results obtained, we found that co-cultures with primary Müller cells at pass 4 had the highest survival of RGCs. However, in cultures with MC obtained from Müller cells at passage 7, we observed that they lose this capacity, with a decrease in the survival of RGCs. In other words, these data demonstrate that aging of Müller cells affects their neuroprotective capacity. When analyzing the effect of Müller cells on the neuroregeneration of RGCs we have seen that the elongation of neurites of RGCs increases in co-culture with primary Müller cells at passage 4 and 7 more than when RGCs are co-cultured with immortalized cells, suggesting that immortalized cells do not have as much neuroregenerating effect as primary cells. This result is confirmed in experiments with CM, where the most neuroregenerating effect occurs with CM from passage 4 primary cells. In conclusion, cellular aging negatively affects the survival of RGCs and immortalization of whale Müller cells causes them to lose the high neuroregenerative capacity of RGCs that primary Müller cells do maintain.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Retina

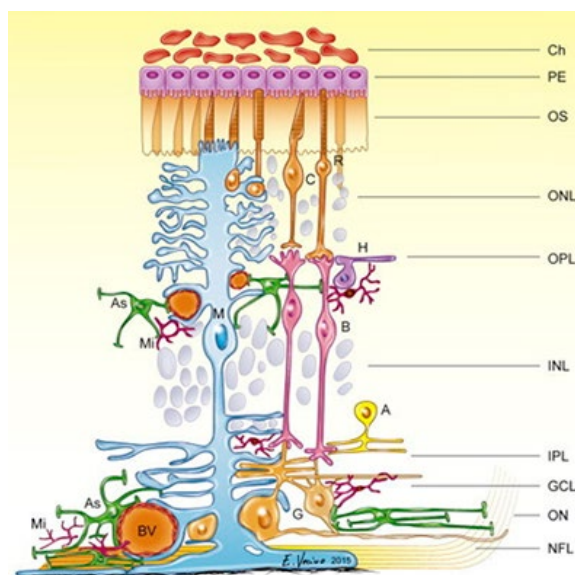
La retina es una fina capa de tejido que se encuentra en la parte posterior del ojo. Aunque forma parte de la estructura ocular, se considera parte del sistema nervioso central (SNC), y por ello, tiene la función de recoger la luz y transformarla en señales neuronales que el cerebro interpreta posteriormente como imágenes (**Figura 1**) (Kolb et al., 1995).



**Figura 1.** Dibujo de la sección vertical sagital del ojo humano con una ampliación esquemática de la retina (Kolb et al., 1995).

La retina desde la capa más externa a la capa más interna se encuentra la capa limitante externa, capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna, capa de células ganglionares, capa de fibras del nervio óptico y la capa limitante interna (**Figura 2**) (Vecino et al., 2016). Dentro de estas capas se encuentran diferentes tipos de células, entre ellas, las neuronas y células gliales.

Las neuronas de la retina se clasifican en cinco tipos: las células fotorreceptoras (conos y bastones) que son responsables de detectar la luz y el color. Las células bipolares, que establecen sinapsis entre los fotorreceptores y las células ganglionares de la retina (RGCs) para procesar y transmitir la información visual. Las RGCs, recogen la información y la envían a través de sus axones fuera del ojo formando el nervio óptico hasta el cerebro. Por último, las células amacrinas y las horizontales que establecen conexiones entre las neuronas ya mencionadas. Las células gliales por otra parte, se diferencian por no tener axones, dendritas ni conductos nerviosos gliales. Estas proporcionan apoyo estructural y metabólico a las neuronas. Entre este tipo de células encontramos las células de Müller, que son las células gliales predominantes en la retina, los astrocitos y la microglía (Vecino et al., 2016) (Mahabadi y Al Khalili, 2022) (**Figura 2**).



**Figura 2. Esquema de las capas de la retina y las células que lo forman.** Las capas de la retina: epitelio pigmentario (PE), capa limitante externa (OS), capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme interna (IPL), capa de células ganglionares (GCL) y la capa de fibras del nervio óptico (NFL). Las células de la retina: Células fotorreceptoras (C y R), células amacrinas (A), células bipolares (B), células horizontales (H), células de Müller (M) y las células ganglionares (G) (Vecino et al., 2016).

Los axones de las RGCs son los que transmiten la información visual al cerebro, y, por lo tanto, cuando se produce un daño, al ser neuronas del SNC, no es posible regenerarlas, produciendo una disminución en la visión. La glía de Müller se caracteriza por sus funciones metabólicas activas que confieren neuroprotección a la retina además de proporcionarle factores tróficos que inducen el crecimiento neurítico (Eastlake et al., 2020). Si bien la interacción entre las RGCs y las células de Müller ha sido extensivamente estudiada, todavía queda por esclarecer cuál es el papel de las células de Müller de ballena sobre las RGCs de rata. Debido a esto, este trabajo se ha analizado cómo influyen las células de Müller de ballena en la regeneración neurítica de las RGCs.

## 1.2 RGCs

Las RGCs se sitúan en la capa más interna de la retina, son las que forman el nervio óptico y envían la información visual al cerebro siendo sus axones los únicos que salen de la retina (*Ganglion Cell Physiology by Ralph Nelson – Webvision*, s. f.). Inicialmente durante el desarrollo embrionario de la retina, las RGCs desarrollan pequeñas prolongaciones denominadas neuritas. Tras la polarización neuronal, una de estas neuritas crece más que las otras y se convierte en el axón, mientras que las otras neuritas se convierten en las dendritas (Kevenaar y Hoogengaad, 2015). El citoesqueleto neuronal, compuesto por microtúbulos (MT), filamentos de actina y neurofilamentos, desempeña importantes funciones tanto en el establecimiento como en el mantenimiento de la polaridad neuronal, la morfología y la integridad de los axones. Los MT son polímeros cilíndricos formados por heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, siendo la  $\beta$  III-tubulina comúnmente utilizada para marcar específicamente las RGCs (Kevenaar y Hoogengaad, 2015) (Carmona, 2004).



A lo largo de los años, las RGCs se han clasificado en distintos grupos. La subdivisión más utilizada surge dependiendo del lugar de la proyección de sus axones (tipo M o P). A su vez, se pueden clasificar basándose en el tamaño del cuerpo celular, la morfología y la ramificación dendrítica o los niveles de estratificación en la capa plexiforme interna (VeigaCrespo et al., 2013).

Las RGCs tienen axones muy largos, esto aumenta su vulnerabilidad, además existen diferentes enfermedades que afectan a estas neuronas. En el glaucoma, por ejemplo, debido a la subida de la presión intraocular (IOP) hay una muerte progresiva de las RGCs. En la neuritis óptica, cuya patogénesis es un proceso inflamatorio y desmielinizante del nervio óptico, también se daña el nervio óptico, así como en muchas otras enfermedades que pueden derivar en la pérdida de la visión. Debido a su importancia, en el presente trabajo se ha estudiado la regeneración de las RGCs.

### 1.3 Regeneración de las RGCs

El SNC de los mamíferos adultos, como por ejemplo los axones lesionados de las RGCs, no se regeneran espontáneamente tras una lesión, mientras que los axones del sistema nervioso periférico (SNP) de los mamíferos y los de la mayoría de los invertebrados y vertebrados no mamíferos si tienen capacidad de regenerarse. Los fallos en la regeneración de los axones tras una lesión del SNC suelen provocar discapacidades permanentes. Por lo tanto, la capacidad de una neurona para regenerar el axón es vital para la recuperación de la función (Curcio y Bradke, 2018) (Williams et al., 2020).

Sin embargo, en estudios previos, se ha visto que las RGCs son capaces de regenerarse parcialmente *in vitro* (Vecino et al., 2015). En cultivo, después de someter a la retina a una digestión enzimática en la que las RGCs pierden sus prolongaciones, éstas son capaces de regenerar sus neuritas. Por lo tanto, los estudios *in vitro* de estas neuronas, son el modelo ideal para estudiar la regeneración neurítica, pudiendo probar diferentes condiciones y moléculas que puedan ayudar a mejorar e incrementar su regeneración (Yin y Benowitz, 2017).

El potencial de las células gliales para proteger y ayudar a la neuroregeneración de las neuronas de la retina y en concreto el de las células de Müller, está generando mucho interés entre la comunidad científica en los últimos años (Boia et al., 2020) (García et al., 2002) (García et al., 2003). En este trabajo, estudiaremos la neuroprotección y neuroregeneración que ejercen las células de Müller de ballena, a las RGCs.

### 1.4 Células de Müller

Las células de Müller, también conocidas como glía de Müller, son un tipo de células gliales especializadas que se encuentran en la retina de los animales vertebrados (Sarchy and Ripps, 2001) (de Melo Reis et al., 2008). Representan la mayor población de células gliales en la retina de los mamíferos, el 80-90% del total de las células gliales (Au y Ma, 2022). Deben su nombre a Heinrich Müller, un anatomista alemán que las describió por primera vez en 1851. Estas células se extienden por todo el espesor de la retina, desde la ILM hasta la OLM. Están en contacto con todas las neuronas de la retina y proporcionan estabilidad estructural.

Las células de Müller se consideran los principales reguladores de la señalización neuronal dentro de la retina (Eastlake et al., 2020). También desempeñan diferentes funciones como: la regulación del

entorno extracelular (manteniendo el equilibrio iónico del líquido extracelular de la retina), eliminación de residuos y regulan los niveles de  $K^+$ . Estas células, además, se encargan de eliminar el exceso de glutamato, un neurotransmisor que puede ser tóxico para las neuronas de la retina si se encuentra en altas concentraciones. Las células de Müller captan el exceso de glutamato del entorno extracelular y lo convierte en glutamina, una función que se ejerce mediante la expresión de la enzima glutamina sintetasa por lo que se considera una importante función neuroprotectora. Además, las células de Müller son fuentes intrínsecas de proteínas neuroprotectoras (Hauck y Ueffing, 2009) (Eastlake et al., 2020).

La glía de Müller es capaz de secretar factores neurotróficos, factores de crecimiento endógenos necesarios para la supervivencia de las neuronas, que pueden contribuir tanto a la supervivencia de las neuronas de la retina como al crecimiento neurítico (García et al., 2002) (Raju y Bennett, 1986). Los factores neurotróficos pertenecen a una familia de proteínas altamente conservadas que incluye el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico ciliar (CTNF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) o el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (Vecino et al., 2016), el factor trófico derivado de plaquetas (PDGF) (Lefevre et al., 2021), la Apolipoproteína E (ApoE) (Lorber et al., 2009) entre otros muchos factores. También pueden controlar el crecimiento neurítico de las RGCs mediante la activación de receptores P2, como el receptor P2Y6 (Taguchi et al., 2016). Estudios previos del grupo también han comprobado este efecto de las células de Müller primarias en las RGCs, tanto en la supervivencia como en el crecimiento neurítico. Por ejemplo, en cultivos primarios de células de Müller y RGCs de cerdo (García et al., 2002), en cultivos primarios de células de Müller y RGCs de rata (Ruzafa, 2015) y el efecto de las células primarias de Müller de ratón en el crecimiento neurítico de RGCs derivadas de células madre (Pereiro, 2020).

### **1.5 Estudios previos del grupo de investigación con células de Müller obtenidas de ballena (*Balenoptera borealis*)**

En el año 2019 y 2021, el grupo de investigación donde he realizado el presente estudio, el grupo GOBE, de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), tuvieron acceso al estudio del ojo de un rorcual boreal. Obtuvieron cultivos primarios de células de Müller de ballena, estudiaron sus características y las co-cultivaron con RGCs de rata, estudiando tanto la supervivencia de estas neuronas en co-cultivo, como su efecto en la elongación neurítica en cultivo. Los resultados de estos experimentos, indicaron que las RGCs de rata eran capaces de elongar sus neuritas al menos tres veces más que cuando estas células se co-cultivaban con células de Müller de rata o cerdo (anteriormente publicado por este laboratorio) (García et al., 2002) (Ruzafa, 2015). Después, se analizaron los secretomas de estas células de Müller de ballena, identificando un mayor número de proteínas implicadas en la elongación neurítica (actualmente este estudio se encuentra en revisión). Como estas células tienen un periodo de vida limitado, ya que son células primarias, y debido a la importancia de los resultados obtenidos y a la dificultad de obtener más células de ballena, el grupo de investigación decidió congelar las células de ballena a diferentes pases y también inmortalizarlas (Pereiro et al., 2022). Las células se inmortalizaron usando un lentivirus que expresa el antígeno T grande del SV40, que interactúa con los supresores tumorales p53 y retinoblastoma (Rb) y los inhibe (Pereiro et al., 2022). Sin embargo, la inmortalización afecta a las células de Müller, ya que comprobaron que muestran una





expresión distintiva de algunos marcadores moleculares. Por ejemplo, observaron un aumento de marcadores de desdiferenciación como  $\alpha$ -SMA y  $\beta$ -III tubulina en las células de Müller immortalizadas (Pereiro et al., 2022).

El grupo también estudió la viabilidad de las células de Müller immortalizadas y primarias en cultivo. En el caso de las células de Müller transducidas con antígenos SV40 T se consideraron immortalizadas a partir del pase 11, y mantuvieron altos niveles de viabilidad en todos los pases. En el caso de las células de Müller primarias, la viabilidad disminuyó en cada pase y se consideró que los cultivos habían alcanzado la senescencia en el pase 8 (Pereiro et al., 2022).

Basándonos en estos estudios, en este trabajo, queremos saber si los cambios que se producen en la immortalización pueden afectar a la capacidad de crecimiento neurítico. También queremos estudiar cómo afecta el envejecimiento en las células de Müller primarias, y así comprobar si esto afecta a la capacidad neuroprotectora y a la regeneración neurítica.

## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Las células de Müller favorecen la elongación neurítica y la supervivencia de las RGCs, y en estudios previos se ha demostrado que las células de Müller primarias de ballena incrementan esta elongación más que las células de Müller de modelos animales previamente estudiados. La hipótesis de este trabajo es que las células de Müller de ballena immortalizadas y células primarias de pases altos mantienen la capacidad de incrementar la elongación neurítica de las RGCs *in vitro*.

Para responder esta hipótesis, nuestros objetivos son:

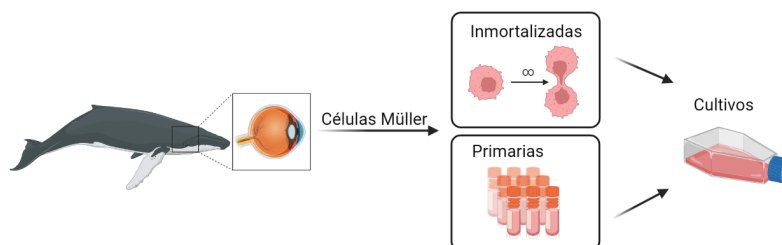
1. Analizar la supervivencia de las RGCs de rata en co-cultivo con las células de Müller de ballena immortalizadas y primarias a pase 4 y 7 de cultivos.
2. Analizar la supervivencia de las RGCs de rata crecidas con MC obtenido de cultivos de células de Müller de ballena immortalizadas y primarias de pase 4 y 7 de cultivos.
3. Determinar la elongación o crecimiento neurítico de las RGCs de rata en co-cultivo con las células de Müller de ballena immortalizadas y primarias a pase 4 y 7 de cultivos.
4. Determinar la elongación o crecimiento neurítico de las RGCs de rata crecidas con MC obtenido de cultivos de células de Müller de ballena immortalizadas y primarias de pase 4 y 7 de cultivos.

## 3. MATERIAL Y METODOS

### 3.1 Obtención de las células de Müller de ballena

Para estudios anteriores del grupo GOBE se recogió un ojo de ballena, de la especie *Balaenoptera borealis*, varada 24h post mortem. Se cultivaron las células de Müller siguiendo el protocolo establecido (Pereiro et al., 2020). De las células de Müller que obtuvieron algunas fueron congeladas

en diferentes países y también se immortalizaron constituyendo la línea celular de Müller de Ballena W21M (Pereiro et al. 2022) (Figura 4).



**Figura 3.** Esquema de la obtención de las células Müller de ballena.

En este estudio, se ha trabajado con células de Müller immortalizadas hasta el pase 27 y primarias de pase 4 y 7. Primero se descongelaron las células Müller immortalizadas y primarias de ballena. Se mantuvieron en un flask de 10mL en la incubadora (37°C y 5% de CO<sub>2</sub>) en un medio con suero, DMEM + %10 FBS (medio de Müller), con cambios de medio parciales (5mL) cada dos días hasta que los cultivos fueran confluentes. Cuando los cultivos fueron confluentes se subcultivaron. Para ello se retiró todo el medio y se lavó 3 veces con PBS (Life Tech) estéril, después se añadieron 3mL de tripsina y se incubó 4 minutos a 37° para que se despegaran las células del flask. A continuación, se añadieron 3mL de medio de Müller para parar la reacción y se centrifugó durante 5 minutos a 1200rpm. Por último, se quitó el sobrenadante y se resuspendió en medio de Müller.

### 3.2 MC de las células de Müller

El MC se recogió cuando los cultivos de células de Müller habían alcanzado la confluencia. Para ello hay que eliminar el suero, por lo tanto, primero se lavaron los pocillos tres veces con medio DMEM suplementado con 1% de l-glutamina y 0,1% de gentamicina (Thermo-Fisher Waltham, MA, EE.UU.). A continuación, se cultivaron las células durante dos horas con DMEM sin suero para eliminar el resto de FBS. A continuación, se cambió el medio, para eliminar los posibles restos de suero y se incubó durante dos días. Para su recogida, se esterilizó el medio recogido pasándolo por un filtro de 0,22µm. El MC se congeló en alícuotas de 1mL a -20 °C.

### 3.3 Preparación del Co-cultivo de células Müller-RGCs

**Preparación del cubreobjetos.** Los cubreobjetos de cristal que sirvieron de soporte para las células se esterilizaron mediante autoclavado y se incubaron 30 minutos en la incubadora (37°C y 5% de CO<sub>2</sub>) en una disolución filtrada (filtro de jeringa de 0,2 µm) de 100µm de poli L-lisina (Sigma). A continuación, se lavaron 2 veces con agua destilada y cada uno de ellos se colocó en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Cuando los cubreobjetos estuvieron completamente secos se añadió 10µL de laminina (Sigma) en PBS (Life Tech) estéril y se incubó 2 horas en la incubadora.

**Cultivo de las células.** La placa de 24 pocillos que había sido incubada con laminina se lavó con PBS (Life Tech) estéril. Las células de Müller se cultivaron con medio de cultivo de células de Müller. Se sembraron 10.000 células de Müller en cada pocillo y el volumen final de cada pocillo era de 500 µL.

Dejamos pocillos sin cultivar las células de Müller, estos serán los cubres de control para RGCs, que solo contienen poli L-lisina y laminina.

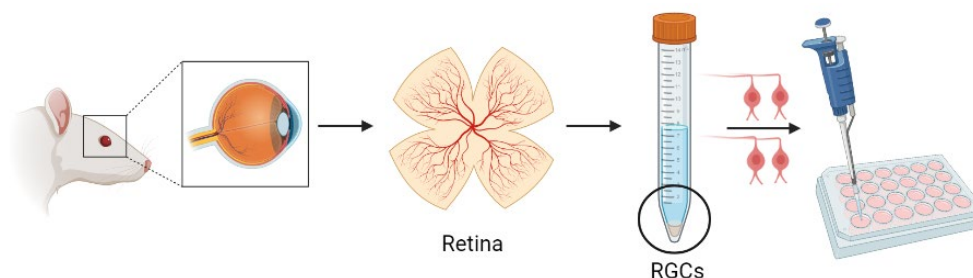
**Mantenimiento del cultivo.** Se mantuvo en el incubador durante 24 horas para ayudar a que las células se adhirieran al sustrato previo al cultivo con RGCs.

### 3.4 Cultivos de RGCs sobre las células de Müller

Todos los protocolos experimentales cumplieron la normativa europea (2010/63/UE) y española (RD53/2013) sobre protección de animales de experimentación, y fueron aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad del País Vasco.

**Disección del tejido.** El ojo de rata se manipuló en medio CO<sub>2</sub> independiente (Life Tech) con gentamicina (1:1000, Life Tech). Con pinzas y tijeras de microcirugía se extrajo la retina, se dirigió en 625µL de papaina (Worthington Lab, Papain Dissociation kit) y 50 µL de DNasa I (Worthington Lab, Papain dissociation kit) y se incubó 90 minutos en la incubadora.

\*El autor de este trabajo únicamente participó como observador en la realización de este apartado, debido a no poseer un título que lo autorice a realizar experimentación animal.

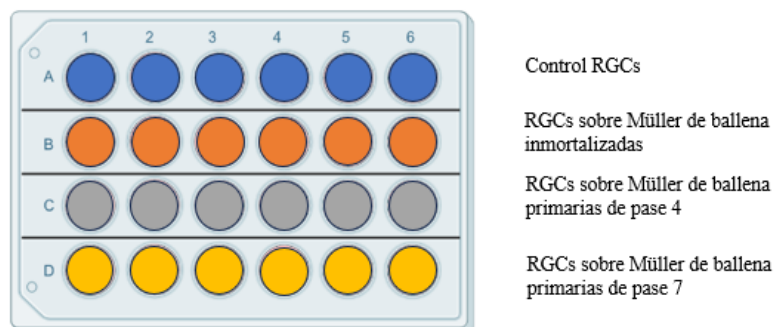


**Figura 4.** Esquema del cultivo de las RGCs sobre células Müller de ballena.

**Preparación de las células.** Después de la disociación enzimática, el tejido se terminó de disgregar con un suave pipeteo utilizando puntas de pipeta cortadas en gradiente decreciente. La suspensión celular fue introducida en un tubo Falcon de 15mL y se centrifugó a 1.200rpm durante 5 minutos. A continuación, el sobrenadante se eliminó y el sedimento celular se resuspendió en medio de resuspensión: 337,5µL de EBBS (Worthington Biochemical Corporation) y 37,5µL de inhibidor ovomucoide de albumina (Worthington Biochemical Corporation) y 18,75µL de DNasa I. El resuspendido celular se añadió muy lentamente en un tubo Falcon de 15mL inclinado 45° que contenía 1,25mL de inhibidor ovomucoide de albumina formando un gradiente de densidad discontinuo. Posteriormente se centrifugó 600rpm durante 6 minutos. El sedimento se resuspendió en 1mL de medio de cultivo de RGCs: 24,4mL de Neurobasal-A (Life Tech), 500µL de suplemento B-27 (Life Tech), 62,5µL de L-glutamina (2Mm, Life Tech) y 125µL de gentamicina (50mg/mL, Life Tech).

**Sembrado de las células.** Para sembrar las RGCs, sacamos del incubador la placa con los controles y los cultivos de células de Müller preparados el día anterior, quitamos el PBS a los controles y el medio a la placa de 24 pocillos que había pasado un día en incubación con las células de Müller de las diferentes condiciones. Se sembró el mismo número de RGCs en todos los pocillos y se añadió

medio de cultivo de RGCs (NBA B27) hasta llegar a 500 $\mu$ L; se guardó la placa en la incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 5). El cultivo se mantuvo hasta el día de fijación (a día 6) cambiando cada dos días la mitad del volumen del medio, para retirar las células no adheridas y el *debris*.



**Figura 5.** Esquema del sembrado de las células en la placa de 24 pocillos.

### 3.5 Cultivo de RGCs con el MC obtenido de las diferentes condiciones de células de Müller

Se preparó la placa de 24 pocillos y se extrajeron las RGCs de rata como se ha explicado anteriormente. Añadimos el resuspendido celular de RGCs y el medio de cultivo de RGCs hasta llenar el volumen de 500 $\mu$ L a la placa de 24 pocillos, en este caso las RGCs se sembraron encima de los cubreobjetos con poli-L-lisina y lamina. Se mantuvo la placa en la incubadora (37°C y 5% de CO<sub>2</sub>). Al día siguiente se quitaron 250 $\mu$ L de medio y se añadieron 250 $\mu$ L de MC obtenido de células Müller inmortalizadas y células Müller primarias de pase 4 y 7. La placa se mantuvo en la incubadora. A los pocillos de control, se les hizo un cambio de medio de RGCs (NBA B27) parcial el segundo día de incubación. El cultivo se mantuvo cambiando cada dos días 125 $\mu$ L de medio de RGCs y 125 $\mu$ L de MC durante seis días, hasta su fijación.

### 3.6 Fijación de las células

Al sexto día de cultivo se fijaron las células; para ello se eliminó el medio de cultivo de la placa de 24 pocillos y se lavó 3 veces con PBS. A continuación, se añadieron 300 $\mu$ L de metanol frío (-20°C) y se incubó durante 10 minutos a -20°C; transcurrido este tiempo se lavó 3 veces con PBS.

### 3.7 Inmunocitoquímica

Para hacer la inmunocitoquímica se preparó la cámara de humedad y se dispuso un papel de Parafilm con la parte estéril hacia arriba. Una vez se hubieron fijado las células, se incorporaron 40 $\mu$ l de blocking buffer (Tritón X-100 y BSA3% -álbumina de suero bovino- en PBS) en el Parafilm para permeabilizar la membrana celular y bloquear la unión inespecífica del antígeno durante 30 minutos a temperatura ambiente con el cubreobjetos con la zona de las células hacia abajo.

A continuación, se colocó sobre el Parafilm, gotas de 40 $\mu$ l de tampón de bloqueo con la dilución de anticuerpos primarios, se posaron los cubreobjetos sobre ellos y se incubó 1 noche a 4°C (Tabla 1). Tras esto, los cubreobjetos con los anticuerpos fueron lavados 3 veces en PBS, se colocaron sobre

gotas de 40µl de tampón de bloqueo con los anticuerpos secundarios y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron cabra anti-conejo 488 y cabra anti-ratón 555 con una dilución de 1:1000 y se añadió DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 1:10000 para marcar los núcleos de las células. Después, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y 1 en agua destilada. Finalmente, se montaron sobre portaobjetos utilizando FluorSave (Millipore).

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios usados.

Anticuerpo	Células marcadas	Huésped	Dilución
B(III) tubulina	RGCs	Ratón	1:1000
Vimentina	Células de Müller	Conejo	1:1000
DAPI	Núcleos		1:10000

### 3.8 Microscopio de fluorescencia

Las muestras se observaron y analizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axio Image M.1 Jena, Alemania) acoplado a una cámara digital (Zeiss Axiocam MRM, Jena, Alemania) utilizando el programa Zen (Zeiss).

### 3.9 Cuantificación y estadística

Para calcular la supervivencia se cuantificaron las células  $\beta$ III-tubulina positivas en el microscopio Zeiss, ya que es un marcador específico de las RGCs, que marca tanto el soma como las neuritas de estas células. También medimos la elongación de las neuritas de las RGCs gracias al programa Zen. Marcando la neurita en el programa obteníamos la longitud de dicha línea. Los resultados de supervivencia celular se mostraron en porcentajes tomando como 100% la condición de control. Los resultados de la elongación de las neuritas se muestran en µm. Al menos se han realizado 3 réplicas para cada experimento y 3 experimentos independientes. Después de calcular la media por cada condición, se calculó la desviación estándar y el error estándar.

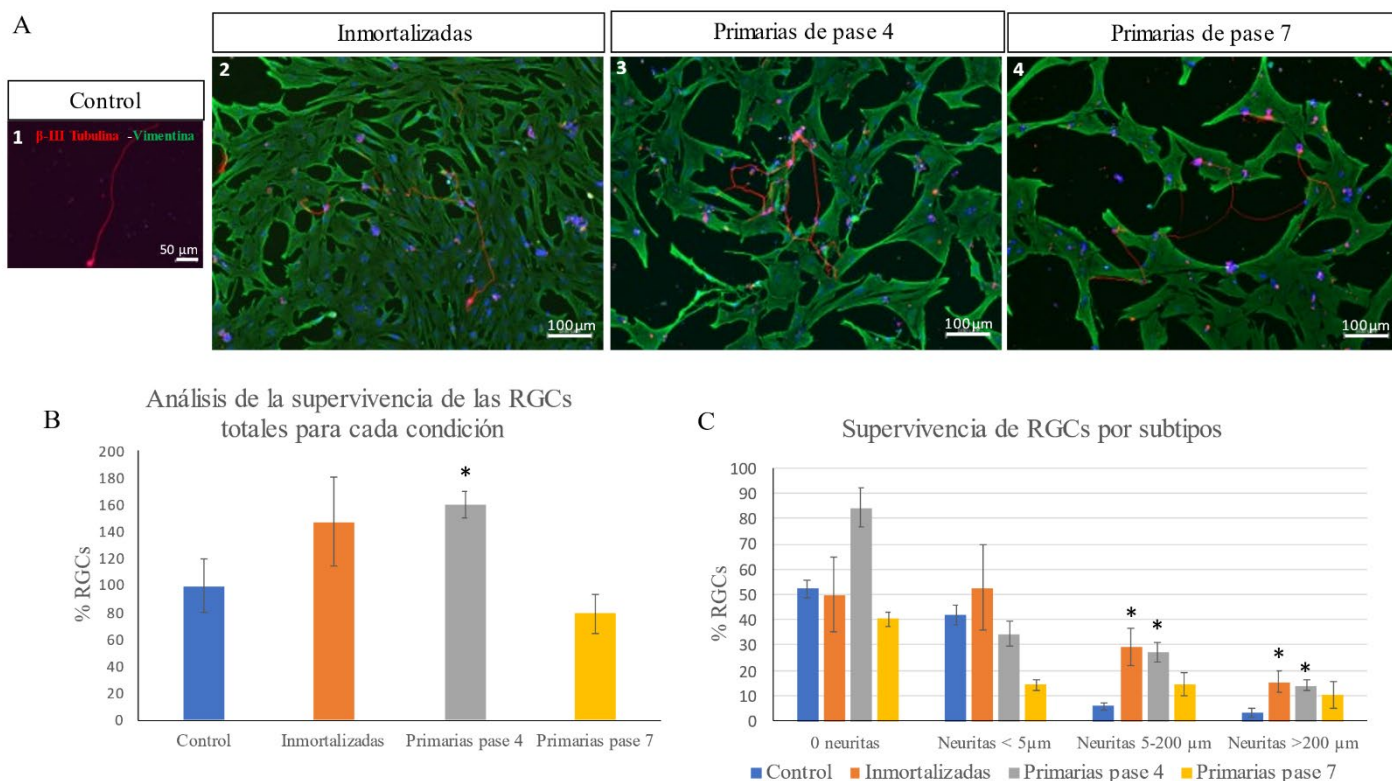
Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software estadístico IBM SPSS. La comparación de las medidas obtenidas consistió en el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, y un test de Dunn para comparaciones de medias múltiples. Las diferencias se consideraron significativas para todas las pruebas con p-valor <0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análisis de la supervivencia de las RGCs en co-cultivo con las células de Müller

En primer lugar, se estudió la supervivencia de las RGCs de rata en co-cultivo con células de Müller de ballena inmortalizadas y primarias de pase 4 y 7. Primero, se analizó la supervivencia

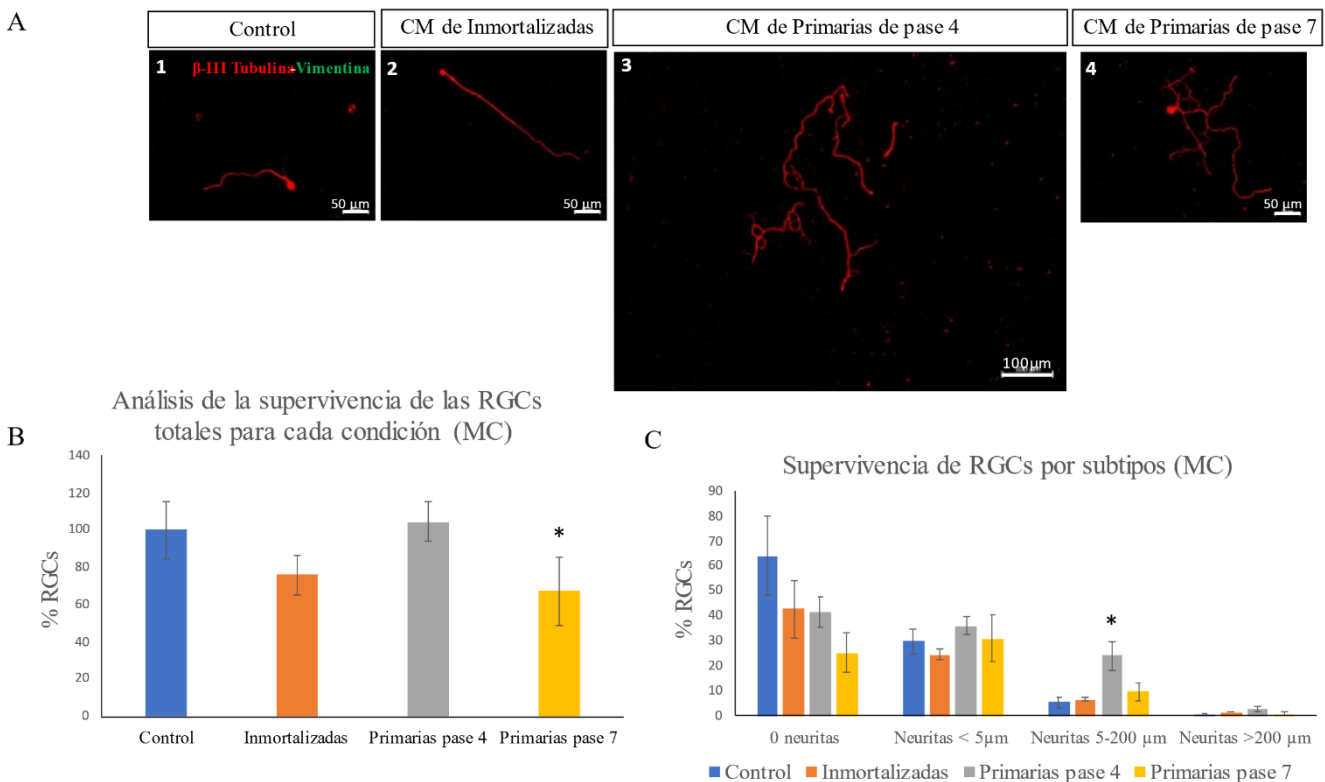
de las RGCs totales para cada condición. El porcentaje total de las RGCs en-co-cultivo con células de Müller primarias en fase 4 aumenta significativamente a un  $160.07 \pm 10.11\%$  respecto al  $100 \pm 19.60\%$  % del control (Figura 6B). También se calculó la supervivencia de las RGCs clasificadas según el tamaño de sus neuritas (0 neuritas,  $<5\mu\text{m}$  neuritas cortas,  $5\text{-}200\mu\text{m}$  neuritas medias,  $>200\mu\text{m}$  neuritas largas) para cada condición. Los resultados obtenidos muestran que las RGCs con neuritas medias co-cultivadas con células de Müller inmortalizadas y con células de Müller primarias de fase 4 aumentan significativamente a un  $29,31 \pm 7,12\%$  y a un  $27,32 \pm 3,95\%$  respectivamente, en comparación con el control  $5,88 \pm 1,4\%$ . También se observan diferencias significativas en el porcentaje de RGCs con neuritas largas, aumentando a un  $15,43 \pm 4,3\%$  en co-cultivos con células de Müller inmortalizadas y a un  $13,95 \pm 1,98\%$  en co-cultivos con células de Müller primarias de fase 4, respecto al control,  $3,09 \pm 1,74\%$  (Figura 6C). Cabe resaltar, que, aunque no sea significativo, en los co-cultivos con células de Müller de fase 7, se observa una disminución en la supervivencia respecto al control. Esto sugiere que el envejecimiento de las células de Müller primarias afecta a la supervivencia de las RGCs.



**Figura 6. Supervivencia de las RGCs en co-cultivo con células de Müller inmortalizadas y primarias en fase 4 y 7.** (A) Imágenes representativas de los cultivos celulares en las diferentes condiciones en los que las RGCs se marcaron con un anticuerpo contra la  $\beta$ III-tubulina (rojo), las células de Müller se marcaron con un anticuerpo contra la vimentina (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (A1) RGCs en la condición control. Barra de escala:  $50\mu\text{m}$ . (A2) RGCs sobre Müller de ballena inmortalizadas. Barra de escala:  $100\mu\text{m}$ . (A3) RGCs sobre Müller de ballena primarias de fase 4. Barra de escala:  $100\mu\text{m}$ . (A4) RGCs sobre Müller de ballena primarias de fase 7. Barra de escala:  $100\mu\text{m}$ . (B) Análisis de la supervivencia de las RGCs totales para cada condición. (C) Porcentaje de RGCs según el tamaño de sus neuritas. \*p-valor  $< 0,05$ . Las figuras mantienen la proporción para ver las diferencias de tamaño. RGCs: células ganglionares de la retina.

## 4.2 Análisis de la supervivencia de las RGCs de rata crecidas con el MC de células de Müller

En segundo lugar, para evaluar si el aumento de la supervivencia de las RGCs se debe no sólo al contacto con las células de Müller de ballena, sino también a los factores que secretan, se hizo un estudio de las RGCs cultivadas con el MC recogido de los cultivos de células de Müller de ballena inmortalizadas y primarias de pase 4 y 7. Primero se hizo un análisis de la supervivencia de las RGCs totales para cada condición. Sin embargo, al contrario de cuando las células están en contacto, no observamos ningún incremento en la supervivencia en ninguna de las condiciones. Cabe resaltar que en las RGCs cultivadas con el MC obtenido de las células de Müller de pase 7, sí hay un decrecimiento significativo de la supervivencia a un  $67,08 \pm 18,53$ , respecto al  $100 \pm 15,78\%$  del control. A continuación, medimos la supervivencia de las RGCs según el tamaño de sus neuritas (0 neuritas,  $<5\mu\text{m}$  neuritas cortas,  $5-200\mu\text{m}$  neuritas medias,  $>200\mu\text{m}$  neuritas largas). Solo vimos diferencias significativas en las RGCs con neuritas medias, entre el control  $5,48 \pm 2,21\%$  y las RGCs cultivadas con MC de células Müller primarias de pase 4,  $24,19 \pm 5,87\%$ . Estos resultados sugieren que el MC no tiene tanto efecto en la supervivencia, como cuando las células de Müller están en contacto con las RGCs, sin embargo, seguimos observando que lo mejor para la supervivencia son las células de Müller primarias de pase 4. Además, en los cultivos con el MC las células de Müller primarias en pase 7, la supervivencia de las RGCs disminuye, lo que sugiere que el envejecimiento celular de las células de Müller también afecta a la supervivencia de las RGCs.



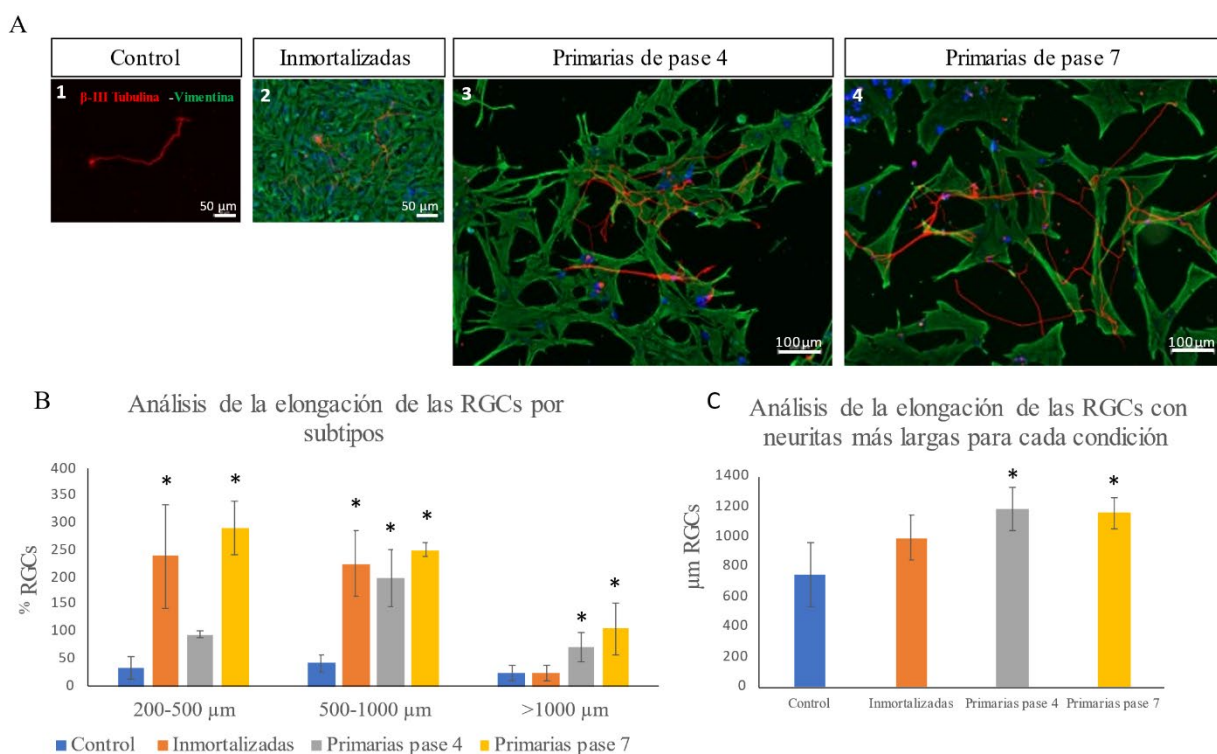
**Figura 7. Supervivencia de las RGCs con el MC recogido de células de Müller inmortalizadas y primarias en pase 4 y 7.** (A) Imágenes representativas de los cultivos celulares en las diferentes condiciones en los que las RGCs se marcaron con un anticuerpo contra la  $\beta$ III-tubulina (rojo), las células de Müller se marcan con un anticuerpo contra la vimentina (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (A1) RGCs en la condición control. Barra de escala:  $50\mu\text{m}$ . (A2) RGCs con el MC de Müller de ballena inmortalizadas. Barra de escala:  $50\mu\text{m}$ . (A3) RGCs con el MC de Müller de ballena primarias de pase 4. Barra de escala:  $100\mu\text{m}$ . (A4) RGCs con el MC de Müller de ballena primarias de pase 7. Barra de escala:  $50\mu\text{m}$  (B) Análisis de la supervivencia de las RGCs totales para cada condición. (C) Porcentaje de RGCs según el tamaño de sus neuritas. \*p-valor  $<0,05$ . Las figuras mantienen la proporción para ver las diferencias de tamaño. MC: medio condicionado. RGCs: células ganglionares de la retina.

### 4.3 Estudio del crecimiento neurítico de las RGCs en co-cultivo con las células de Müller

En tercer lugar, se analizó la capacidad de regeneración que tienen las RGCs en co-cultivo con las células de Müller inmortalizadas y primarias de pase 4 y 7 midiendo la elongación de la neurita más larga de cada RGC y tomando en cuenta sólo las neuritas de más de  $200\mu\text{m}$ , que son las que consideramos largas. Primero se analizó el número de RGCs clasificadas según el tamaño de sus neuritas (neuritas de  $200-500\mu\text{m}$ , neuritas de  $500-1000\mu\text{m}$  y neuritas de más de  $1000\mu\text{m}$ ). Analizando los resultados según su clasificación, observamos que el porcentaje de RGCs con neuritas de entre  $200-500\mu\text{m}$ , aumenta significativamente a un  $239,25\pm 95,09\%$  y a un  $290,27\pm 48,48\%$  respecto al control  $33,33\pm 20,99\%$  en las RGCs co-cultivadas con células de Müller inmortalizadas y con células de Müller primarias de pase 7 respectivamente. Con respecto al porcentaje de RGCs con neuritas de entre  $500-1000\mu\text{m}$  los resultados muestran un aumento significativo en todos los tipos de co-cultivos con respecto al control ( $41,66\pm 15,95\%$ ). Aumentando a un  $225,18\pm 59,11\%$  en co-cultivo con las células de Müller inmortalizadas y a un  $197,91\pm 52,4\%$  y  $250,69\pm 12,12\%$  en co-cultivo con las células de Müller primarias en pase 4 y 7. Por último, el porcentaje de las RGCs con neuritas de más de  $1000\mu\text{m}$ , que son las más largas, observamos diferencias significativas en los co-cultivos con células de Müller primarias de pase 4 y 7 que aumentaron en un  $71,25\pm 26,26\%$  y  $105,55\pm 48,48\%$  respecto al  $25\pm 13,99\%$  del control (Figura 8B).

También se analizó la elongación de las RGCs con neuritas más largas para cada condición. La elongación de las RGCs aumenta significativamente siendo  $749,28\pm 209,60\mu\text{m}$  el promedio de las neuritas más largas de las RGCs en condición control y  $1184,455\pm 140,05\mu\text{m}$  y  $1153,823\pm 104,17\mu\text{m}$  los promedios de las neuritas de las RGCs co-cultivadas con células de Müller primarias de pase 4 y 7. Debido a estos resultados, podemos concluir que las células de Müller primarias de pase 4 y 7, son las que más capacidad de elongación neurítica mantienen.

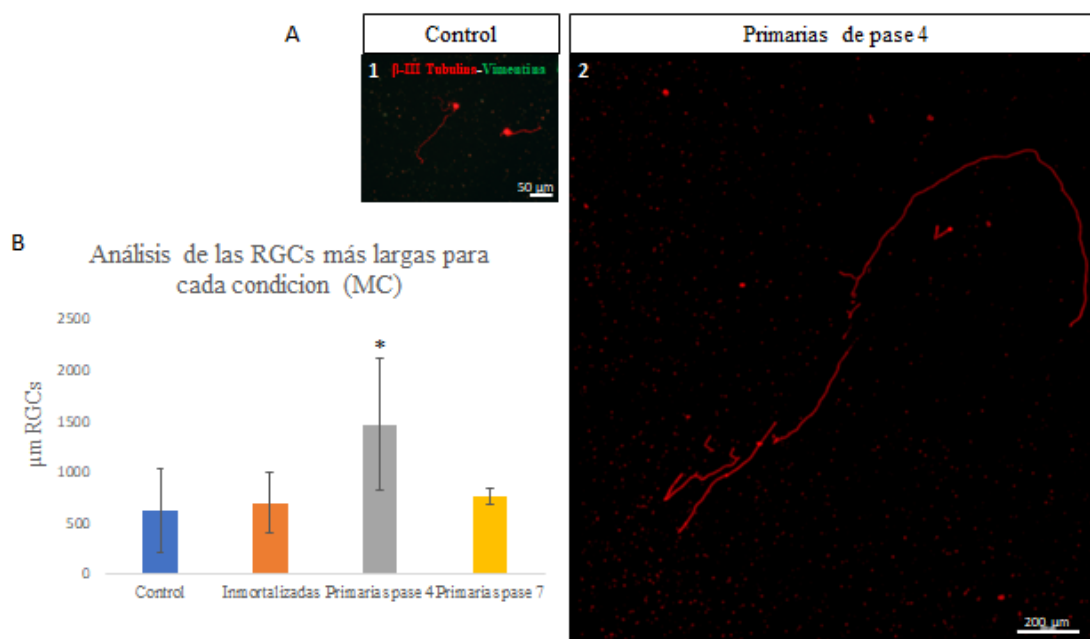




**Figura 8. Regeneración de neuritas de RGC en co-cultivo con células de Müller inmortalizadas y primarias en pase 4 y 7.** (A) Imágenes representativas de los cultivos celulares en las diferentes condiciones en los que las RGCs se marcaron con un anticuerpo contra la  $\beta$ III-tubulina (rojo), las células de Müller se marcan con un anticuerpo contra la vimentina (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (A1) RGCs en la condición control. Barra de escala: 50 $\mu$ m. (A2) RGCs sobre Müller de ballena inmortalizadas. Barra de escala: 50 $\mu$ m. (A3) RGCs sobre Müller de ballena primarias de pase 4. Barra de escala: 100 $\mu$ m. (A4) RGCs sobre Müller de ballena primarias de pase 7. Barra de escala: 100 $\mu$ m. (B) Análisis de la elongación de las RGCs por subtipos (neuritas de 200-500 $\mu$ m, neuritas de 500-1000 $\mu$ m y neuritas de más de 1000 $\mu$ m). (C) Análisis de la elongación de las RGCs con neuritas más largas para cada condición en  $\mu$ m. \*p-valor <0,05. Las figuras mantienen la proporción para ver las diferencias de tamaño. RGCs: células ganglionares de la retina.

#### 4.4 Estudio del crecimiento neurítico de las RGCs con el MC de células de Müller

Por último, para analizar si el aumento de la longitud de las neuritas de las RGCs se debe no sólo al contacto con las células de Müller de ballena, sino también a los factores que secretan, se examinaron las RGCs cultivadas con el MC recogido de los cultivos de células de Müller de ballena inmortalizadas y primarias de pase 4 y 7. Se calculó el promedio de las RGCs con neuritas más largas para cada condición con MC midiendo la elongación de las neuritas más largas de cada RGC. Los resultados muestran diferencias significativas entre el control, con un promedio de 610,45 $\pm$ 411,12 $\mu$ m, y las primarias de pase 4, con un promedio de 1864,85 $\pm$ 649,88 $\mu$ m. El MC de las células primarias en pase 4 mantiene las propiedades que ayudan al crecimiento neurítico de las RGCs, sin embargo, este efecto no se mantiene en el MC de inmortalizadas y primarias en pase 7.



**Figura 9. Regeneración de neuritas de RGC con MC.** (A) Imágenes representativas de los cultivos celulares en las diferentes condiciones en los que las RGCs se marcaron con un anticuerpo contra la  $\beta$ III-tubulina (rojo), las células de Müller se marcan con un anticuerpo contra la vimentina (verde) y los núcleos se tiñen con DAPI (azul). (A1) RGCs en la condición control. Barra de escala: 50 $\mu$ m. (A2) RGCs con MC de Müller de ballena primarias de fase 4. Barra de escala: 200 $\mu$ m. (B) Porcentaje de RGCs por subtipos según la elongación de sus neuritas. (C) Análisis de las RGCs con neuritas más largas para cada condición en  $\mu$ m. \*p-valor <0,05. Las figuras mantienen la proporción para ver las diferencias de tamaño. MC: medio condicionado. RGCs: células ganglionares de la retina.

## 5. DISCUSIÓN

Las RGCs son las neuronas responsables de transferir información visual del ojo al cerebro, gracias a sus largos axones (Masland, 2012). Debido a estas largas prolongaciones, son susceptibles de sufrir daños degenerativos causados por distintas enfermedades o lesiones, lo que conduce a una pérdida irreversible de visión o incluso a la ceguera (Cuenca, 2014). Como hemos comentado anteriormente, los axones del SNC no se regeneran más allá del lugar de la lesión en los mamíferos adultos (Isenmann et al., 2003). Por otro lado, las células gliales de Müller participan en la supervivencia y la regeneración neurítica de las RGCs a través de la liberación de factores tróficos y neuroprotectores (García, 2003). El estudio de la neuroregeneración de las RGCs es un campo de estudio en el que se están invirtiendo grandes esfuerzos en los últimos años y debido a su importancia, se están proponiendo diferentes métodos para conseguir la neuroregeneración de las RGCs gracias a las propiedades de las células de Müller (Van dick et al, 2021) (Musada et al., 2020). En estudios previos del grupo comprobaron que las células de Müller de ballena aumentaban la capacidad de elongación neurítica de las RGCs más que las células de Müller de cerdo y de rata. Debido a esta capacidad de elongación nunca antes vista hasta ahora, a la dificultad de conseguir células de Müller de ballena y al limitado periodo de vida de las células de Müller primarias, se inmortalizaron las células de Müller de ballena creando la línea celular W21M. De

este modo, también se comprobaron las diferencias entre las células primarias de Müller de ballena y las inmortalizadas (Pereiro et al., 2022). Por ello, en el presente estudio, hemos analizado el efecto que tienen las células de Müller en la supervivencia y la elongación de las RGCs tanto en los co-cultivos de RGCs con los diferentes tipos células de Müller, como en cultivo con el MC de las células de Müller inmortalizadas y primarias de pase 4 y 7. Es decir, hemos estudiado como afecta la senescencia o el envejecimiento y la inmortalización a las células de Müller primarias de ballena a la supervivencia y crecimiento neurítico de las RGCs.

Nuestros resultados muestran que las RGCs co-cultivadas con las células de Müller primarias de pase 4 son las que tienen mayor supervivencia. En cambio, en los co-cultivos con células de Müller de pase 7, no aumentaba la supervivencia de las RGCs, lo que sugiere que las células de Müller en pase 7 pierden capacidad neuroprotectora. Por lo tanto, según nuestros resultados, el envejecimiento celular afecta a la capacidad de las Müller para neuroproteger la RGCs, al menos, a partir del pase 7. En estudios previos, se ha visto que las células de Müller primarias de ballena alcanzan la senescencia en el pase 8 (Pereiro, 2022), y también que el envejecimiento conlleva una desaceleración irreversible de los procesos fisiológicos y una alteración las actividades metabólicas (Govindaraju, 2020). También se ha comprobado, que tanto los parámetros ultraestructurales como los funcionales de las mitocondrias de las células de Müller se ven afectados en los procesos implicados en el envejecimiento. En algunos casos, las mitocondrias muestran una disminución significativa en su potencial de membrana y viabilidad (Paasche et al., 2000) y también en el contenido de glutatión, un potente agente antioxidante, de las células de Müller que disminuye con el envejecimiento celular (Paasche et al., 1997). Esto, puede explicar por qué disminuye la supervivencia de RGCs en co-cultivos con células de Müller de pase 7, ya que puede ser debido al envejecimiento de las células de Müller.

Además, las RGCs también se cultivaron con MC recogido de los cultivos de células de Müller de ballena inmortalizadas y primarias de pase 4 y 7, para evaluar si el aumento de la supervivencia de las RGCs se debía a factores liberados por las células de Müller o por estar contacto con las mismas. En este caso podemos observar como la supervivencia disminuye significativamente en los cultivos con células de Müller primarias de pase 7. El hecho de que la supervivencia de las RGCs con MC de células de Müller en pase 7 disminuya, confirma los resultados de los co-cultivos. Además, no observamos ningún incremento en la supervivencia total respecto al control en ninguna de las condiciones por lo que hay que tener en cuenta que la vida media de los factores neuroprotectores secretados por las células de Müller podría ser corta perdiendo su efectividad en el MC. En los co-cultivos, las células de Müller están en contacto continuo con las RGCs, pudiendo secretar constantemente los factores neuroprotectores, en cambio, aunque el MC se repone cada dos días, puede no ser suficiente para ver el mismo efecto con el MC que con los co-cultivos (Vecino, 2020).

En este estudio, también se ha analizado el efecto de las células de Müller de ballena inmortalizadas y primarias en la regeneración y elongación de las neuritas de las RGCs. Para estudiar este parámetro, sólo hemos tenido en cuenta las RGCs con neuritas más largas ( $> 200\mu\text{m}$ ). El análisis de la elongación de las RGCs, muestra que las células de Müller primarias son las que tiene la mayor capacidad neuroregeneradora. Al analizar la elongación de las neuritas en grupos,



en todos los tipos de co-cultivo hay un aumento de número de RGCs de entre 200-500 y 500-1000 $\mu$ m, sin embargo, en cuanto a porcentaje de RGCs de más de 1000 $\mu$ m de elongación solo aumenta cuando se cultivan con las células de Müller primarias tanto en pase 4 como en pase 7. Estos resultados sugieren que las células de Müller inmortalizadas no tienen tanta capacidad de elongación como las primarias. En estudios previos del grupo de investigación mostraron que la expresión de algunos marcadores moleculares cambiaba con la inmortalización de las células de Müller de ballena, algunos de esos marcadores estaban relacionados con la desdiferenciación celular lo que puede explicar que la inmortalización disminuya el efecto neuroregenerador de las RGCs (Pereiro et al., 2022). En otras células gliales como las células de Schwann, se ha estudiado cómo puede afectar la inmortalización en la expresión de factores neurotróficos. Por ejemplo, vieron como la expresión de BDNF y NGF, disminuían significativamente, después de inmortalizarlas (Jiang et al., 2012).

Por último, se analizó como afecta el MC obtenido de las células de Müller de ballena inmortalizadas y primarias en la neuroregeneración y elongación, para ver si los factores expresados por las células Müller mantienen la capacidad neuroregenerativa o si es necesario que las células de Müller estén en contacto con las RGCs. La única diferencia significativa observada fue en el cultivo con MC de las células de Müller primarias de pase 4 respecto al control. Esto respalda los resultados anteriores en los que las células de Müller inmortalizadas no mantienen el efecto neuroregenerador de las RGCs.

En resumen, hemos comparado como afectan las células de Müller inmortalizadas y primarias de pase 4 y 7 a la supervivencia y a la neuroregeneración de las RGCs. Tanto en co-cultivos de RGCs con células de Müller como en los cultivos de RGCs con MC obtenido de las células de Müller. Gracias a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos deducir que el envejecimiento celular de las células de Müller afecta a la supervivencia de las RGCs y que las RGCs en los co-cultivos con células de Müller primarias son las que tienen mayor supervivencia. Este efecto de las células de Müller en la supervivencia no se mantiene con en el MC. También podemos afirmar que las células de Müller inmortalizadas no tienen tanta capacidad de neuroregeneración como las células de Müller primarias en co-cultivo, y que el MC de células de Müller primarias de pase 4 es el único que mantiene la capacidad neuroregeneradora. Estos resultados y la continuación de este estudio sobre las propiedades neuroregeneradoras de las células de Müller de ballena abre una nueva línea de investigación en la que identificar las proteínas implicadas podría ayudar a su futura aplicación en terapias para tratar enfermedades neurodegenerativas de la retina y del SNC.

## 6. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La supervivencia de las RGCs aumenta en co-cultivo con las células de Müller primarias de pase 4 y disminuye con las Müller primarias de pase 7, por lo tanto, el envejecimiento celular afecta a la capacidad neuroprotectora de las células de Müller



2. El MC de las células de Müller no aumenta la supervivencia de las RGCs, aunque el contacto directo con las RGCs si favorece la supervivencia. Por lo que los factores neuroprotectores secretados por las células de Müller no son tan efectivos como el contacto con las propias células.
3. En los co-cultivos con células de Müller primarias, la elongación de las neuritas de las RGCs fue más alta que en los co-cultivos con células de Müller inmortalizadas, demostrando que las células primarias mantienen las capacidades neuroregeneradoras en los pases 4 y 7 y en cambio las inmortalizadas no tienen tanta capacidad de elongación.
4. La elongación de las neuritas de las RGCs con MC de células de Müller inmortalizadas es menor que con MC de las células de Müller primarias, por lo que el MC de las células inmortalizadas tiene menos efecto neuroregenerativo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, Belén. (2021). Estudio de la protección del epitelio pigmentario de la retina por el secretoma de células madre uterinas en condiciones de estrés oxidativo. Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I. <http://hdl.handle.net/10803/672534>.
- Au, NPB., Ma, CHE. (2022). Neuroinflammation, Microglia and Implications for Retinal Ganglion Cell Survival and Axon Regeneration in Traumatic Optic Neuropathy. *Frontiers in molecular neuroscience*. doi: 10.3389/fimmu.2022.860070.
- Boia, R., Ruzafa, N., Aires, ID., Pereiro, X., Ambrósio, AF., Vecino, E., Santiago, AR. (2020). Neuroprotective Strategies for Retinal Ganglion Cell Degeneration: Current Status and Challenges Ahead. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms21072262.
- Carmona, L. (2004). Efecto modulador de las proteínas asociadas a microtúbulos en la formación de microtúbulos y microfilamentos. Universidad de Chile.
- Coleman-Belin, J., Harris, A., Chen, B., Zhou, J., Ciulla, T., Verticchio, A., Antman, G., Chang, M., Siesky, B. (2023). Aging Effects on Optic Nerve Neurodegeneration. *Int J Mol*. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms24032573>.
- Cuenca, N., Fernández-Sánchez, L., Campello, L., Maneu, V., De la Villa, P., Lax, P., Pinilla, I. (2014). Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases, *Progress in Retinal and Eye Research, Volume 43*. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.07.001.
- Dayhaw-Barker, P. (2002). Retinal pigment epithelium melanin and ocular toxicity. *International Journal of Toxicology*. doi: 10.1080/10915810290169873.
- de Melo Reis, RA., Cabral-da-Silva, Me., de Mello, FG., Taylor, JS. (2008). Müller glia factors induce survival and neuritogenesis of peripheral and central neurons. *Brain Research*. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.035.
- Eastlake, K., Luis, J., Limb, GA. (2020). Potential of Müller glia for retina neuroprotection. *UCL Institute of Ophthalmology and NIHR Biomedical Research Centre at Moorfields Eye Hospital*. doi: 10.1080/02713683.2019.1648831.
- García, M., Vecino, E. (2003). Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol*. doi: 10.14670/HH-18.1205.
- García, M., Forster, V., Hicks, David., Vecino, E. (2002). Effects of Müller Glia on Cell Survival and Neuritogenesis in Adult Porcine Retina In Vitro. *IOVS*. PMID: 12454045.



- García, M., Ruiz ederra, J., Hernández-barbáchano, E., Urcola, J., Bilbao, J., Araiz, J., Durán, J., Vecino E. (2003). Neuroprotección de las células ganglionares de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*.
- Govindaraju, D.R., Innan, H., Veitia, R.A. (2020). The Muller's Ratchet and Aging. *Trends in Genetics*. doi: 10.1016/j.tig.2020.02.004.
- Hauck, S.M., Ueffing, M. (2009). Factores neurotróficos derivados de las células de Müller. En el camino hacia la terapia neuroprotectora en la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*.
- Jacobi, A., Tran, N.M., Yan, W., Benhar, I., Tian, F., Schaffer, R., He, Z., Sanes, J.R. (2022) Overlapping transcriptional programs promote survival and axonal regeneration of injured retinal ganglion cells. *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2022.06.002.
- Jiang, H., Qu, W., Han, F., Liu, D., Zhang, W. Establishment of immortalized Schwann cells derived from rat embryo dorsal root ganglia. (2016). *Int J Mol Med*. doi: 10.3892/ijmm.2012.1016.
- Kevenaar, Josta T., Hoogenraad, Casper c. (2015). The axonal cytoskeleton: from organization to function. *Frontiers in molecular neuroscience*. doi: 10.3389/fnmol.2015.00044.
- Kolb, H., Fernandez, E y Nelson, R. (1995). *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Science Center.
- Lefevre, E., Van Hove, I., Sergeys, J., Steel, D.H.W., Schlingemann, R., Moons, L., Klaassen, I. (2021). PDGF as an Important Initiator for Neurite Outgrowth Associated with Fibrovascular Membranes in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Current Eye Research*. doi: 10.1080/02713683.2021.1966479.
- Lehmann, H.C., Chen, W., Mi, R., Wang, S., Liu, Y., Rao, M., Höke, A. Human Schwann cells retain essential phenotype characteristics after immortalization. *Stem Cells*. (2012). doi: 10.1089/scd.2010.0513.
- Lorber, B., Berry, M., Douglas, M.R., Nakazawa, T., Logan, A. (2009). Activated retinal glia promote neurite outgrowth of retinal ganglion cells via apolipoprotein E. *Journal of Neuroscience Research*. doi: 10.1002/jnr.22095.
- Mahabadi, N., Al Khalili, Y. (2022) Neuroanatomy, Retina. En *StatPearls*. StatPearls
- Masland R.H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.002.
- Musada, G.R., Dvorianchikova, G., Myer, C., Ivanov, D., Bhattacharya, S.K., Hackam, A.S. (2020) The effect of extrinsic Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in Muller glia on retinal ganglion cell neurite growth. *Dev Neurobiol*. doi: 10.1002/dneu.22741.
- Paasche, G., Gärtner, U., Germer, A., Grosche, J., Reichenbach, A. (2000). Mitochondria of Retinal Müller (Glial) Cells: The Effects of Aging and of Application of Free Radical Scavengers. *Ophthalmic Research*. doi:10.1159/000055618.
- Paasche, G., Huster, D., Reichenbach, A. (1998). The Glutathione Content of Retinal Müller (Glial) Cells: The Effects of Aging and of Application of Free-Radical Scavengers. *Ophthalmic Research*. doi:10.1159/000055495.
- Pereiro, Xandra. (2019). Neuroprotection of Retinal Ganglion Cells by Müller Glia in vitro in Health and Disease. Universidad del País Vasco.
- Pereiro, X., Beriain, S., Rodriguez, L., Roiz-Valle, D., Ruzafa, N., Vecino, E. (2022). Characteristics of Whale Müller Glia in Primary and Immortalized Cultures. *Front Neurosci*. doi: 10.3389/fnins.2022.854278.
- Raju, T.R., Bennett, M.R. (1986). Retinal ganglion cell survival requirements: a major but transient dependence on Müller glia during development. *Brain Research*. doi: 10.1016/0006-8993(86)90017-x.



- Ruzafa, N., Vecino, E. (2015). Effect of Müller cells on the survival and neuritogenesis in retinal ganglion cells. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. doi: 10.1016/j.ofal.2015.03.009.
- Sarthy, V., Ripps, H. (2001). Structural organization of retinal glia. The Retinal Müller Cell: Structure and Function. *Perspectives in Vision Research*. *Kluwer Academic*.
- Taguchi, M., Shinozaki, Y., Kashiwagi, K., Shigetomi, E., Robaye, B., Koizumi, S. (2016). Müller cell-mediated neurite outgrowth of the retinal ganglion cells via P2Y6 receptor signals. *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/jnc.13427.
- Van Dyck, A., Bollaerts, I., Beckers, A., Vanhunsel, S., Glorian, N., van Houcke, J., van Ham, T.J., De Groef, L., Andries, L., Moons, L. (2021). Müller glia-myeloid cell crosstalk accelerates optic nerve regeneration in the adult zebrafish. *Glia*. doi: 10.1002/glia.23972.
- Vecino, E., Rodriguez, F., Ruzafa, N., Pereiro, X., Sharma, S. (2016). Glia–neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 51. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003.
- Vecino, E., Pereiro, X., Miltner, AM., La Torre, A. (2020). Effects of Adult Müller Cells and Their Conditioned Media on the Survival of Stem Cell-Derived Retinal Ganglion Cells. *Cells*. doi: 10.3390/cells9081759.
- Veiga-Crespo, P., del Rio, P., Blindert, M., Ueffing, M., Hauck, S.M., Vecino, E. (2013). Phenotypic map of porcine retinal ganglion cells. *Molecular Vision*. 19, 904-916. PMID: PMC3654859.
- Webvision.med.utah.edu (2017). Available at: <http://webvision.med.utah.edu>. Fecha de consulta 14 de mayo del 2023.
- Williams, PR., Benowitz, LI., Goldberg, JL., He, Z. (2020). Axon Regeneration in the Mammalian Optic Nerve. *Annu Rev Vis Sci*. doi: 10.1146/annurev-vision-022720-094953
- Yin, Yuqin., Benowitz., L. (2017). In Vitro and In Vivo Methods for Studying Retinal Ganglion Cell Survival and Optic Nerve Regeneration. *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-4939-7407-8\_16.