


## FORMULARIO DE DUDAS PARA LOS AUTORES

	<b>Revista:</b> OFTAL  <b>Referencia N°:</b> 843	<b>Por favor, envíe un correo electrónico con su respuesta a:</b>  <b>E-mail:</b> <a href="mailto:corrections.eses@elsevier.thomsondigital.com">corrections.eses@elsevier.thomsondigital.com</a>
---	--	--

Estimado/a autor/a,

En el caso que durante la preparación de su manuscrito hubiera surgido alguna duda o comentario, podrá encontrarlos en el listado que aparece a continuación y señalados en el margen de la prueba. Le rogamos que revise detenidamente la prueba que le enviamos y señale al margen sus correcciones, si las hubiera, o bien nos envíe un texto aparte detallando los cambios necesarios.

En caso de que las correcciones afecten a las ilustraciones, por favor, consulte las instrucciones en: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**Citas cruzadas:** Si en el artículo se hace referencia a otros artículos incluidos en el mismo número, le rogamos que compruebe que se han añadido las palabras "este número" tanto en la bibliografía como en el texto.

<b>Referencias no citadas:</b> En el caso de que existan referencias que se incluyen en la bibliografía pero que no se citan en el texto, se le indicará al final de la prueba. Por favor, cite cada referencia en la parte del texto donde debería aparecer o elimínela de la bibliografía.	
<b>Faltan referencias:</b> En el caso de que se citen en el texto referencias que no aparecen en la bibliografía, se le indicará al final de la prueba. Por favor, complete la bibliografía o elimine las referencias del texto.	
<b>Situación en el artículo</b>	<div style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 10px;"> <b>Dudas / comentarios</b> </div> <div style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black; margin-bottom: 10px;"> <b>Por favor, introduzca su respuesta o corrección en la línea correspondiente de la prueba</b> </div> <div style="display: flex; flex-direction: column;"> <div style="margin-bottom: 10px;"> <b>Q1</b>             Por favor, confirme que nombre (givenname) y apellido/s (surname) están identificados correctamente. Los colores distintos indican si se ha etiquetado como nombre o apellido. Tenga en cuenta que la adecuada identificación es fundamental para la correcta indexación del artículo.         </div> <div> <b>Q2</b>             Por favor, confirme el contenido del apartado Conflicto de intereses.         </div> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin-top: 20px; text-align: center;">       Por favor, marque esta casilla o especifique su aprobación si no tiene correcciones que realizar en el archivo PDF       <input style="float: right; margin-left: 20px;" type="checkbox"/> </div>

### Problemas con los archivos electrónicos

En ocasiones los archivos originales de texto o de imágenes no se pueden abrir o procesar correctamente. En caso de que los archivos de su artículo hayan presentado estos problemas, hemos procedido de la siguiente manera:

<input style="width: 30px; height: 30px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> Escaneado del texto (total o parcial)	<input style="width: 30px; height: 30px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> Tecleado del texto (total o parcial)	<input style="width: 30px; height: 30px; border: 1px solid black;" type="checkbox"/> Escaneado de las ilustraciones
--	---	---

Muchas gracias por su colaboración.



# ARCHIVOS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OFTALMOLOGÍA

[www.elsevier.es/oftalmologia](http://www.elsevier.es/oftalmologia)



## Artículo original

# Efecto de las células de Müller en la supervivencia y neuritogénesis de las células ganglionares de la retina

N. Ruzafa\* y E. Vecino

Departamento de Biología Celular e Histología, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Bilbao, Vizcaya, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

### Historia del artículo:

Recibido el 18 de septiembre de 2014

Aceptado el 10 de marzo de 2015

On-line el xxx

### Palabras clave:

Células de Müller

Células ganglionares de la retina

Supervivencia

Neuritogénesis.

## R E S U M E N

**Objetivo:** Las células ganglionares de la retina (RGC) son las células que se afectan primero en neuropatologías como el glaucoma, por eso es importante investigar nuevas estrategias neuroprotectoras. Las células de Müller son células gliales que proporcionan a las neuronas factores tróficos y soporte físico. El propósito del presente estudio fue analizar el efecto de las células de Müller en la supervivencia y la formación de neuritas en las RGC.

**Método:** Se cultivaron células de Müller de rata hasta obtener un cultivo confluyente sobre el que se añadieron RGC. Cultivos puros de RGC fueron usados como control. Se marcaron las RGC con anticuerpos anti-βIII-tubulina y las células de Müller con antiglutamina sintetasa, los núcleos se tiñeron con DAPI. Se cuantificó el número de RGC y número y longitud de las neuritas.

**Resultados:** No hay diferencias en el número de RGC entre el control y las células crecidas sobre el sustrato de Müller. Aumenta la proporción de neuritas en RGC que crecieron sobre células de Müller, el número RGC con 1-3 neuritas pasa de un 19 a un 43%. También aumenta la longitud de las neuritas, el número de RGC con neuritas de entre 50-200 μm aumenta de un 21 en control a un 41% en cocultivo y con más de 200 μm pasa de un 6 a un 20%.

**Conclusiones:** Las células de Müller mantienen la supervivencia de las RGC e inducen un aumento tanto del número como de la longitud de las neuritas de las RGC.

© 2014 Sociedad Española de Oftalmología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [noelia.ruzafa@ehu.es](mailto:noelia.ruzafa@ehu.es) (N. Ruzafa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.oftal.2015.03.009>

0365-6691/© 2014 Sociedad Española de Oftalmología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Effect of Müller cells on the survival and neuritogenesis in retinal ganglion cells

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Müller cells

Retinal ganglion cells

Survival

Neuritogenesis.

**OBJECTIVE:** Retinal ganglion cells (RGCs) are the first affected cells in neuropathies like glaucoma, for that reason it is very important to explore new methods to neuroprotect these neurons. Müller cells are glial cells that provide the neurons with trophic factors and scaffold. The purpose of this study was to analyze the effect of Müller cells on survival and neurite formation in RGCs.

**METHOD:** Rat Müller cells were grown until a confluent culture on which rat RGCs were added, using pure culture of rat RGCs as controls. RGCs were labeled with  $\beta$ III-tubulin, and Müller cells with glutamine synthetase antibodies. In addition, nuclei were stained with DAPI. The number of RGCs and number and neurite length were measured.

**RESULTS:** No differences were found in the number of RGCs between control and cells grown on the substrate of Müller cells. The proportion of RGCs with neurites increased when they grew on Müller (RGCs with 1-3 neurites increased from 19% to 43%. The length of neurites also increased in RGCs grown on Müller cells, with the number of RGCs with neurites from 50 to 200  $\mu$ m increasing from 21% to 41%, and with neurites of more than 200  $\mu$ m the increase was from 6% to 20%.

**CONCLUSIONS:** Müller cells support the survival of RGCs and induced an increase in the number and length of neurites of RGCs.

© 2014 Sociedad Española de Oftalmología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

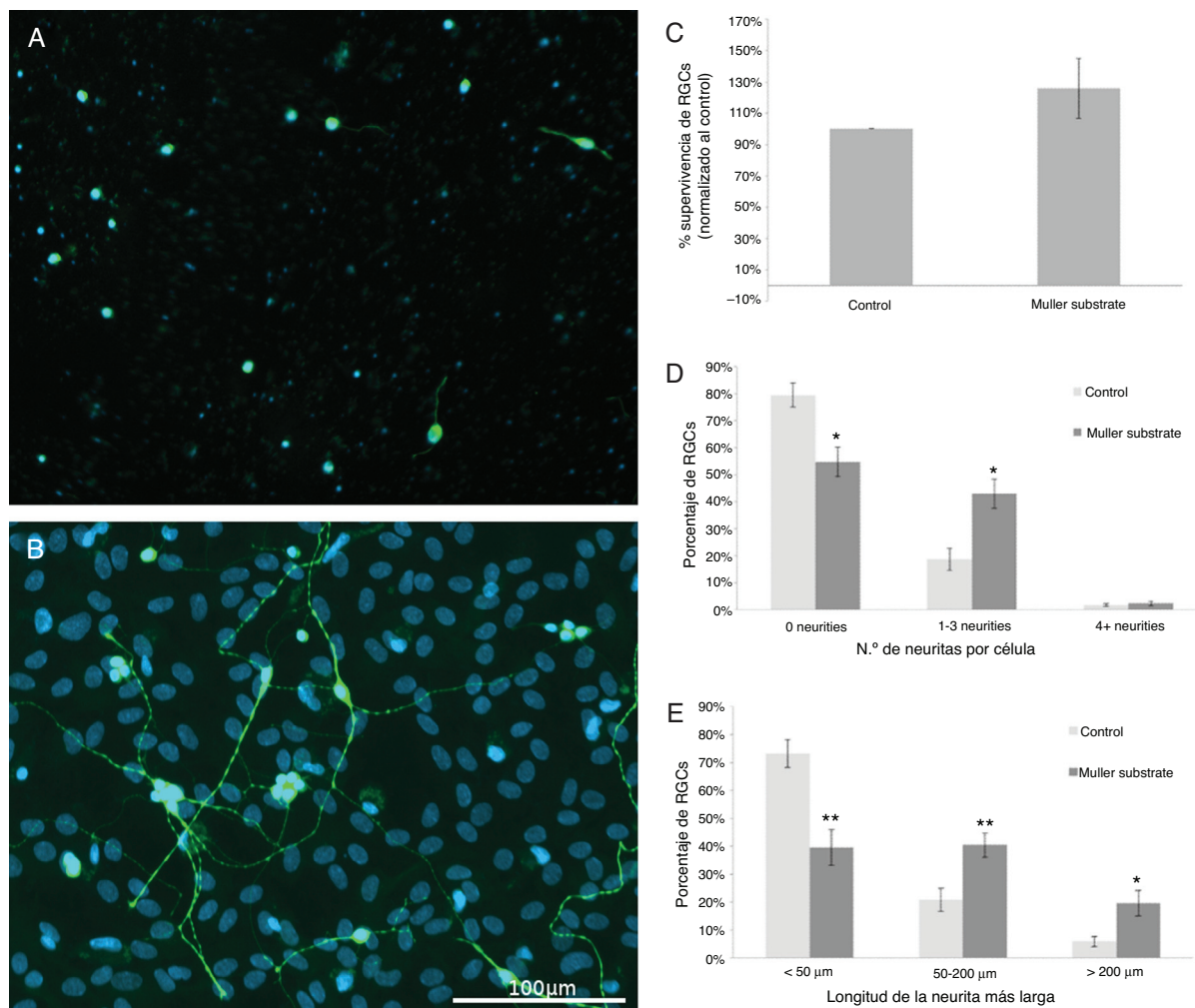
El sistema nervioso central de los mamíferos tiene una capacidad limitada para la reparación, y después de una enfermedad o lesión en la retina, como por ejemplo el glaucoma<sup>1,2</sup>, la degeneración axonal<sup>3</sup>, la isquemia<sup>4,5</sup> o la diabetes<sup>6,7</sup>, se produce la muerte de las células ganglionares de la retina (RGC) que puede conducir a una ceguera irreversible<sup>3,8</sup>. Las RGC son incapaces de regenerarse de manera eficiente después de un daño severo, en su lugar mueren por apoptosis<sup>9,10</sup>; sin embargo, en un ambiente adecuado, se ha demostrado que pueden recuperar su capacidad regenerativa<sup>11</sup>. Como consecuencia, las estrategias iniciales de regeneración deben centrarse en el mantenimiento de la supervivencia de las RGC y la posterior promoción de la elongación axonal y su reintegración funcional.

Las RGC están en estrecho contacto con las células gliales, en la retina hay 3 tipos: las células de Müller, los astrocitos y la microglia<sup>3</sup>. Las células de Müller se extienden por todo el espesor de la retina dándole estabilidad estructural y mantienen un estrecho contacto con la mayoría de las neuronas de la retina<sup>12</sup>. También proporcionan a las neuronas factores tróficos, así como el mantenimiento de neurotransmisores y la homeostasis de iones<sup>13,14</sup>. Estas células de apoyo tienen la capacidad de promover la supervivencia celular y la reparación, pero también pueden facilitar la degeneración de los RGCs en su forma reactiva<sup>13,15</sup>. De este modo, estudiaremos el efecto in vitro de las células de Müller en la supervivencia y la formación de neuritas en las RGC.

## Material y métodos

Las células para cultivos se obtuvieron de ratas *sprague-dawley* hembras adultas. Las retinas fueron disecionadas cuidadosamente y el tejido se disoció usando tripsina (0,25% tripsyn-EDTA, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 30 minutos para las células de Müller, y papaína (Worthington Papain Disociation kit, Worthington Biochemical Lakewood, NJ, EE. UU.) durante 90 minutos para las RGC. El tejido fue homogeneizado y centrifugado para purificar y concentrar las células. Para el cultivo de RGC se siguió el protocolo del fabricante del kit de disociación Worthington Papain Disociation kit (Worthington Biochemical Lakewood, NJ, EE. UU.). Tras purificar las células se sembraron en pocillos de placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina (10  $\mu$ g/ml Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y laminina (10  $\mu$ g/ml Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Se compararon 2 tipos de cultivos, por una parte RGC cultivadas durante 5 días sobre cubres tratados con poli-L-Lisina y laminina, que fueron usados como control. Y por otro lado cocultivos, en los que células de Müller se cultivaron hasta ser confluentes, normalmente la confluencia la adquieren en el día 10 poscultivo, momento en el que se añadieron las RGC, que fueron cultivadas durante 5 días adicionales. Los cultivos se mantuvieron con medio Neurobasal A (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado. Al menos se realizaron 3 réplicas de cada tipo de cultivo, y este procedimiento se realizó por triplicado.

Transcurridos los 5 días de cultivo de las RGC, las células fueron fijadas con metanol y lavadas con PBS (tampón fosfato salino pH 7,0), tras bloquear los antígenos inespecíficos con el tampón de bloqueo (3% BSA y 0,1% Triton X-100 en PBS)



**Figura 1 – Fotografía de un cultivo de RGC (A) y RGC sobre una monocapa de células de Müller (B) donde se marcan las RGC con  $\beta$ III-tubulina en verde y los núcleos se tiñen con DAPI. Gráficas en las que se representa la supervivencia de RGC (C) en control frente a las células crecidas sobre un sustrato de células de Müller, y el porcentaje de RGC respecto al número de neuritas por célula (D) y la longitud de la neurita más larga (E) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).**

se les añadieron los anticuerpos: anti- $\beta$ III-tubulina de ratón (Promochem, Madison, WI, EE. UU.) como marcador específico de RGC en dilución 1:2.000 y anti-glutamina sintetasa de conejo (Abcam Cambridge, Inglaterra) como marcador específico de las células de Müller en dilución 1:10.000. Tras volver a lavar se añadieron anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 antirratón y Alexa Fluor 555 anticonejo (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) ambos en dilución 1:1.000, y DAPI (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) marcador nuclear en dilución 1:10.000.

Se tomaron imágenes usando un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Jena, Alemania). Se realizaron 10 fotografías al azar por cada cubreobjeto, usando un objetivo de 10X. Se realizó un recuento celular de todas las células de cada fotografía atendiendo a la siguiente clasificación: células sin neuritas, células de 1-3 neuritas y células con más de 3 neuritas. Las células con neuritas se clasificaron en: neuritas menores de 50  $\mu$ M, entre 50-200  $\mu$ M o más de 200  $\mu$ M. Finalmente se analizaron estadísticamente los resultados usando un test t de Student.

## Resultados

En la figura 1 se puede apreciar la diferencia entre las RGC que crecieron en control sobre cubres cubiertos de poli-L-lisina y laminina (fig. 1. A) y las que crecen sobre una monocapa de células de Müller (fig. 1. B). Mientras que las RGC en control son células generalmente esféricas o con una neurita corta, por el contrario, cuando crecen sobre células de Müller, las RGC presentan un mayor número tanto de neuritas como de la longitud de estas.

Para analizar la supervivencia celular, se realizó un recuento del número de RGC crecidas en cultivos control, el valor medio fue normalizado y tomado como el 100%, y fue comparado con el número de RGC crecido sobre un sustrato de células de Müller. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos respecto a la supervivencia de las RGC (fig. 1. C).

Se realizó un recuento del número de neuritas que tenía cada RGC, clasificándose estas en RGC sin neuritas, con entre



1-3 neuritas o con más de 4 neuritas. Los resultados muestran un aumento significativo del número RGC que tienen entre 1-3 neuritas, que pasa de un 19% en cultivos sin Müller al 43% en los cocultivos ( $p=0,018$ ) (fig. 1. D). En relación con la longitud de las neuritas también aumenta en las RGC que crecen sobre células de Müller, así, el número de RGC que tienen neuritas de entre 50-200  $\mu\text{m}$  aumenta de un 21 a un 41% ( $p=0,003$ ) y el de células con neuritas de más de 200  $\mu\text{m}$  pasa de un 6 a un 20% ( $p=0,022$ ) (fig. 1. E).

## Discusión

Las células de Müller, el principal tipo de células gliales de la retina, son responsables del soporte homeostático y metabólico de las neuronas de la retina<sup>14</sup>. En estudios previos de nuestro grupo se había demostrado un papel neuroprotector y de regeneración de las células de Müller hacia las RGC a través de la liberación de factores tróficos y agentes antioxidantes<sup>15</sup>. En el presente estudio se ha observado que bien no se ha visto un aumento significativo de la supervivencia en 5 días de cultivo de las RGC de rata creciendo sobre una monocapa confluyente de células de Müller, aumenta la neuritogénesis, ya que se ha observado un incremento en el número de células con neuritas, así como la longitud de dichas neuritas, dato ya observado en cerdos y ratón<sup>18</sup>.

A medida que avanza el desarrollo de las RGC, su supervivencia depende de factores secretados por las células de Müller<sup>19</sup>. Cultivos de células de Müller secretan factor de crecimiento nervioso (NGF) y otras moléculas neurotróficas como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) entre otras, que apoyan la supervivencia y la neuritogénesis de las RGC<sup>18,20</sup>. También se ha observado que los mediadores solubles derivados de la actividad de las células de Müller pueden atenuar el daño inducido por hipoxia y la pérdida de RGC<sup>21</sup>, corroborando así su papel neuroprotector. Además, se ha observado que la glía activada promueve el crecimiento de las neuritas vía apolipoproteína E<sup>22</sup>.

En conclusión, los factores tróficos secretados por las células de Müller favorecen la formación y la elongación de las neuritas de las RGC de rata *in vitro*, lo que les confiere propiedades neuroprotectoras.

## Financiación

Grupo Consolidado Gobierno Vasco (IT437-10).

## Conflicto de intereses


Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido un proyecto financiado por Grupos Consolidados Gobierno Vasco (IT437-10) y por una beca predoctoral UPV/EHU concedida a Noelia Ruzafa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR. Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:484-91.
- Wynnski T, Desatnik H, Quigley HA, Glovinsky Y. Comparison of ganglion cell loss and cone loss in experimental glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1995;120:184-9.
- Newman E, Reichenbach A. The muller cell: A functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 1996;19:307-12.
- Joo CK, Choi JS, Ko HW, Park KY, Sohn S, Chun MH, et al. Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: Involvement of nmda-mediated excitotoxicity and p53. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:713-20.
- Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:2002-14.
- Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA. Penn State Retina Research G: Retinal neurodegeneration: Early pathology in diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2000;28:3-8.
- Zhang L, Ino-ue M, Dong K, Yamamoto M. Retrograde axonal transport impairment of large- and medium-sized retinal ganglion cells in diabetic rat. *Curr Eye Res.* 2000;20:131-6.
- Garcia M, Forster V, Hicks D, Vecino E. Effects of muller glia on cell survival and neuritogenesis in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3735-43.
- Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 1995;61:33-44.
- Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:774-86.
- Berry M, Ahmed Z, Lorber B, Douglas M, Logan A. Regeneration of axons in the visual system. *Restor Neurol Neurosci.* 2008;26:147-74.
- Bringmann A, Reichenbach A. Role of muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 2001;6:E72-92.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25:397-424.
- Reichenbach A, Bringmann A. New functions of muller cells. *Glia.* 2013;61:651-78.
- Fleisch VC, Fraser B, Allison WT. Investigating regeneration and functional integration of CNS neurons: Lessons from zebrafish genetics and other fish species. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812:364-80.
- Garcia M, Vecino E. Role of muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol.* 2003;18:1205-18.
- Garcia M, Ruiz Ederra J, Hernandez-Barbachano E, Urcola JA, Bilbao J, Araiz J, et al. Retinal ganglion cell neuroprotection in culture. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2003;78:151-7.
- de Melo Reis RA, Cabral-da-Silva M, de Mello FG, Taylor JS. Muller glia factors induce survival and neuritogenesis of peripheral and central neurons. *Brain Res.* 2008;1205:1-11.

- 247 19. Raju TR, Bennett MR. Retinal ganglion cell survival 254  
248 requirements: A major but transient dependence on muller 255  
249  glia during development. Brain Res. 1986;383:165-76. 256  
250 20. Hauck SM, von Toerne C, Ueffing M. The neuroprotective 257  
251 potential of retinal muller glial cells. Adv Exp Med Biol. 258  
252 2014;801:381-7. 259  
253 21. Unterlauff JD, Eichler W, Kuhne K, Yang XM, Yafai Y, 260  
released by muller glial cells exerts neuroprotective effects  
on retinal ganglion cells. Neurochem Res. 2012;37:  
1524-33.  
22. Lorber B, Berry M, Douglas MR, Nakazawa T, Logan A.  
Activated retinal glia promote neurite outgrowth of retinal  
ganglion cells via apolipoprotein E. J Neurosci Res.  
2009;87:2645-52.

UNCORRECTED PROOF