

**Sesión 5: Neurodegeneración y neuroprotección (II).**

**Moderador:** Carmen Romero Grimaldi (Departamento de Fisiología. Universidad de Cádiz)

**Título:** CULTIVO DE CELULAS GANGLIONARES DE RETINA BOVINA.

**Autores:** MIGUEL A. COMPANY, VICTORIA MANEU Y MERCEDES PALMERO.

**Filiación:** ÁREA DE FARMACOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE ÓPTICA. UNIVERSIDAD DE ALICANTE.

La muerte de las células ganglionares de retina (CGR) es un suceso fundamental que interviene en numerosas patologías oculares, como por ejemplo el glaucoma. Cómo y por qué ocurre esta degeneración celular no está totalmente comprendido. Para el estudio de las rutas celulares y/o moleculares que culminan con la muerte de las CGR, es esencial establecer previamente el cultivo de CGR. Ha sido bastante difícil el mantenimiento en cultivo de estas células y el desarrollo de dendritas. Se han descrito diferentes métodos con el objetivo de incrementar la supervivencia en el tiempo así como la riqueza de estas células en un cultivo de retina neural o la emisión de dendritas. Barres y cols. describen el método del “doble panning” con el que consiguen un enriquecimiento de las CGR pero la supervivencia de las mismas en cultivo es bastante limitado. Shoge y cols con la técnica del Separador Celular Magnético”, consiguen una mayor supervivencia y enriquecimiento de CGR. En nuestro laboratorio, hemos seguido ambos métodos encontrándonos con ciertas limitaciones en nuestro modelo de retina bovina, por tanto elaboramos un nuevo plan metodológico para abordar el cultivo de las CGR procedentes de ojos de reses bovinas, que hasta el momento no ha sido descrito. Tras ciertas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio, mostramos un nuevo método más directo, con menos manipulación y, por tanto, menos agresivo. Con éste el porcentaje CGR bovinas es elevado, emiten prolongaciones y se consigue mantener en cultivo durante 2 semanas. Este método consiste en incubar el segmento posterior del ojo, una vez eliminado el humor vítreo, con Papaína. Tras 5-10 minutos de incubación a 37°C, se recolecta la suspensión con una micropipeta, con mucho cuidado sin tocar la retina. Se lava la copa ocular con medio completo (DMEM suplementado con SFB al 5%) varias veces, recolectando los lavados. Se añade a la suspensión DMEM/SFB suplementado con DNasa. Se resuspende cuidadosamente y se centrifuga a 600xg durante 10 minutos. El precipitado se resuspende con micropipeta con medio completo, se cuentan y plantan en placas previamente tratadas con poli-D-lisina. Se mantienen en incubador de CO2 durante 2 horas. Tras este periodo de incubación retira el medio completo y se añade medio Neurobasal enriquecido con factores de crecimiento y medio SATO/Bottensteing.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de Alicante (Ayudas a Grupos Jóvenes, GRJ05-14) y por la Generalitat Valenciana (GV05/151).